HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	凍結融解の細菌呼吸に及ぼす影響の機序について
Author(s)	大原, 吉輝
Citation	低温科學. 生物篇, 12, 1-37
Issue Date	1954-12-30
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/17568
Type	departmental bulletin paper
File Information	12_p1-37.pdf

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

Yoshiteru ŌHARA 1954 On the Mechanism of the Effect of Freezing and Thawing upon Bacterial Respiration. *Low Temperature Science, Ser. B, 12.* (With English résumé p. 37)

凍結融解の細菌呼吸に及ぼす影響の機序について*

大原吉輝

(低温科學研究所　醫學部門)

(昭和29年12月受理)

緒　言

生物の営む生活現象はその生体の構成単位である細胞が，その固有の機構のもとに呼吸によつて外界よりエネルギーを摂取し，之を熱源として化学的分解或いは合成を行うことにより営まれている。

而してその呼吸様式には物質を空気中の酸素で完全に燃焼させて物質の持つ総ての化学的エネルギーを解離させる酸素呼吸と，物質を分解して低度の燃焼熱を有する物質に変ずる事により一定量のエネルギーを遊離させる分解呼吸の二つがあるが，この中酸素呼吸は必然的に酸素の消費を伴ない又その産物として炭酸ガスと水を生ずる。この呼吸の基質となるべき物質(呼吸物質)は或いは外界より或いは自己の細胞内より得るものであるが，主として含水炭素，蛋白質，脂肪であることは云う迄もない。細菌の呼吸も亦特殊のものを除いて之等の呼吸物質を利用することにより呼吸を営んでいるもので，これは細胞の生理的機能を営むに必要なエネルギーを得る手段として行うものであるから，生理的機能の強弱が酸素呼吸の強さを決定する重要な因子ともなり得るものである。

而してこの酸素呼吸は細胞の基本的物質である原形質中に存在する特殊の酵素群，即ち一環の呼吸酵素系(酸化環元酵素系)によつて行われることはいうまでもないが，この呼吸酵素系の活性，不活性により酸素呼吸能の大小が決定づけられ，従つて生活細胞の強弱も又之により因縁づけられるわけである。

細菌における呼吸酵素系，或いはその呼吸機構については後にふれるが，これに加わる生理的，或いは化学的諸因子により呼吸酵素に何等かの影響を及ぼすことは勿論であり，その影響が甚大である時は，酵素系は或いは破壊され，或いはその連環の一部に断裂を来たして酸素呼吸能は減退乃至は消滅し，従つて生活現象を営むことも亦不可能となるべきものである。

---

* 北海道大學低溫科學研究所業績　第274號
本研究の要旨は昭和29年2月日本細菌學會北海道支部大會に於て發表した。

これ迄我々は生物（特に微生物）の耐寒性機構について種々の角度から檢索して来たが，その実験の中でたまたま次の様な事実に遭遇した。即ち細菌（主として大腸菌）を用いて之を凍結（凍結融解）或いは凍結乾燥を行つた場合の細菌の蒙る障害及びその程度について実験を行つたのであるが，菌を凍結させれば多少とも障害を受け，分裂増殖の能力も減退する。かかる影響は要するに凍結或いは融解と云う外的条件に基づくものであるが，特にその際加えられる冷却の条件によつてその障害の程度は異なる。例えば急速に且つ極低温で凍結させた場合は，比較的緩慢にあまり低くない温度で凍結させたものに比し障害の程度は大である。この場合菌が凍結により或る程度の障害をうけ，あるものは死滅するのであるから，その呼吸能も同様に減少乃至は微弱になるものと考えられるが，事実は之に反し凍結により障害をうけた菌液はその生菌の数に於て減少するにも拘らず酸素消費量を測定すると，逆に常に呼吸量は増大する。且つ菌の生残度から云つて，より大なる障害を蒙る様な急速且極低温による凍結の方がかえつて呼吸量は増大する。即ち色々異なる凍結条件や菌濃度に対して恰も生菌数の減少と反比例する如く障害の大きな程呼吸量（酸素消費量）が増大すると云う結果を得たのである。

菌の生命乃至は生理的機能の強弱はその機能を営む呼吸酵素の活性，不活性と並行すべきものと思われる。ところが実際に菌体を凍結融解した場合に増殖力と呼吸量とが正反対の値を示したと云う事は如何なる機序に基づくものであるか，その点を明らかにしたいと考えて本実験を行つたのである。

實 驗 方 法

1) 使 用 材 料

i) 実験にはすべて大腸菌 (E. coli) を用い亀の子シャーレにて 37°C 18 時間培養のものを使用した。培地は肉エキス・ペプトン普通寒天培地である。

ii) 菌 浮 游 液　培養後菌をかきとり滅菌蒸溜水にて 3 回洗滌（遠心沈澱攪拌）し更に之を 24～48 時間冷藏庫に保存後更に 1 回滅菌蒸溜水にて洗い秤量瓶にて予め湿菌重量及び乾燥重量を測定した後一定の稀釈に応じた菌浮游液（蒸溜水）を作成しこれを resting bacteria として使用した。蒸溜水浮游液としたのは従来我が教室に於て行われた細菌の凍結実験がすべて凍結条件を簡単にするために蒸溜水浮游液を使用したことに倣つたものである。

2) 凍 結 融 解

i) 使 用 寒 剤　液体空気（約 −180°C）ドライアイス・アルコール（約 −70°C）及び塩化カルシュームのブライン（−30°C）を使用した。

ii) 凍結融解の条件　菌浮游液を径 1.2 cm の試験管に 1.0 cc 入れ 3～4 本同時に上記寒剤中に浸して 2 分間凍結させた後（菌液温度は寒剤の温度と等しくなる）直ちに 10°C の水槽に移し平等に試験管を振盪して菌液を融解させ，各々の試験管内の菌液を合してその一定量を使用した。なお一部の実験では凍結条件を 3 種，即ち到達温度を −30°C 及び −180°C にして急速

に凍結した場合と −30°C に達するまで緩慢に凍結させた場合とに分けて夫々比較した。

3) 生菌数測定

上記処置菌液及び無処置対照菌液を夫々菌濃度に従い生理的食塩水で 10^6～10^9 倍まで稀釈しその 1.0 cc を寒天培地に注加して平板培養し，24 時間後発育した集落の数を測定した。

4) 呼吸量の測定方法

Warburg の検圧法を用い消費された酸素の量について測定した。

i) 実験装置　可検液を入れる容器及び之に連接する検圧計 (manometer) と振盪装置及び恒温槽とより成つている。

ii) 使用量，緩衝液其の他　菌浮游液は一定の濃度のもの 0.5 cc を用いた。濃度は実験の項でその都度示すが主として湿菌量 50 mg/cc 前後のものを用い特に菌濃度の差を比較する実験では約 12 mg/cc から 100 mg/cc のものについて測定した。

緩衝液には $\frac{M}{15}$ 燐酸緩衝液 (pH. 7.2) を使用し更に呼吸時放出される炭酸ガスを吸収させる為に 10% 苛性加里を使用した。

即ち容器内組成は

菌浮游液	0.5 cc	…… 主室
燐酸緩衝液 (1/15 M pH 7.2)	2.0 cc	
苛性加里液 (10%)	0.5 cc	…… 副室

全量は 3.0 cc とする。なおこれ以外に基質，吸呼阻止剤等を入れる場合は夫々の項で述べるが燐酸緩衝液をそれに応じて減じて総量を常に 3.0 cc とした。

iii) 恒温槽温度及び測定時間　恒温槽の温度は 37°C ± 0.1°C とし振盪回数は 1 分間約 100 回，10 分毎に検圧計の読みを測定し，60 分間振盪して酸素消費量を測定した。なお，温度気圧変化による対照を置いて可検菌液の読みを補正した。

iv) 呼吸量 (酸素消費量) 測定　60 分後の検圧計の読みを h とすれば酸素消費量 x_{O_2} は次の式であらわされる。

即ち　　$x_{O_2} = h,\ k$

但し　　$$k = \frac{v_G \frac{273}{273+t} + v_F \alpha}{10}$$

で容器恒数である。

v_G……容器及び検圧計の瓦斯腔容積
t……恒温槽温度 (この実験では 37°C)
v_F……容器内の液容積 (この実験では 3.0 cc)
α……発生瓦斯の Bunsen 氏吸収係数

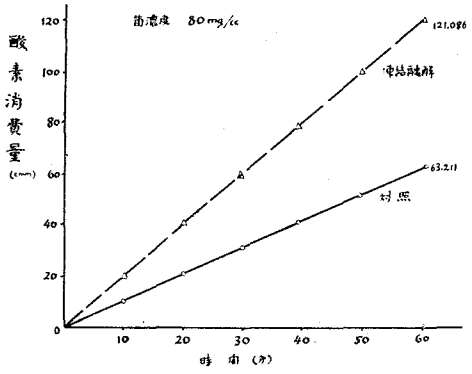
この容器恒数は使用全容器について予め測定した。実験成績に於て示した酸素消費量はいずれも Q_{O_2} ではない。

之は菌液濃度による差を論ずる場合のあること，またすべて対照に対する比較を問題としていること及び湿菌量の測定を厳密に行つたことなどの理由により単位容量の菌浮游液の酸素消費量を以て表わしている。

實　　驗 I

正常菌（無処置対照）と凍結融解菌との呼吸量比較

前記実験方法により湿菌量 80 mg/cc の菌液を液体空気に 2 分間浸して急速に凍結後融解した菌と対照との酸素消費量を測定比較すると第 1 図の如くになる。



第 1 圖　凍結融解による酸素消費量の増加

左図に於て明らかな様に処置しない対照菌の呼吸量は 63.211 であるのに対して之を凍結融解したものは 121.086 で酸素消費量の百分率は対照を 100 % とした場合，凍結融解菌（以後凍融菌とす）は 191.5 % で約 2 倍となる。なお凍融菌の生菌数は無処置対照に比して，10% 減じて 90% であつた。

この凍結融解による吸呼量の増加は菌濃度及び凍結条件によつて異なり菌の障害度（生菌減少）もこれ等の条件によつて異なる。各種凍結条件及び各種菌濃度による生菌数及び酸素消費量を測定すると第 1 表及び第 2 図の如き結果を得た。

第　1　表

菌濃度 (mg/cc)	凍結條件 S		R_1		R_2	
	生殘率 (%)	O_2消費率 (%)	生殘率 (%)	O_2消費率 (%)	生殘率 (%)	O_2消費率 (%)
100	97	133	95	156	91	162
65	96	118	95	172	73	191
50	93	135	80	185	81	198
25	88	149	69	192	69	231
16	92	161	64	190	63	208
12	100	176	49	211	54	238
7	90		40		41	

第 1 表に於て凍結条件の S, R_1, R_2 とは夫々次の様な条件で凍結融解をした菌である。

S……塩化カルシュームのブライン（−30°C）で緩慢に −30°C 迄温度を下げたもの

R_1……ドライアイス・アルコール（−70°C）で急速に凍結させ −30°C で止めたもの

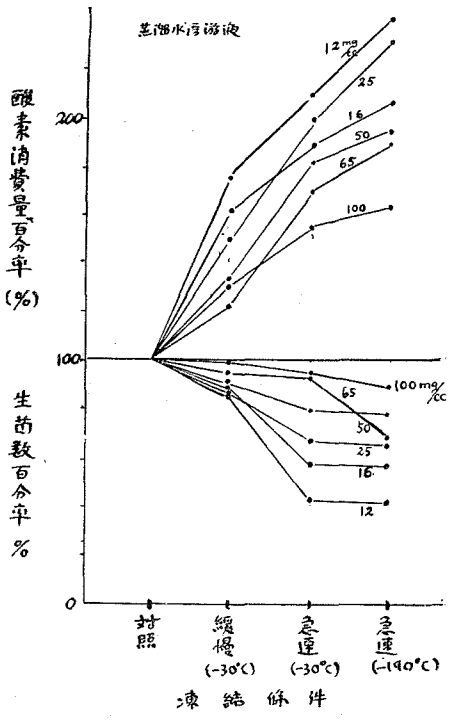
R_2……液体空気で急速に凍結させ凡そ −180°C 迄温度を下げたもの

(これらの温度は菌液に熱電対を挿入して測定した)。

これ等を夫々直ちに10℃の水槽中で融解させたものである。

菌濃度は各1ccあたりの湿菌の重量である。表中の数字は対照を100%とした場合の生菌の生残率及び酸素消費量率で%を以てあらわしたものである。

この表で明らかな様に菌液を凍結融解した場合にはその凍結条件としては急速に凍結させた方が菌の障害度（生菌数の減少）は大であり，且つ到達温度の低い方が障害度は大きい。この凍結条件による差については従来も種々論議された処であるが，吾教室では，急速に凍結した場合には緩慢に凍結させた場合よりも細胞内凍結を起す率が多くなるから障害の程度が大となるのだろうと考えている。この点については文献7), 8), 9)を参照されたい。又菌液の濃度から見れば濃度の大きな方が比較的障害は少ない様であるが，これは濃度の大なる程菌液のメジューム中の氷晶の生成状態が変つて細胞内凍結を起しにくくなるからではないかと考えられる。



第2圖　凍結條件を異にする各種濃度菌液の生菌數と酸素消費量の百分率

第2図は第1表に於ける生残率及び酸素消費率を対照的にあらわしたものであるが，この様に生残率が減少するに従つて逆に酸素消費率は増大すると云う結果を得た。

その増加の割合は菌濃度及び凍結条件によつて異なるが，兎に角障害の大きい程逆に酸素消費量は増大する事が認められた。

實驗Ⅰに對する考察

既に記述した様に細菌に於ける呼吸は一群の酸化還元酵素，即ち呼吸酵素系によつて行われるもので，この酵素の作用が菌の生理的機能の運営に重大な役割を演じているものである。この呼吸は菌に加わる物理的及び化学的な外的諸因子によつて，或いは促進的の，或いは阻害的の影響をうけるものであり，その因子としては温度，水素イオン濃度，麻酔剤，青酸加里，一酸化炭素，その他酵素賦活性物質等々多くのものが考えられる。

又生理的物質乃至は生理的因子によつても呼吸能が左右される事もある。その他，この呼吸の強さは細胞がその呼吸を行う直前に経過した呼吸の様式によつて著しい影響をうける場合がある。又呼吸そのものも単に酸素消費量の増減のみから影響をうけたと断定する事の出来な

い場合もある。

いずれにせよ細胞の呼吸能は全然独立した生活現象ではなく他のいくつかの生活現象と複雑な因果関係があり，その為に間接に影響をうける可能性があるから，この様な影響を与える因子が他の生活現象に如何なる影響を与えるかを同時に明らかにする必要がある。例えば色々な化学的毒物や物理的障害が細胞に非常に軽微に働いた場合，細胞の他の機構に障害が及んだとしても一時的に細胞の酸素消費量が増大する事があるが，これらは細胞の一般的な対抗反応又は刺戟による生活機能の亢進に伴う二義的の吸呼の増加であつて，この場合には細胞の障害と呼吸とは並行しないとも考えられるが，これ等が過度に加わつた時や，細胞を破壊乃至は死滅せしめる様な刺戟或いは障害が与えられた場合にはそれとは異なつて，当然呼吸は細胞の他の生活現象と並行して低下するものである。ところが実際に凍結融解を行つた場合生菌がかなり死滅する様な障害をうけているにも拘らず呼吸が増大する事実を見ると，これ等の想定からだけでは解決の出来ない複雑な因子が含まれている様に思う。

さて著者が今問題にしている呼吸とは細胞の複雑な多相的膠質を持つた原形質に存する呼吸酵素によつて行われるものであるから，細胞に加えられた外的な諸因子がこれ等細胞の多相的膠質状態とそれに伴なう表面現象及び原形質の水和状態等にどの様な影響を及ぼすかについて考えなければならない。

酵素は比較的低温に保存しても，その作用は殆んど障害されないものであるが，之等の細胞の構造及び原形質の膠質状態等が根本的に破壊された場合は当然正常の酸素呼吸も著しく阻害されるであろう。

生菌数が減少することからもわかる様に，凍結融解と云う現象によつて或る程度，これ等の細胞構造や膠質状態に障害を及ぼすことは想像される。処が一方或る種の酵素などでは凍結融解により影響をうけず，そのまま残存する事もあり得る。Nord は Lebedew の所謂チマーゼ製品を −5°C〜−15°C で2ケ月貯蔵した結果チマーゼの活性は何等失われず寧ろ増大しその際酵素液の表面張力が増加するに反し，粘度が減少した事を観察している。又 Gard もペルオキシダーゼ及びチロシナーゼに就いて同様にその作用力が凍結により増大した事を報じて居る。Nord はこの説明を次の様にして居る。

即ち凍結融解により酵素の親溶性コロイドの粒子が分塊 (Disaggregation) を行い，この為に粒子の径が縮少され且つ粒子は散乱し，従つて全体として酵素粒子の表面部分が拡大されて酵素作用の増大を来たしたのである。酵素作用はその膠質性を通じて行われるものであつて，換言すれば酵素の膠質状担体部分の表面の大小によりその作用力は増減する。Nord の場合はチマーゼであり且つ製品としてのチマーゼについて凍結融解を行つたのであり，又 Gard のペルオキシダーゼは酸化還元酵素で呼吸に関係の深いもので興味があるが，著者の場合の生菌体のままでの凍結融解による呼吸酵素系全体に対する観察とは条件を異にするものである。

呼吸酵素について生菌体のまま凍結融解を行つてその活性度を檢した文献は未だ見あたらないが，若しも呼吸酵素系が凍結融解により破壞されずに却つて酵素粒子の散乱による表面部分の拡大等によつて，その活性度が増大し，その為に酸素消費量が大となつたと假定すれば，その場合，1) 死滅した菌の呼吸酵素と，2) 生残した菌の呼吸酵素系とについて考えると，前者の場合は生活機能を営んでいる細胞に於てのみ呼吸現象が認められると云う事と矛盾があり，又假令呼吸酵素系の連環中一，二の酵素の活性が残存されたとしても複雑な連繫をなす呼吸酵素系全体としての呼吸作用が障害なく営まれるとは考え難い。

從つて 2) の生き残つた生菌の呼吸酵素が，凍結融解により活性化或いは活性度が増強され，無処置のものに比し遙かに酸素消費量が大となるのであろうと考えざるを得なくなるが，然し死菌に於ても呼吸酵素系がその機能を発揮するものかどうか，又残存した生菌の呼吸酵素系の活性化乃至は活性度の増強によつて，呼吸量の増大が招来されるかどうかは未だ不明である。又別の理由として生理的にも正常狀態で酵素の作用を抑制又はそれに桔抗する作用が存在していて，これが凍結融解により除去されて呼吸酵素の活性が増大するのかも知れない。その他菌の低温に対する適応 (Adaptation) 等という事も考えられ，或いは凍結融解による呼吸促進物質の遊離と云う様な事も想像出来るが，これ丈の実験に於ては，之等は総て推理であつて果してどれが正しいものかどうかは判定出来ない。

凍結融解によつて生菌が減少するにも拘らず，酸素消費量が増大するのは如何なる機序に基づくものかを追求する為に，更に以下の実験を行い誤つた推論を順次に否定することによつて最後の結論に到達しなければならない。

實　驗 II

青酸による呼吸阻害

菌に於ける呼吸機構は一連の酵素，助酵素及び補助物質から成つているものであるが，それ等の酵素系は次の様なものである。

即ち脱水素酵素，フラヴイン酵素，チトクローム，チトクロームオキシダーゼ，その他 Co-enzyme I 及び II 等である。

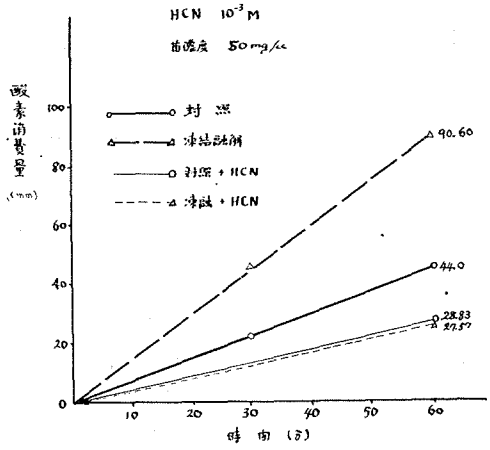
これ等のものの触媒作用によつて酸素呼吸が行われるものであるが，これ等の酵素は種々の化学的毒物によつてその作用が阻害される。例えば青酸は鉄を活性分子として之を接合分子に持つ呼吸酵素に作用し，その鉄原子と結合してその還元を阻止するものであるから，この鉄原子を持つ呼吸酵素，即ちチトクローム系に作用してその触媒作用を阻害する。

凍結融解による呼吸増加の機序を檢索するため青酸を用いて青酸感性 (sensitive) な酵素系の活性度を檢する目的で次の様な実験を行つた。

即ち容器内組成は対照及び凍結融解菌液を 0.5 cc，燐酸緩衝液 1.9 cc，苛性加里液 0.5 cc，及び HCN 0.1 cc を加えて全量 3.0 cc とし，HCN の最終濃度が 10^{-2}M となる様にして対照及

び凍融菌について HCN による呼吸阻害度を比較した (HCN を入れない場合は燐酸緩衝液は 2.0 cc とする)。

結果は青酸濃度 10^{-2}M では濃度過剰のため，対照及び凍融菌は共に呼吸は全く阻害されて両者に於ける差は認められなかつたので同じく青酸の濃度を 10^{-3}M にして測定した所，結果は第 3 図に示す如くになつた。



第 3 圖 青酸による呼吸阻害

この結果によると 10^{-3}M の HCN 濃度では凍融菌の方が対照に比してその阻害度は大であり，その阻害率を比較すると対照が 34.5% なのに対して凍融菌は 70% であつた。

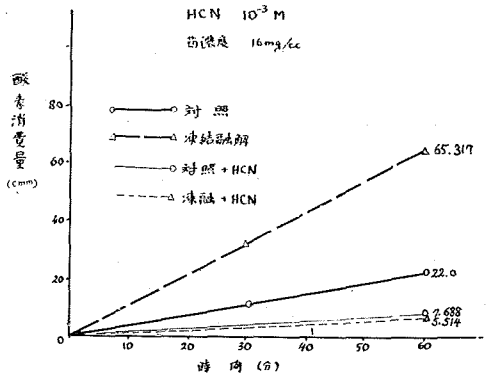
この結果から判定すると凍融菌の方が青酸に対する感性が大であり，従つて青酸感性酵素系即ちチトクローム系酵素の反応が大となつているのではないかという想像がなされる。

なおこの阻害率は湿菌量 50 mg/cc 菌濃度の時の平均値であるが，更に菌の濃度を薄くした場合に於て同じく 10^{-3}M の青酸による呼吸阻害度を見ると，その阻害率は両者共大となるが傾向は全く同一で凍融菌の方が阻害率は大であつた。第 2 表及び第 4 図は菌濃度 16 mg/cc (湿菌量) の時の呼吸阻害度を示すものである。

この二つの成績からわかるように凍融菌の方が青酸に対しより sensitive である事から凍融菌の青酸感性酵素系が何等かの形に於て，促進的に酸化還元作用が行われている様に思えるがこの事は後述の成績にも見られる様に例えば基質を加えた場合には，その基質に対する酵素系はいづれも著しくその反応速度が増すから青酸感性がより大であつた事のみでは凍融菌のチトクローム系酵素が対照のそれよりもその酵素能そのものが増大しているとは云えない。

第 2 表

	酸素消費量 (c.m.m)	HCN (10^{-3}M) を加えた時の酸素消費量 (c.m.m)	呼吸阻害率 (%)
對 照	22.0	7.6	65
凍 融	65.3	5.5	91



第 4 圖 青酸による呼吸阻害

又一方菌濃度が薄い場合及び青酸濃度が大なる場合はいずれも阻害度が大となる結果から見ると凍結融解による青酸阻害度の増加は生菌数の減少による所の生菌濃度の低下のためとも解釈出来るが，生菌のみが呼吸しているかどうかはこれ迄の段階に於ては未だ不明である。

これ等の事については後に各種の基質を加えた場合及び同時に青酸による呼吸阻害度を検した実験の項に於て再び検討する。

實　　驗 III

ウレタンによる呼吸阻害

Urethan は呼吸酵素中脱水素酵素 (Dehydrogenase) に作用してその反応を阻止するとされている。

一般に麻酔剤はこの脱水素酵素に作用するものであるが，この酵素は夫々の基質に対して特異性を有しているものであるから，その数多くの脱水素酵素のうちにはこれ等の阻害剤に対して或る程度の抵抗性を有して居るものもある。Urethan は大腸菌の場合葡萄糖及び林檎酸脱水素酵素等に対してはかなり強い阻止作用を有し琥珀酸，乳酸，蟻酸脱水素酵素はいくらか抵抗性を有していると言われて居る。

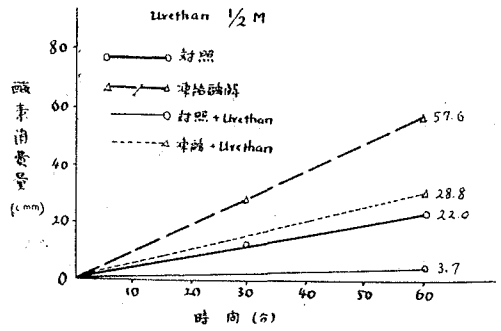
青酸による呼吸阻害作用を検したのと同じ目的で，これ等脱水素酵素に作用してその反応を阻害する Urethan を用いて次の様な実験を行つた。

菌液は同じく 0.5 cc，燐酸緩衝液 (1/5 M, pH 7.2) 1.5 cc，苛性加里液 (10%) 0.5 cc，及び Urethan (6 M) 0.5 cc，容器内全量 3.0 cc とし Urethan の最終濃度は 1 M とした。

対照及び凍融菌について Urethan を入れた場合についてその呼吸阻害度を比較すると 1 M Urethan の濃度では両者共に呼吸は全く阻害されて酸素消費は見られなかつた。即ち阻害率は共に 100% であつた。

そこで Urethan の濃度を色々に変えて同じく測定した結果次の様な結果を得た。

第 5 図に示すのは Urethan 1/2 M 濃度の時の対照及び凍融菌の呼吸阻害の比較である。



第 5 圖　Urethan による呼吸阻害

即ち Urethan 1/2 M の濃度での呼吸阻害を比較すると，その阻害率は対照の 79% に対して，凍融菌は 50% であつた。従つて凍融菌の方が対照に比しいくらか抵抗性を有していると言う結果が見られた。

この事は Urethan の濃度を 1/4 M, 1/8 M, 1/16 M といろいろの濃度について測定した結果何れも阻害度は対照の方が高く，凍融菌の方が Urethan に対して抵抗性を有する事が認められ，且つ Urethan 濃度が低くなる程その阻害率の差は大であつた。

Urethan の脱水素酵素に対する阻害作用より見て凍融菌がこの Urethan に対して抵抗性を有するかの様な成績を得た事は凍融菌に於ける脱水素酵素の作用が増強している様にも考えられるが，メチレン青の還元作用の時間測定と異なり，これは全体の酸素消費量を測定したものであるから，寧ろ従来の実験にも示すようにある種の脱水素酵素の不安定性乃至は不活性を示すものと考えられ，殊に Urethan はブドー糖及びリンゴ酸脱水素酵素にかなり強く作用する事からも後述の様にこれ等の脱水素酵素の活性度が却つて減弱した為とも考えられる。即ちこれ等 Urethan に対して阻害される二，三の脱水素酵素の作用が，凍結融解により障害をうけた為 Urethan に対して抗抵性を有している様な結果を得られたものと考える。

又一方 Urethan により阻害作用をうけない他の酵素系（チトクローム系等）による酸素消費量即ち低濃度の Urethan を加えた場合に測定された酸素消費量を比較すると $\frac{M}{2}$ Urethan 濃度の場合第5図にみられる通り，対照の 3.7 に対し凍融菌は 28.8 とかなり大きなひらきがある。

この値は Urethan により阻止作用をうけない酵素系（チトクローム系等）のみの呼吸量をあらわすものとは云えないが，何かこれ等の酵素系の反応が対照のそれよりも増大している事を示す様であるが，前の実験 I に於ける青酸の感性を検した成績を総合すると大体次の様な想定がなされる。

凍融菌は対照に比して青酸に対する感性が増し Urethan に対しては抵抗を有している結果を得たが，この事は青酸に対し Sensitive な酵素系即ちチトクローム系の反応及びその速度が大となり，又上記の様に Urethan により強く阻害作用をうけるある種の脱水素酵素の不安定性乃至は不活性化を暗示する様であるが，後者の場合は更に検討を要し，又たとえ Urethan によつて阻害をうける脱水素酵素の幾つかは凍結融解により不活性化されたとしても，Urethan に対し比較的阻止作用をうけにくい他の脱水素酵素が不活性化されたか，又どうなつているかはこの段階に於ては未だ断定出来ない。

然し又このある種の脱水素酵素の不活性化という事も推論に過ぎないし，又そうであつても Urethan に抵抗性を有していると云う事はチトクローム系の反応が盛になり，その為に呼吸量が増大した事による見かけのものかも知れない。

これ等はいずれも基質を何も加えない所謂 endogenous respiration に就いて観察しているのであるから，これ丈の実験からは複雑な酵素系列のどの部分が如何になつたかを指摘することは不可能である

實　　驗 IV

各種基質 (Substrate) を用いた場合の呼吸量の変動

凍結融解による呼吸量増加の機序が今迄の実験のみでは細菌の呼吸酵素系が特別な変化をした為に起るのか否かはわからないが，唯青酸に対しては凍融菌の方がより sensitive であり，

ウレタンに対しては凍融菌の方が反対に抵抗性を示したと云う結果を得た。

然しこの様な事があつたにしても，如何なる様式或いは機序のもとにこれ等の事が起つたのかはこれ迄では不明である。

今迄の実験に於ては endogenous respiration についてのみ観察したが，次にブドー糖，琥珀酸，蟻酸，乳酸，リンゴ酸を基質として加え，それを利用し得る呼吸酵素の活性度を対照及び凍融菌について比較測定した。

各基質は容器内に於ける最終濃度が 1/30 M になる様にし，苛性ソーダにて pH 7.0 になる様に修正した。又基質を入れないものも同時に測定し基質を加える事によつて呼吸量の増加する割合を無処置対照と凍融処置菌とについて比較した。又之と並行して基質を用いない場合及び用いた場合に於ける KCN (1/200 M) による呼吸阻害を測定し，各基質による青酸加里に対する感性度を実験 II と同様に検した。

尚基質を用いない場合及び基質を青酸加里と共に用いた場合は燐酸緩衝液を夫々増減して容器内液全量は常に 3.0 cc とした。

即ち容器内組成は

菌浮游液 ……	0.5 cc	
燐酸緩衝液 (1/15 M, pH 7.2) ……	1.5 cc ± 0.5 cc	主　室
基　　質 (1/6 M, pH 7.2) ……	0.5 cc	
苛性加里液 (10%) ……	0.5 cc	…副　室
青酸加里 (1/200 M) ……	0.5 cc	…側　室

全量 3.0 cc で基質の最終濃度は 1/30 M である。尚各実験に示された値は 3 回以上の実験成績の平均値をとつて表わしたものである。

(1)　葡萄糖を基質として用いた場合の呼吸量の変動

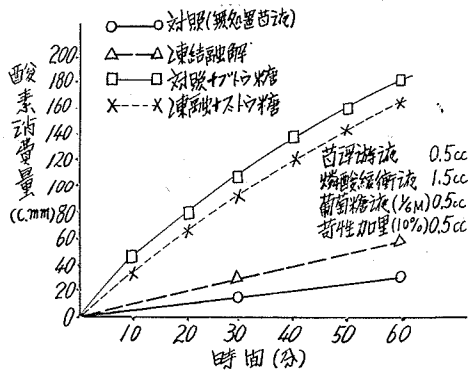
葡萄糖を基質として対照及び凍融菌に加えそれによる葡萄糖酸化酵素系の変動を比較測定した。

結果は第 6 図に示す通りである。

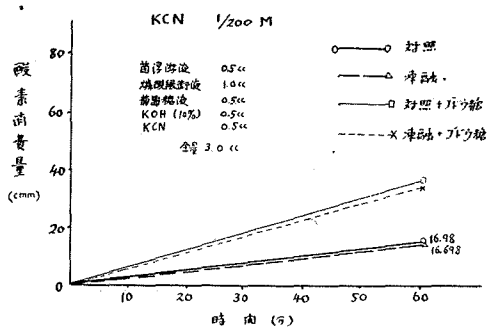
又 KCN を之に加えてその時の呼吸量を加えない場合のそれと比較して，その呼吸阻害を見ると第 7 図の如くなる。

これ等の関係を一括すると第 8 図及び第 3 表に示す如くになる。

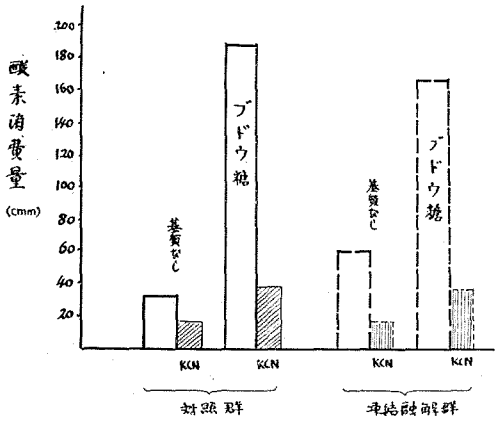
第 8 図は第 6 図の 60 分間に於ける無処置菌及び凍融菌の酸素消費量及び KCN により阻害された時の呼吸量 (60 分値) の比較である。



第 6 圖　葡萄糖を基質として用いた呼吸量の増加度



第7圖 葡萄糖を基質として用いた場合 KCN による呼吸阻害度



第8圖 葡萄糖を基質として用いた場合の無處置(對照)及び凍結融解菌の呼吸増加率と KCN による呼吸阻害率

第 3 表

	基質	酸素消費		KCN を加えた時の	
		量 (c.m.m)	増加率 (%)	酸素消費量 (c.m.m)	阻害率 (%)
對照	(−)	31.00	100	16.98	41.4
	葡萄糖	187.53	604.9	37.50	80.0
凍融	(−)	59.59	100	16.70	71.5
	葡萄糖	166.35	279.2	34.77	79.1

これ等の事から判定するとブドー糖を加えない時の即ち endogenous respiration は対照及び凍融菌の呼吸量は夫々 31.0 及び 59.5 で凍融菌の方が大であるが，等量のブドー糖を基質として加える事により対照及び凍融菌の呼吸量は夫々 185.5 及び 166.3 となり，対照の方が却つて酸素消費量は大となつた。

この成績からブドー糖脱水素酵素は，凍結融解により却つて不活性化されていると考えられる。

ブドー糖脱水素酵素は DPN (Diphospho-pyridinenucleotid) を活性分子とする Co-enzyme I を必要とする酵素であり，この Co-enzyme I と，Apo-dehydrogenase との結合は緩やかで容易にその結合が離れるので，凍結融解によりこの Co-enzyme I (D.P.N) がとれてその為ブドー糖脱水素酵素の作用が減弱し従つて凍融菌の方がブドー糖を基質とした場合対照よりも呼吸量が少くなつたと思われる。

又この場合青酸加里による呼吸阻害作用を見ると対照はブドー糖を加えない時よりも，呼吸阻害率は大となり凍融菌と大体同じ阻害率を示した。

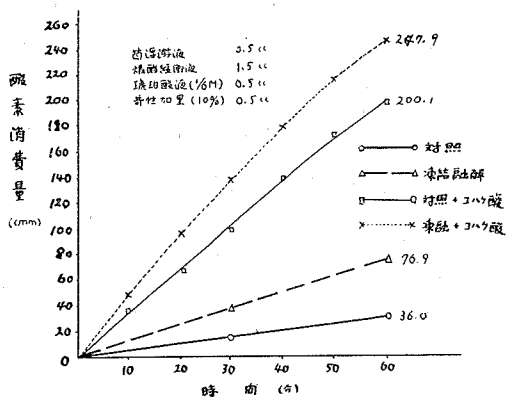
尚第 3 表に於ける酸素消費増加率とは基質を加えない時の呼吸酵素系の酸素消費量を 100% と

した時のブドー糖添加による酸素消費量の増加を百分率をもつて表わしたものである。

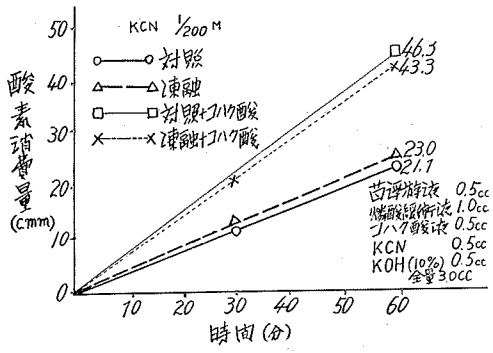
これ等の意義及び結果に関する事柄は後に各基質共一括して考察する。

(2)　琥珀酸を基質として用いた場合の呼吸量の変動

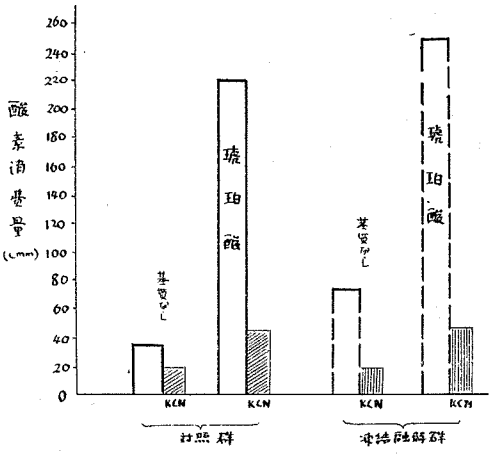
ブドー糖を用いた場合と同様の実験を琥珀酸を基質として用いた場合について行つたのであるが，結果は前項と同じ型式による図表を配列すると，第9，10，11図及び第4表の如くである。



第9圖　琥珀酸を用いた場合の呼吸量の増加度



第10圖　琥珀酸を基質として用いた時のKCNによる呼吸阻害



第11圖　琥珀酸を用いた場合の無處置（對照）及び凍結融解菌の呼吸増加とKCNによる呼吸阻害

第　4　表

	基　質	酸素消費		KCNを加えた時の	
		量 (c.m.m)	増加率 (%)	O_2 消費量 (c.m.m)	呼吸阻害率 (%)
對　照	(−)	36.0	100	21.1	41.1
	琥珀酸	200.1	556.6	46.3	78.9
凍　融	(−)	76.8	100	23.0	70.0
	琥珀酸	247.9	322.4	43.3	82.5

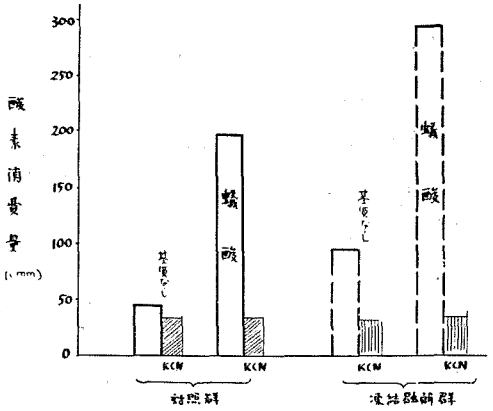
この結果から判定すると琥珀酸を基質として用いた場合はブドー糖の時と異なり，凍融菌は対照と比較して酸素消費量は大である。この事は基質を用いない場合の呼吸量増大と同じ傾向を示す様にもみられる。

即ちこの結果だけを見ると，琥珀酸脱水素酵素は凍結融解によつて，ブドー糖水素酵素の様に破壊乃至は不活性化されなかつたと云う結果を表わす様に思われる。然しこの事についても後に一括して検討を加える。

KCN による呼吸阻害度はブドー糖の場合と同様基質を加えないものより大であり，且つ凍融菌はブドー糖を基質とした場合よりも平均して大であつた。凍融菌の KCN 阻害度はブドー糖の場合にも又この場合にも対照のそれより大であつた。

(3) 蟻酸を基質として用いた場合の呼吸量の変動

同様の実験を蟻酸について検した。酸素消費量の時間的経過は前二者とほぼその型式を等しくするので省略し，60 分間に於ける酸素消費量を基質を入れないもの，入れたもの及び夫々に KCN を加えて呼吸阻害の割合を比較測定した結果は第 12 図及び第 5 表に示す通りである。



第 12 圖 蟻酸を用いた場合の對照及び凍結融解菌の呼吸量と KCN による呼吸阻害

第 5 表

	基質	酸素消費		KCN を加えた時の	
		量 (c.m.m)	増加率 (%)	O_2 消費量 (c.m.m)	阻害率 (%)
對照	(−)	46.0	100	27.6	40.1
	蟻酸	195.9	426	29.4	85.0
凍融	(−)	92.0	100	26.0	71.7
	蟻酸	303.3	297.7	30.4	90.0

この結果から判定出来る事は前の琥珀酸を基質として用いた場合と全く同様である。

唯 KCN による阻害率は対照，凍融菌共前二者より何れも大であつた。

(4) 乳酸を基質として用いた場合の呼吸量の変動

結果は第 13 図及び第 6 表に示す通りである。即ち同じく 1/30 M 濃度の乳酸存在下に於ける対照及び凍融菌の 60 分値の酸素消費量及び KCN を加えた時の呼吸阻害を測定した図及び表である。

この成績も前 (2), (3) の琥珀酸及び蟻酸を基質として用いた場合と同様の傾向を示した。

これ等三つの場合，凍融菌の酸素消費量の絶対値（実測値）が対照のそれより大であつたが，これはこれ等の基質を利用する呼吸酵素系が対照よりもその活性度が増強された為起つた

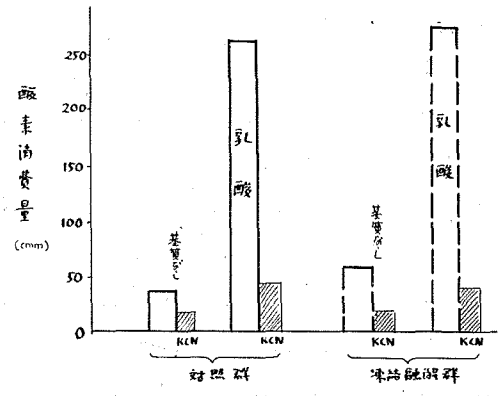
現象であるとは限らない。

これ等の事に対する考察は後に述べる。

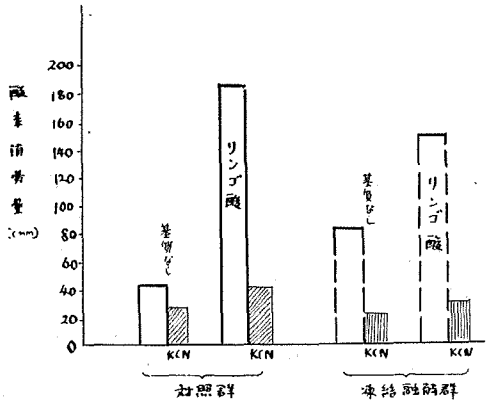
(5)　林檎酸を基質として用いた場合の呼吸量の変動

前と同様の方式に従いリンゴ酸を基質として用いた場合の結果を示すと第14図及び第7表の通りである。

この結果から判定すると，リンゴ酸を基質として用いた場合にはブドー糖の時と同様に却つて凍融菌の方が対照よりも呼吸量は低下する。この事はリンゴ酸脱水素酵素もブドー糖脱水



第13圖　乳酸を用いた場合の對照及び凍結融解菌の呼吸と KCN による呼吸阻害



第14圖　林檎酸を用いた時の對照及び凍結融解菌の呼吸量と KCN による呼吸阻害

第　6　表

	基　質	酸　素　消　費		KCN を加えた時の	
		量 (c.m.m)	増　加　率 (%)	O_2 消費量 (c.m.m)	阻　害　率 (%)
對　照	(−)	36.0	100	20.0	44.5
	乳　酸	257.0	714	46.3	82.0
凍　融	(−)	61.5	100	19.2	68.6
	乳　酸	275.7	448.2	44.1	84.0

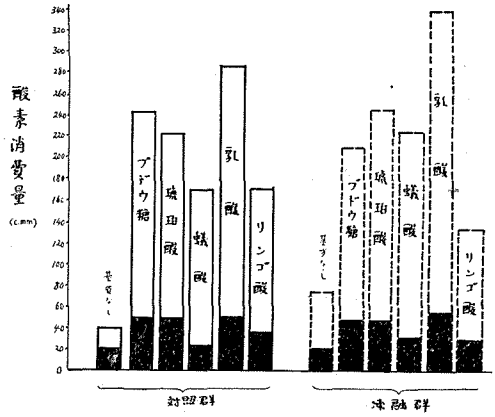
第　7　表

	基　質	酸　素　消　費		KCN を加えた時の	
		量 (c.m.m)	増　加　率 (%)	O_2 消費量 (c.m.m)	阻　害　率 (%)
對　照	(−)	42.0	100	25.2	40.1
	リンゴ酸	183.3	436.4	42.1	77.1
凍　融	(−)	81.8	100	22.1	73.0
	リンゴ酸	148.8	181.8	33.0	77.8

素酵素と同じく DPN を活性分子とする Co-enzyme I を必要とする酵素であるから凍結融解により，これが離れた結果リンゴ酸脱水素酵素の不活性化或いは作用の減弱を招来したものと考えられる。

實驗 IV の總括及び考按

この実験に於ては5種類の基質を用いて，夫々の基質に対する呼吸酵素の反応増進による呼吸量の変動について測定したのであるが，基質を加える事により却つて凍融菌の方が対照よりも呼吸量が減少する場合があり，凍結融解による呼吸酵素系の消長を追求する上に甚だ興味ある成績を得た。



第15圖 各種基質を用いた場合の呼吸量増加の比較

これ等の成績を総合して見ると，第15図及び第8表に示す通りで，これによつて次の様な事が推定出来る。

(第15図に於て陰影をつけた部分は KCN を加えた時の酸素消費量である)。

ここに用いている菌は resting bacteria であるから基質を何も加えない時は，その菌体構成々分或いは菌体内に貯藏された物質を呼吸物質として用い，その酸化還元によつて呼吸を営みエネルギーを得る。即ち endogenous respiration を行つているものであるが

第 8 表

	基質	酸素消費		KCN を加えた時の	
		量 (c.m.m)	増加率 (%)	酸素消費量 (c.m.m)	阻害率 (%)
對照 (無處置)	(−)	40.00	100	23.44	41.4
	ブドウ糖	241.00	604.9	48.39	80.0
	琥珀酸	222.64	556.6	51.40	78.9
	蟻酸	170.40	426.0	25.56	85.0
	乳酸	285.60	714.0	51.40	82.0
	リンゴ酸	174.56	436.4	39.97	77.1
凍結融解	(−)	76.00	100	21.66	71.5
	ブドウ糖	212.19	279.2	44.34	79.1
	琥珀酸	245.02	322.4	42.87	82.5
	蟻酸	226.25	297.7	29.77	90.0
	乳酸	340.63	448.2	54.50	84.0
	リンゴ酸	138.16	181.8	30.60	77.8

これが凍結融解によつてその酸素消費量は生菌の減少にも拘らず増大するのである。この呼吸の増大は前にも述べた様に，呼吸酵素がより活性化された為（或いは菌が死滅しても呼吸酵素の活性度が失われずに残つている為）に起るのではないかと云う仮定の真疑について検討する為に基質を加えた場合の変化を検して見たのであるが，第15図及び第8表でわかる様に，この中ブドー糖及びリンゴ酸を用いた場合には却つて対照より呼吸値が低くなる。

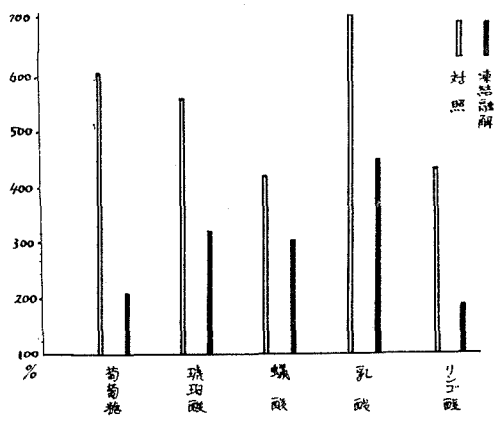
この事は凍結融解によつてたとえ呼吸酵素の活性度そのものが増強されたと仮定しても，ブドー糖及びリンゴ酸脱水素酵素のみは，その活性度が低下しているという事ができる。然しその他の三つの場合，即ち琥珀酸，蟻酸，乳酸を基質として用いた場合は凍融菌の方が対照より呼吸量が大であつた。この五つの脱水素酵素の中ブドー糖及びリンゴ酸は DPN を活性分子とする Co-enzyme I を必要とする酵素であり，他の三つのものは，Co-enzyme を必要としないものである。

この Co-enzyme I と Apo-dehydrogenase の結合はこれ等の脱水素酵素の場合あまり密な結合ではなく，容易にはなれてしまうから，凍結融解という処置により，ブドー糖，リンゴ酸脱水素酵素に於てこの結合が離れた為，その活性度が低下したものと考えられる。

一方琥珀酸，乳酸，蟻酸の場合はその脱水素酵素は，Co-enzyme を必要としないから，凍結融解によつて前二者の様な障害をうけにくいことは考えられるが，だからと言つてこの実験成績から見られる様な呼吸量の大きさだけから，その活性度が増強されたのかどうかわからない。

これについて考察を加えると，今かりに凍結融解によつて菌が死んでも呼吸酵素のみはそのまま活性に残つたと仮定して，又残余の生菌の呼吸酵素も凍結融解により，その酵素能がより活性化されて，その為に全体として酸素消費量が多くなつたものとすれば，基質として利用され得べき物質を加えた場合は，活性度の高い酵素は低いものより，当然それだけ多く利用出来るはずである。従つてこの仮定の上に立つて両者（対照及び凍融菌）に等量の基質を加える事による酸素消費量の増加を比較すると，第8表及び第16図に示す通り基質の如何を問わず，凍融菌の方が対照菌よりも基質添加による呼吸量増加率は小である。

例えば琥珀酸を基質として用いた場合には凍融菌の呼吸量の実測値は対照のそれより大であるが，無処置対照菌が琥珀酸を加える事によりその酸素消費量が 40.0 より 222.6 に増加し約5倍以上の増加を示して居るのに対し，凍融菌の場合は 76.0 の酸素消費量が琥珀酸を加える事により，245.0 となり約3.2倍の



第16圖　各種基質に對する呼吸增加率

増加を示したに過ぎない。従つて上記仮定の上からは，凍結融解により琥珀酸脱水素酵素はその活性度が増強されたと云う事は出来ない。寧ろ却つて低下して居る様な結果を示している。殊にブドー糖及びリンゴ酸の場合は，その呼吸量そのものが凍融菌の方が小であるから勿論であるが，凍融菌の方が呼吸量絶対値の大となる琥珀酸，蟻酸，乳酸の場合でもこの仮定のもとでは呼吸増加の率は少く，endogenous respiration に於ける脱水素酵素は凍結融解により，たとえ障害されないとしても，決して活性度を増しているのではない（寧ろ低下している）と云う事が想定出来る。然しこの事は，後にも述べる様にこの両者の基質添加による呼吸増加率をそのまま比較出来る性質のものではないが，上記の仮定が正しいものとした場合，即ちその可能性について論ずる場合には或程度の意義を持ち且つこの様な凍結融解による脱水素酵素の活性度の増加はないと推定出来る根拠となるものと考える。

又各種基質を加えた場合の青酸加里による呼吸阻害を比較すると何れもその阻害率が大体同じである事（凍融菌の方がやや大）から青酸感性酵素系は基質を加えた場合には，ほぼ同一の感性を示している事が想像される。

凍融菌に於ては基質を加えない場合にも青酸に対する感性が対照のそれよりも大であり，チトクローム系の反応が増大して居るのではないかという想像がなされたが，これは凍融菌のチトクローム系酵素能そのものが凍融によりより活性化されたと云う事ではない。基質を加えた場合，両者の青酸加里に対する感性が大体同じ様になつた事，基質を加えない場合の対照の青酸感性が低く，凍融菌のそれが大であつた事は，次の様な考えに暗示を与える様に思う。今例をとつてブドー糖を基質として用いた場合について考えると，対照菌は何れも基質を加えない時の KCN 阻害率は平均 41.4% (湿菌量 50 mg/cc の時) であつたが，ブドー糖を加える事により，脱水素酵素及びそれ以下の呼吸酵素ひいてはチトクローム系の反応が盛となり，その為に KCN に対する感性が大となり，従つてその阻害度が増加して 80% になつたものと考えられる。凍融菌は基質を加えない場合も KCN による阻害は平均 71.5% であつたが，ブドー糖を加える事により 79% になつた。この事は凍融菌に於ては，始めから青酸感性酵素系の反応が盛であつて，殊にブドー糖脱水素酵素の活性度の減弱によつてブドー糖添加後も呼吸酵素系の反応速度は，それ程大とならず従つて青酸による阻害率があまり増加しなかつたものと考えられる。この様に青酸に対する感性の上から見ると対照菌の青酸感性が基質を加える事により，凍融菌のそれに近い値を示す様になつた事や凍融菌に於て基質を加えない場合にも青酸感性が大であつた事等はチトクローム系の反応が大となつた為とも想像出来るが，この事はこれ等の酵素系そのものの活性度が凍融と云う条件により増強したのではなく（対照の場合は勿論活性度は同じである）何か凍融菌に於て基質となるべき物質の存在或いは他の助酵素の遊離等を暗示する様に考えられるが，これについては更に後の実験で検討する。

又，琥珀酸，蟻酸，乳酸を基質に用いた場合は，その増加の割合が少いとは言つても，兎に角対照のそれより呼吸量が大であつた事は他の原因が含まれているのかも知れなく，これが

endogenous respiration の増大と同一の機序にもとずくものであるか否か，これ丈の成績及び推論からは断定出来ず更に検討を要する。

これ迄の実験では生菌も死菌も含めた全体としての呼吸酵素についてのみ論及したもので，これ等のもの個々がどうなつているかはわからないが，唯ブドー糖及びリンゴ酸脱水素酵素のみは凍結融解によつて破壊乃至は減弱されたと云う事が出来る。

實　　驗　V

死菌についての呼吸量測定

これ迄の実験成績から知られる様に，凍結融解の結果生じた生残菌と死菌との関係，特に夫々の呼吸酵素の活性度と言う事が今問題となるわけであるが，生菌と死菌とを完全に分離して比較測定する事は不可能であるから色々の処置による死菌について，その呼吸能を検索しそれから推し進めて凍結融解の場合に及ぼそうと考えてまず次の様な処置による死菌について酸素消費量を測定した。

(1) 酸 処 置 死 菌

菌浮游液に濃度1Mになる様に醋酸を加え，之を120時間放置し（冷藏庫保存）苛性曹達で中和し，更に蒸溜水で3回遠沈洗滌して無処置対照と等濃度の浮游液を作つた。（生菌は認められない）その一部を前記方法に従い，液体空気にて凍結更に融解し，無処置対照及び醋酸処置菌，更に醋酸処置後凍結融解した3種の菌についてその呼吸量を測定比較した。

結果は醋酸処置による死菌は凍結融解の有無に拘らず，すべて酸素消費は全く認められなかつた。又更に之等醋酸処置菌に乳酸（最終濃度1/30 M）を基質として加えて測定した結果も同様，この醋酸処置死菌には全く酸素呼吸能は見られなかつた。

(2) 加 熱 死 菌

菌浮游液を試験管に入れた儘100℃10分間加熱し，培養試験により生菌の発育しない事を確認して(1)の場合と同様凍結融解したものを，無処置の対照と同時に酸素消費量を測定したが，これも前と同様，100℃10分間加熱死菌には酸素消費能は全く見られなかつた。

(3) その他アルカリ処置による菌も前二者同様培養によつて生菌が認められない場合には酸素消費量は全く認められなかつた。

従つてこれ等の処置により死んだ菌には菌体の生死に関係のない酵素の酵素能は残存しているかも知れないが，酸化還元性酵素に限つては（ここで言う呼吸酵素は呼吸酵素系を形成する複雑な連環の中一つだけが，仮令残存しても，このサイクルが満足に運営されない限り，Warburg の検圧計には酸素消費作用として現われて来ない）全く認められず，菌の生命と運命を共にしたと考えられる。

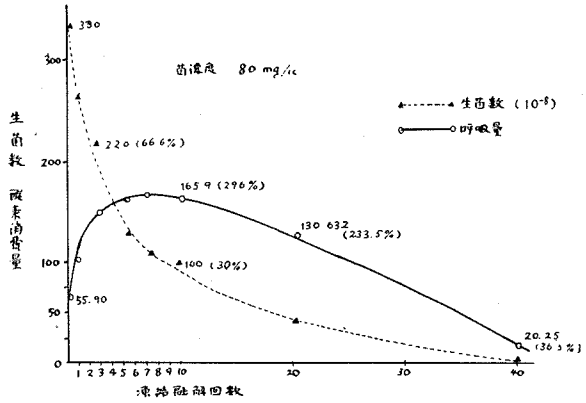
實 驗 VI

凍結融解を反覆施行した場合の菌の呼吸量の変動

各種処置による死菌の場合は呼吸酵素の消滅を確認出来たが，前述の Ncrd 或いは Gard の発表した様に凍結融解により（菌は死んでも，又死ななくても）呼吸酵素はそのまま残存或いは活性化されるものかどうかを検する為に，液体空気を用い急速な凍結及び融解を何回もくりかえしてその結果，呼吸酵素系に及ぼす影響について検索した。今迄の実験は凍結融解1回のみのものについて検討したものであるが，之を1回以上40回迄のものにつきその酸素消費量の消長を測定した。

尚実験Ⅰに於て考察した様に菌液の濃度により凍結融解による障害がやや異なると思われるので，凍結条件は勿論，今迄通り最も障害大と思われる急速且つ極低温の液体空気による凍結を行い濃度は湿菌量 80 mg/cc と 25 mg/cc の二つに分けて観察した。

湿菌量 80 mg/cc の場合の凍結融解の回数による酸素消費量の変動は第17図及び第9表に示す如くである。



第17圖 凍結融解を反覆施行した場合の生菌数及び呼吸量の變動

第17図及び第9表に於て見られる様に凍結融解による影響はその生菌の死滅率に於ては，回を増す毎に多くなるが，酸素消費量は一定回数（この場合は7回）を最高としてそれ迄は回を重ねる毎に増加するがそれ以後は，段々減少して40回に到る時はその酸素消費量は著しく減少する。

菌液の濃度が薄い場合は凍結融

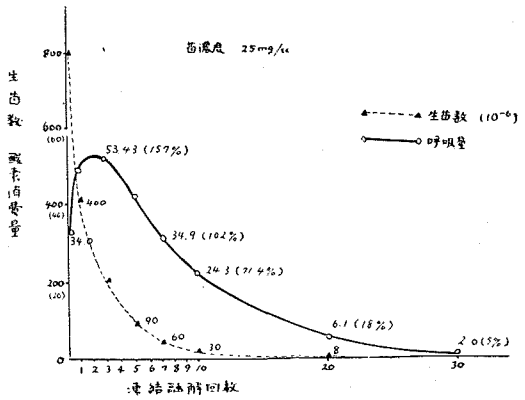
第 9 表

	凍融回数							
	對 照	1回	3回	5回	7回	10回	20回	40回
生菌数% (生殘率)	100	78.7	66.6	37.8	33.3	30	13	1.3
呼吸量 (c.m.m)	55.9	103.7	148.7	161.7	167.9	165.9	130.6	20.2
呼吸量百分率%	100	185.4	265.9	289.1	300.5	296.6	233.5	36.5
單位生菌数に對する呼吸量	1	2.3	3.9	7.6	9.0	9.9	18.0	28.0

解による影響が更に大となり，第18図及び第10表に示す如くなる。

第18図及び第10表は菌量 25 mg/cc の時の結果である。

第18図の縦軸は生菌と酸素消費量を一緒にとつたので( )内の方が酸素消費量(c.m.m)を表わす数字である。又第17図及び第18図共曲線上に書いた( )内の数字は対照を100%とした時の百分率である。



第18圖　凍結融解を反覆施行した時の生菌數と呼吸量の變動

この2図及び2表により判定される事は，凍結融解による影響は生菌数及び酸素消費量ともにその割合は異なるが大体同一の傾向を有し，生菌数は凍融回数を増す毎に減少し又酸素消費量は一定回数迄は益々酸素消費量は増大するが，それ以後は段々減少して遂には殆んど酸素消費が見られなくなることである。

第　10　表

	凍融回数							
	對　照	1回	3回	5回	7回	10回	20回	40回
生菌數% (生殘率)	100	50	25	11.2	7.5	3.7	1.0	—
呼吸量 (c.m.m)	34.0	48.0	53.4	42.5	34.2	24.3	6.1	2.0
呼吸量 百分率%	100	141.3	157.1	125.0	102.7	71.4	18.0	5.8
單位生菌數に對する呼吸量	1	2.8	6.3	11.1	13.7	11.3	18.0	—

この事から凍結融解により菌は障害をうけて，段々その生菌数が減つてゆく。即ち凍結融解は生菌にとり致死的な障害条件である。それにも拘らず呼吸量は反対に一定回数迄は増大する。然し無限に増大するのではなくて一定回数以後は逆に生菌の減少と共に呼吸量も減少してゆく。即ち凍結融解により，菌の呼吸酵素は障害をうけて，且つそれが非常に大きくなると呼吸酵素は全く不活性化されて遂にはなくなつてしまうと云う事が云える。

然し呼吸量がこの様な消長を示すのは如何なる機序に基くものであろうか。少数回数の凍結融解は呼吸酵素の活性度を増大するが，頻回々数では不活性化が起るのであるとも考えられるが，それよりも一定回数以上の凍結融解によると呼吸量の増加が停止して，生菌の減少と共に酵素能も減少してゆき遂には生菌の消滅と共に呼吸能も消滅する事から前実験に於ても証明されたと同じ様に，凍結融解によつて死んだ菌には呼吸能は認められないと考える事が出来る

と思う。(もし死んだ菌にも呼吸能があるとすれば，この曲線は下降せずに同じ値を示してゆく筈である)。

従つて呼吸量増大が生菌のみに原因があると考えられるわけであるが，然し今この生菌丈について考えて見ると，単位生菌数に対する呼吸量は同じ表に示す様に凍結融解の回数を増すに従つて増加している。しかもその増加の割合はほぼ直線的であるから，恰も凍融回数に比例して生菌の活性度が増大している様に見えるが，然し前述の基質添加による実験成績でも凍融菌の呼吸酵素の活性度増強と云う事は認め難かつたので，むしろ前に一寸触れた様に，凍結融解によつて生じた死菌体自身又は死菌体から遊離された物質（基質の如き物質，或いは助酵素）によつて呼吸が促進されるのではないかと云う事を考慮する必要がある。

この実験からは頻回凍融を行つて死滅した菌には他の処置による死菌と同様呼吸能が認められなくなることはわかつたが，生残つた生菌の酵素能については更に吟味をせねばならぬ。

實　　驗　VII

凍結融解菌浮游液の遠心上清に就いての実験

凍結融解により呼吸量が増大する事は，菌が死んでもそれのもつ何か呼吸を促進する物質或いは酵素そのもの（40 回位の凍融をくり返した時には無くなる事は，前実験に於て証明した）が遊離してくる為ではないかと考えて実験 VI 迄の結果から想定される呼吸量増加をもたらす因子を順次分析的に追究する為に，まずメヂウム中に何か呼吸を促進する様な物質が証明されないかと考えて検討して見た。即ち次の様に凍結融解をした菌液を遠心沈澱し，菌体を除去した浮游液上清について実験を行つた。

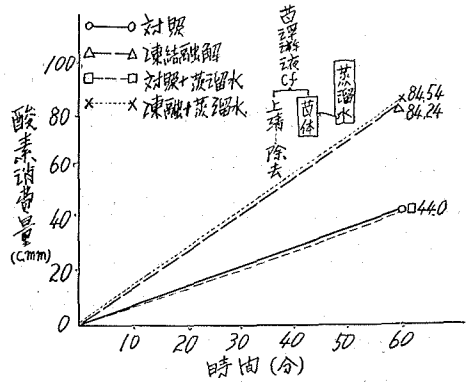
(1)　凍結融解菌浮游液遠心上清のみの呼吸

凍結融解（液体空気による凍融 1 回）をした菌浮游液を無菌的に 8000 r.p.m, 30 分間遠心沈澱し，菌体を除去した上清について Warburg 検圧計により同様の方法にて呼吸量を測定した。

結果は対照の蒸溜水と同様全く酸素消費は見られなかつた。即ちこの上清は，少くともそれのみでは酸素を消費する様な呼吸酵素は遊離して居ない事を確認した。従つて呼吸酵素は菌体にのみ従属するもので，菌体に何等かの原因があるわけである。

(2)　凍結融解菌浮游液の遠心上清を蒸溜水で置換した場合の呼吸

凍結融解菌浮游液を遠心沈澱した上清そのものには酸素消費能はないが，菌体に働きかけ



第 19 圖　對照及び凍結融解菌液の上清を蒸溜水で置き換えた場合の呼吸量の變化

る何か促進的物質の存在は考えられるので凍融菌液遠心上清を棄て去つて代りに蒸溜水を加えて前と等濃度になる様に浮游液を作り無処置の対照にも同様の事を行つて，酸素消費量を測定した。結果は第19図に示す如くである。

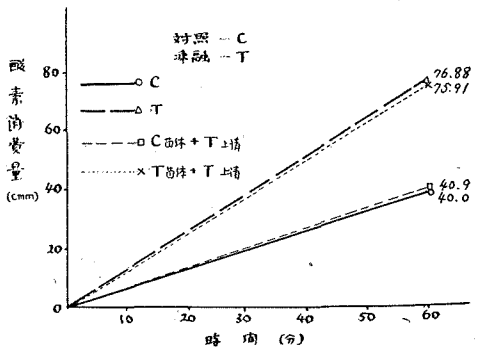
これによつて明らかなように，凍融菌はその浮游液を洗い去つて蒸溜水に変えても，その酸素消費量は何等変らなかつた。

この事は凍結融解により，呼吸酵素の活性度を増強する様な物質は遊離して来ないと云う事を意味する（少くとも遠心沈澱による上清には)。

(3)　対照及び凍融菌浮游液の遠心上清を互いに他と交換した場合

(2)に於ける実験を更に進めて，もし凍結融解により何か呼吸を促進する様な物質が遊離すれば，これを無処置の対照菌に加えた場合同様の呼吸量増大を見るわけであるから，これを確める為に，凍融菌液の遠心上清を対照菌体に加え，対照菌液の遠心上清（メヂウム即ちこの場合は蒸溜水である）を凍融菌体に加えて夫々もとと等濃度の菌液を作り，その各々について呼吸量を比較した。

即ち対照菌を C (Control)，凍融処置菌を T (Treated by freezing and thawing) にしあらわせば，(C 菌体＋T 上清) と (T 菌体＋C 上清) を夫々 C 及び T と比較して見た所，結果は第20図に示す如く殆んど変りはなかつた。



第20圖　對照及び凍結融解菌液の遠心上清を互いに他と交換した時の呼吸量の變化

第20図に於て明らかな如く，凍結融解をした菌液の遠心上清を対照(無処置)菌に加えても，その酸素消費量が殆んど変化なく僅かの増減は見られても凍融菌の呼吸量と同じにならなかつた事から凍結融解による菌の呼吸量増大は呼吸促進物質がそのメヂウム中に遊離するために起つた現象でないと云える。

(4)　反覆凍結融解をした菌液の遠心上清を加えた場合

同様の実験を凍融を何回もくり返した菌液の上清について無処置菌に加えて，実験を行つたが，何れも酸素消費量の増加はあまり見られなかつた。

(5)　凍結融解菌浮游液を 37°C 30 分間恒温槽にて振盪後，その遠心上清についての実験

これ迄の実験では菌浮游液を Warburg 檢圧計にて酸素消費量を測定する前に，その遠心上清をいろいろと組合せたものであるが，Warburg 檢圧計の 37°C の恒温槽中で振盪する間に何かメヂウム中に呼吸を促進する物質が浸出するものがあるのではないかと考えて，凍結融解した菌液を 37°C の恒温槽中で 30 分間振盪した後，(3) と同様の方法で遠心上清について実験を試みて見た。

結果は (3) の場合と全く同じで，凍結融解により菌液のメヂウム中には（遠心沈澱による

上清では) 呼吸を促進する様な物質は遊離せず, 之を無処置菌に加えても, 呼吸増加は殆んど見られなかつた。

以上の事を総合して凍結融解による呼吸量増加の原因は凍融菌そのものにあり, メヂウム中に呼吸促進物質が遊離された為に起るのではない事を再確認出来た。

実験 VI 及び VII によつてわかる様に Nord 或いは Gard の観察した様な酵素の活性化, 或いは菌死滅後も酵素のみが active に残ると云う様な事実は凍融菌の呼吸酵素系全体については認めがたい。又酵素ではなくても呼吸を促進する様な物質がメヂウム中に遊離した為に, 呼吸増大が起つたのではない事も確からしい。

要するに凍結融解の結果呼吸を増大させる因子として考えられるものは, 1) 上清, 2) 死菌, 3) 生菌の三つのいずれかであるが, この中, 1) の上清については上清そのもののみには酸素消費能はないこと, 又之を生菌に添加しても呼吸量増加はない事を証明した。

2) の死菌についても各種処置及び頻回凍結融解による死菌には酸素消費能のない事を確め得た。従つて残るのは生残した生菌がどの様な態度をとるかと言うことであるが, これについて考えられる事は, i) 生菌 (凍結融解により生き残つた) の有する呼吸酵素が正常菌のそれより活性度が増しているからか, ii) 或いはその他の未知な機序によるものかである。i) については今迄再三検討した処で, ある酵素 (例えばブドー糖, リンゴ酸—脱水素酵素) では却つて活性度が減弱している事を認めたが, その他のものでは未だ断定は出来ないが, 唯チトクローム系酵素等は見かけ上その反応が盛になつている様に思われる。これ等の点については更に検討を加えなければならない。

實　　驗　VIII

今迄度々考察を加えた様に, 凍結融解により生き残つた菌のみが酸素消費能を有し, 一方死菌のみでは酸素消費を示さないとしても生菌と死菌が混在する時, 死菌の存在が生菌の呼吸能に対して, 何らかの影響を及ぼしてはいないかと云う事が考えられる。今迄の実験では死菌及び上清を別々に分けて観察したが, 凍融菌液には生菌と死菌とが混在しているのであるから, 今度は生菌のみの対照 (無処置菌) に凍融菌液を加えて生菌に対する死菌の影響の有無を種々検討してみた。

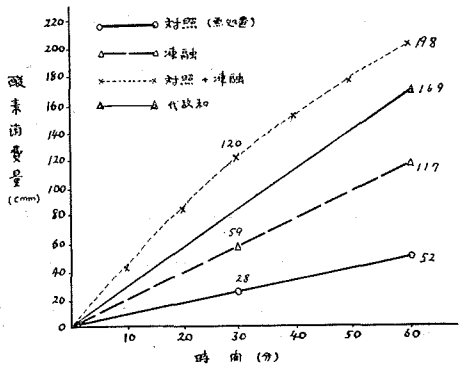
即ち無処置生菌のみのもの (対照), 凍融菌のみのもの, 対照と凍融菌を加えたもの, 及び比較として対照菌及び凍融菌を夫々, 2倍量用いたものについて夫々の呼吸量を比較測定した。

対照を C, 凍融菌を T にて表わせば

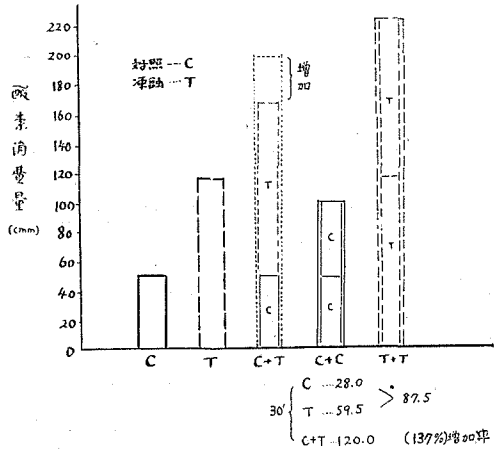
1) C, 2) T, 3) C+T, 4) C+C, 5) T+T の5つの組み合せになる。

その容器内組成は次表の通りで, 全量はそれぞれ 3.0 cc である。

	1)	2)	3)	4)	5)
菌浮游液	C 0.5 cc	T 0.5 cc	C 0.5 cc T 0.5cc	C 1.0 cc	T 1.0 cc
燐酸緩衝液	2.0 cc	2.0 cc	1.5 cc	1.5 cc	1.5 cc
苛性加里	0.5 cc	0.5 cc	0.5 cc	0.5 cc	0.5 cc



第21圖　對照と凍結融解菌とを加えた場合の呼吸量



第22圖　對照，凍結融解及び兩者を加えた時の呼吸量の比較 (60分値)

結果は第21図，第22図及び第11表に示す通りである。

この結果から判定すると，対照の呼吸値は60分間の酸素消費量が52.0で，凍融のそれは117.2であつた。C+C及びT+Tの場合は夫々2倍量を用いたのであるから酸素消費量も，101.0及び132.0と約2倍の酸素消費量を示したのに対して，対照と凍融菌を加えた場合 (C+T) は52+117.2=169.2となるべきものが198.0となつて夫々の和よりも増加しその割合は1：1.17で17%増加した事になる。

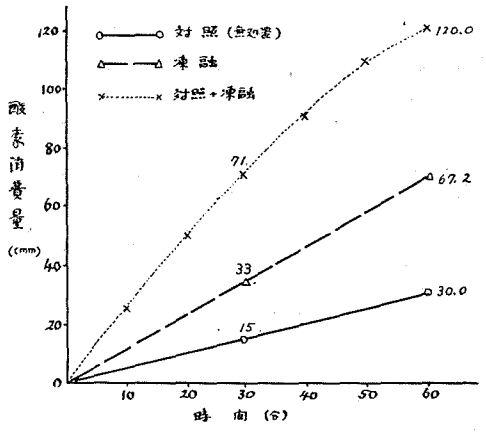
第　11　表

		C	T	C+T
30分値	O_2 消費量 實測値	28.0	59.5	120
	代数和	28+59.5=87.5		
	増加率	100%		137.1%
60分値	O_2 消費量 實測値	52.0	117.2	198.0
	代数和	52+117.2=169.2		
	増加率	100%		117%

30分の時の割合は更に大で，37% の増加を示している。この増加は菌液の濃度が薄い場合，殊に30分位の間に於て特に著しく，この事が実験誤差ではなく意義のある増加である事を認める為に更に薄い濃度に於ける実験値を示せば，第23図及び第12表の如くである。

この場合にも前と同様の結果で対照菌に凍融菌を加えると夫々の酸素消費量は，30分では47.9%，60分では23.4% 増加した。この事は毎常必ず見られた現象で実験誤差ではない。

これ等の結果から判定出来る事は，凍結融解による呼吸量増大と云う現象は今迄の実験に



第23圖 對照，凍結融解及び兩者を加えたものの呼吸量の比較

第 12 表

		C	T	C+T
30分値	O_2 消費實測値 (c.m.m)	15.0	33.7	71.6
	代 數 和	15+33.7=44.7		
	增 加 率	100%		147.9%
60分値	O_2 消費實測値 (c.m.m)	30.0	67.2	120.0
	代 數 和	30+67.2=97.2		
	增 加 率	100%		123.4%

より，その呼吸を営んでいるものは生き残つた生菌のみであるから，もし凍融により何か呼吸を増加させる因子があるとすれば，それは当然この生菌についてのみ作用さるべきものであり又この実験が暗示する処からも死菌を混在する凍融菌液の呼吸量増大は何か死菌が生菌に作用するのではないかとの考えが生れて来る。

結局これ迄の実験によつて生き残つた菌の呼吸酵素のあるものの活性度が増した為か，死菌が呼吸に関与して（例えば丁度基質の様な役割を果すことにより）呼吸増大の因となつているのか，この二つに限定されたわけである。

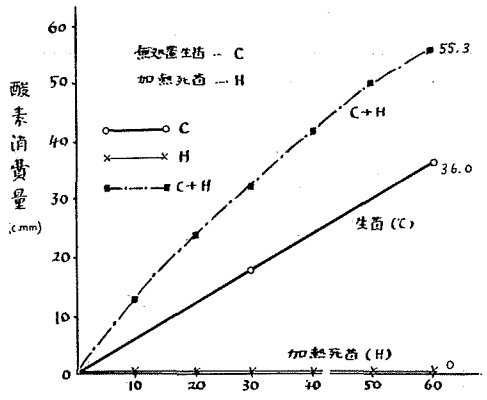
實　　驗 IX

死菌添加による生菌呼吸量増加に関する実験

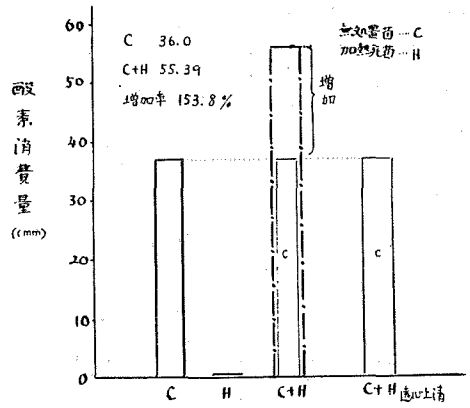
前実験に於て無処置菌に凍融菌を加えた場合にはその混合菌液の呼吸量は（無処置菌の呼吸量）+（凍融菌の呼吸量）の和よりも増加する事が認められ，これは恰も凍結融解により呼吸量が増大する如く，死菌の混在する凍融菌を加える事によりこの中の死菌が生菌に何か影響を及ぼした為ではないかと考えられるので，更に実験を進めて色々な条件による死菌乃至は破壊した菌体を正常の菌に加えてその呼吸量の変動を測定した。

(1) 加熱死菌による実験

A) 菌液を 100°C 5 分間加熱しこの菌液を無処置の正常菌に加え，その場合添加による呼吸量の増大の有無を検した。結果は第 24 図及び第 25 図に示す通り，100°C 5 分間加熱した菌には全く酸素消費は認められなかつたにも拘らず正常菌に加熱菌を添加する事により 36.0 の酸素消費量が 55.3 に増加した。その割合は正常菌を 100% とした場合，153% であつた。正常菌を C，加熱菌を H (heated) とすれば H= 0 であるに拘らず，C+H>C なる結果を得た。尚 H の遠心上清を C に加えた場合には呼吸量の変化はなかつた事から，此の場合，無処置生菌が加熱死菌の菌体そのものを何等かの形に於て利用し，その為に呼吸酵素の触媒反応が盛とな



第24圖　加熱死菌を加えた場合の生菌呼吸量の増加



第25圖　加熱死菌を加えた場合の呼吸増加 (60分値)

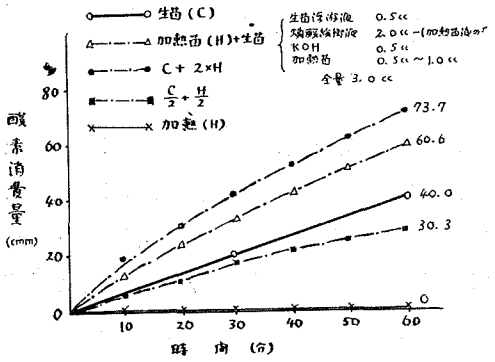
り，酸素消費量が増大したと考えざるを得ない。

この場合，正常菌の呼吸酵素そのものは，凍融菌液中の生菌の様に呼吸能増強の疑いはないわけであるから，その正常菌の呼吸が増大したと云う事は死菌の存在が影響して，正常菌の酵素作用を促進した為で，呼吸酵素の活性度の増強では勿論ない。

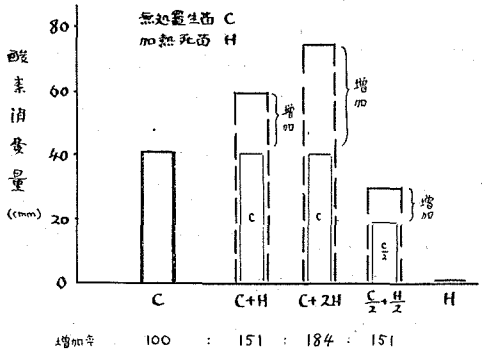
B) 加熱菌を加える量的変化による呼吸量の増加

加熱菌を加える事により，生菌の呼吸量が増大する事は認められたが，これは生菌が加熱死菌を利用することによつて呼吸が増大するのであれば，その添加する量を多くするほど呼吸量が増加しなければならない。これを検する為に同じく100°C 5分間加熱した菌の量を変えて0.5 cc, 1.0 cc，及び生菌を1/2量にし加熱菌を0.25 cc加えたものについて夫々呼吸量を測定した。結果は第26図及び第27図に示す通りである。

これ等の図より明らかな如く，加熱菌自身には酸素消費能は全く見られないにも拘らず，生菌にこれを加える事によつて，又加える量が多ければ多い程，生菌のみの呼吸量より，その



第26圖　加熱菌を加える量的變化による呼吸量増加の割合



第27圖　加熱菌を加える量的變化による呼吸量増加の割合 (60分値)

値が増加する事を認めた。

この増加する割合は生菌の濃度にも影響して異なる値を示すが，等量及び2倍量加えた場合の呼吸量の百分率は夫々正常菌に対し，平均151.6% 及び184.4% であつた。

この様に加える加熱死菌の量を増すに従い生菌の呼吸量が増大する事は，この生菌が死菌体を何等かの形で利用するものである事を更に証明しているものと思う。

然し生菌の量を1/2にした場合には，死菌を加えると対照の生菌の呼吸量の1/2より大きくなるが，生菌1の呼吸量より少い。

C) 無処置生菌と凍融菌の加熱菌添加による呼吸量増加の割合

次に凍融菌と無処置の対照とについて加熱菌を添加する事による呼吸量増加の割合を比較測定した。

即ち前と同様に100°C 5分間加熱して酸素消費の全く認められない死菌を用い，之を対照と凍融菌（勿論対照と等濃度，等量のもので，唯凍結融解をしたもの）に夫々等しい量 (0.5 cc) を加えて酸素消費量を測定し60分値で之を比較すると，正常菌に加熱菌を加えた場合はB) に於ける結果の様に酸素消費量の百分率は，加熱菌を加えないものを100% とした時平均151.6% で51.6% の増加を見たが，凍融菌に加熱菌を加えた場合は平均118.6% でその増加率は正常菌のそれよりも少なかつた。

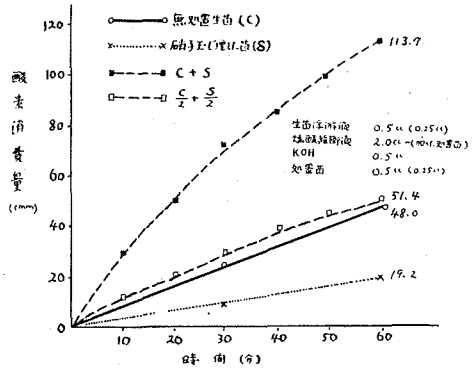
勿論凍結融解により，ある変化をうけているのであるから，この増加率を比較して，そのまま酵素の死菌体利用の度合を云々する事は出来ないし，ここに云う百分率も菌濃度によつて異り，又凍融菌もその時の条件により酸素消費量が異なるので，従つて加熱菌を添加した場合の増加率も当然異つて来るものであるが，平均して正常菌の方が加熱菌添加による増加の割合は凍融菌のそれより大であつた。

Sample は同じでも生菌数が異るので何とも云えないが，生菌が死菌を利用すると云う假定のもとでは，生菌数の多い方が利用度が高いかも知れないが，加熱菌添加による呼吸量増加の割合が，正常菌より凍結融解菌の方が小さいと云う事は凍融菌中の生菌は凍結融解によつて呼吸能が増加するものではなく，寧ろ低下している事を間接に証明していると思う（増加しているなら同じものを加えた場合増加率は大となる筈である）。

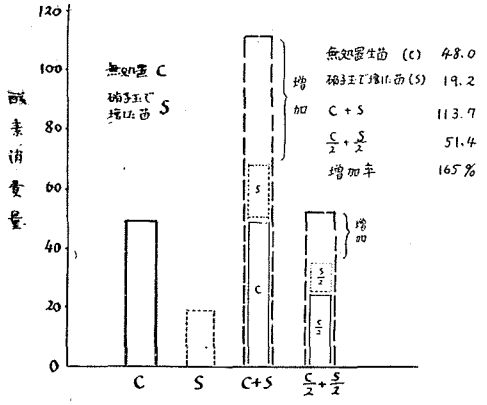
(2) 硝子球と共に振盪して破壊した菌を用いた場合

加熱菌の代りに菌液を無菌的に硝子球を入れたコルベンに入れ約2時間振盪して破壊したものを，3000 r.p.m 30分間遠心沈澱し，その上清を更に8000 r.p.m 30分間遠心して沈澱した菌体を集め之を蒸溜水に浮べて菌液を作り，(1) に於ける加熱菌の場合と同様の実験を行つた。即ち無処置正常菌にこの処置菌の色々な量を加えて呼吸量を測定した結果は，第28図及び第29図に示す如く加熱菌の場合と同様に呼吸量増加を見た。

正常菌をC，硝子玉で破壊した菌をSをもつてあらわし，C/2 及び S/2 は量的の割合を示す。結果は加熱菌の場合と同じくこの破壊菌の量を増せば増す程正常菌の呼吸量は増加し，こ



第28圖　硝子球と共に振盪して破壊した菌を用いた場合



第29圖　硝子球と共に振盪して破壊した菌を用いた場合

の破壊菌を利用して増加する事が推定出来る。

この場合の呼吸量の増加率は加熱菌の時より多く対照を100とした時平均165であつた。

なおこの菌は完全に死滅しているわけではないので，処置菌だけでも多少の酸素消費は認められた。

(3)　反覆凍結融解を繰返した菌を用いた場合

実験VIIでは凍結融解を何遍も繰り返して行うと，一定回数迄は呼吸量は増加するが，その後は段々呼吸量は少くなり，特に菌濃度の低い場合は，急速に低下して30～40回の凍結融解を行つた場合には殆んど酸素消費は認められなくなる事を実証してあるので，この様な菌を用いて(1)，(2)と同様の実験を行つた。

若し凍結融解による呼吸量増大は生き残つた菌が死菌体を何等かの形で利用するものとすれば（例えば恰も基質の如くに），正常菌に反覆凍結融解を行つた菌を加えて，その呼吸量増大の有無を検する事は凍結融解菌液とほぼ同一の条件のモデルを作ることであつて，これによつて呼吸増加の機序が明らかにされるのではないかと考える。

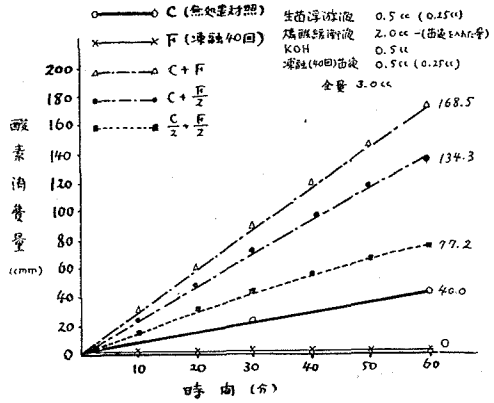
実験は液体空気で40回凍結融解を行つて殆んど酸素消費の認められない菌液を用い，之を無処置の正常菌に前と同様に色々な量を加えて，その呼吸量を測定比較した。

無処置菌をC，凍結融解を40回くり返したものをFで表わせば

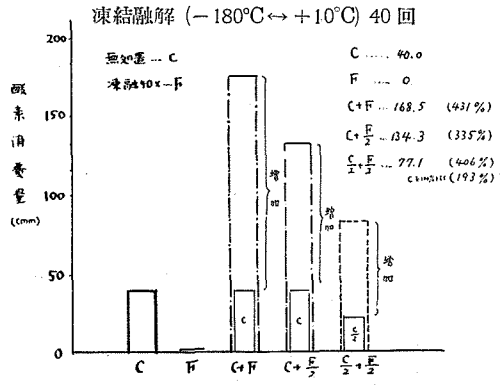
1) C，　2) F，　3) C+F，　4) $C+\frac{F}{2}$，　5) $\frac{C}{2}+\frac{F}{2}$ の各々の場合について測定した。

即ち容器内組成は

	1)	2)	3)	4)	5)
菌浮游液	C 0.5 cc	F 0.5 cc	C 0.5 cc+F 0.5 cc	C 0.5cc+F 0.25cc	C0.25cc+F0.25cc
Buffer	2.0 cc	2.0 cc	1.5 cc	1.75 cc	2.0 cc
KOH	0.5 cc	0.5 cc	0.5 cc	0.5 cc	0.5 cc



第30圖 反覆凍結融解を繰返した菌を用いた場合



第31圖 反覆凍結融解を繰返した菌を用いた場合

全量 3.0 cc である。結果は第 30 図及び第 31 図に示す如くである。

第 30 図及び第 31 図より生菌 (C) に酸素消費の全くない凍結融解 40 回行つた菌 (F) を加える時は，その添加する量の多い程，呼吸量は増加し，その百分率をとると，C を 100% として，$C+\frac{F}{2}$ は 335%，C+F は 431% となる。又この場合には加熱死菌及び磨砕死菌と異り生菌が $\frac{1}{2}$ の場合でも F を加える事により，呼吸量は増大し対照 (C) の $\frac{1}{2}$ を 100% とした時は 406%，生菌 (C) 呼吸量全部を 100% とした時でも 193.1% となつて，生菌のみの呼吸量より遙かに大であつた。

この結果から凍結融解をした場合の呼吸量増大は，凍融による死菌が残余の生菌の呼吸酵素系に対し恰も基質の如く利用される為と考えられるが，特に加熱菌等の場合は熱凝固による変性のため，死菌体はあまり利用され難いものであるのに反し，凍融の場合には非常に利用され易い形のものである事がわかる。しかもこの場合の生菌の呼吸酵素は正常菌そのものの呼吸酵素であり，それに凍融死菌を加える事によつて起る呼吸量増大は丁度基質を添加した場合と同じ機序によるものと考えてさしつかえないであろう。又実際の凍融の場合の生菌数は少くなるにも拘らず，呼吸量が増大するという事実は，本実験の $\frac{C}{2}+\frac{F}{2}$ の場合の様に生菌数が半分でさえ．死菌添加により原生菌の呼吸量より増大する事からも説明される。

實　　驗　X

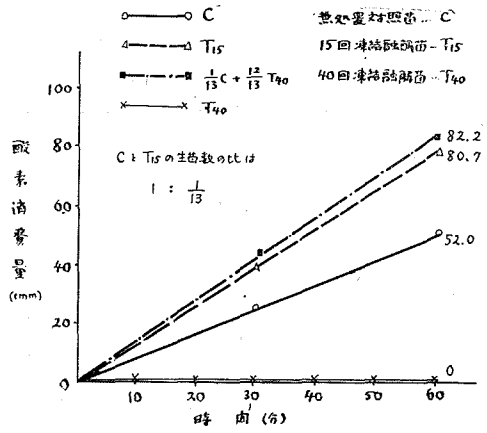
凍結融解による生菌数と呼吸量の関係

前実験に於て考察を加えた様に，凍結融解により生き残つた菌が死菌を利用する為に呼吸量が増大する事は明らかとなつたが，その増加の割合を決定するものは生菌と死菌との比であると考える。故に凍結融解による菌の生残数を測定し，それと同様の生菌に凍融をくり返して死滅した菌を加える時は該菌液の凍結融解を行つたものと同じような条件のものを作る事が出来る。即ち人工的に凍結融解の model case を作る事が出来るわけで，これと自然の凍結融解

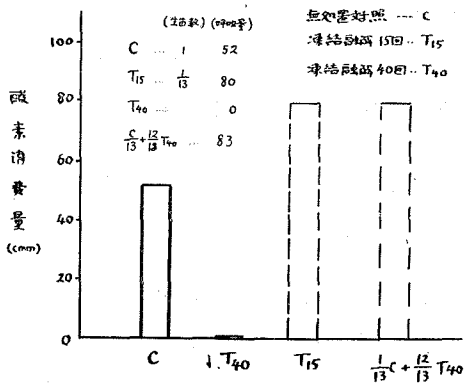
による菌の呼吸量とを比較すれば，その呼吸量増加の機序及び生残した菌の呼吸酵素系の活性度を正常菌のそれと比較出来るわけである。この関係を知ろうとして次の様な実験を行つた。

即ち凍結融解を一定回数を行い，その時の生菌数を測定する，一方この菌液を40回凍結融解させて，酸素消費は認められない凍融菌浮遊液を作る。前者の生菌数と同数の生菌をとつて，これを後者に加えて原菌液と等濃度の菌浮遊液を作る（これは凍融を一定回数行つた菌液と同じ要素を含む菌液である)。これと原菌液との呼吸量を比較測定した。

第32図及び第33図に示すものは凍結融解15回行つたものについて測定した結果である。即ち無処置対照菌 (C) を15回凍結融解したもの (T_{15}) の生菌数を測定した結果，T_{15} は C の $\frac{1}{13}$ であつた。従つて C の13倍稀釈菌液1容量に対し，40回凍融菌液 (T_{40}) 12容量を加えて T_{15} 菌液と等濃度の菌液を作りこの $\left(\frac{1}{13}C+\frac{12}{13}T_{40}\right)$ と T_{15} の呼吸量を測定比較した。



第　32　圖



第　33　圖

結果は図に示す通り殆んど同じ値を示した。即ち対照 (C) の酸素消費量は52.0で凍融15回の菌 (T_{15}) の酸素消費量は80.0であつた。一方生菌数は T_{15} は C の $\frac{1}{13}$ であつた。凍結融解を40回行つた菌 (T_{40}) の酸素消費量は0で，生菌を測定すると T_{15} と同数倍稀釈による生菌数は0であつた（もつと稀釈度の低い処では証明されたかも知れないので，全く生菌が居ないとは云えない)。C の $\frac{1}{13}$ の生菌を T_{40} (死菌と見て) $\frac{12}{13}$ に加えたもの (即ち人工的 T_{15} 菌液と云える) の酸素消費量は83.2であつた。即ち T_{15} と略々同一の値を示した。これと同じ事を凍結融解10回のものについて比較測定したが，結果は同じであつた。

なおこの二つの場合，実際に凍結融解を行つたものよりも生菌数を測定してそれに死菌を加えて作製した人工的凍融菌の方が毎常幾分か呼吸量が大であつた。この事は凍結融解を40回行つた菌は完全な死菌ではなく，生菌が幾分混在している為とも思えるが，実際に測定した生菌数よりやや少な目に生菌をとつた時でも呼吸量が幾分多い事が認められた事から，凍結融解により生き残つた菌は，前にも述べた様に，凍融により呼吸酵素そのものが活性化されるど

ころかむしろ菌にとつて致死的である様に，少くとも呼吸酵素に関する限りは，凍融により障害されて無処置の生菌よりも活性度が低下する事を示すものと思われる。

この実験結果から凍結融解によつて生菌数が減少するにも拘らず呼吸量の増大することの機序は，生き残つた菌の呼吸酵素そのものの活性度の増強によるのではなく，恰も死菌を基質の如く利用することによるものであろうとの結論に達した。

實　　驗 XI

凍結融解による呼吸商 (R.Q) の変動

以上の実験で凍結融解による死菌を利用する結果，その呼吸量が増大する事は結論づけられたが，その菌の如何なる構成々分が利用されるかはわからない。酸素呼吸に於ける酸化還元反応に於て如何なる物質が燃焼され反応にあづかつているかをうかがい知る一法として呼吸商を測定比較した。

《実 験 方 法》

4個の容器を使用し，その中2個に炭酸ガス吸収剤 KOH を入れない時は，酸素が消費されると共に炭酸ガスが放出される。その時の檢圧計の読み，h は O_2 と CO_2 との差であり，次の式にあらわされる。

即ち

$$h = h_{O_2} + h_{CO_2}$$

この場合 h_{O_2} は常に負 (−) であり，h_{CO_2} は正 (+) 符合である。

$$h_{O_2} + h_{CO_2} = \frac{x_{O_2}}{k_{O_2}} + \frac{x_{CO_2}}{k_{CO_2}}$$

x_{O_2} 及び x_{CO_2} は夫々求むる O_2 及び CO_2 の量である。

従つて

$$x_{CO_2} = \left(h - \frac{x_{O_2}}{k_{O_2}}\right) k_{CO_2} \cdots\cdots (1)$$

となる。

他の2個の容器は KOH を入れて測定する時は，x_{O_2} が求められる故 (1) 式より x_{CO_2} が求められる。

従つて

$$\text{R.Q} = \frac{x_{CO_2}}{x_{O_2}}$$

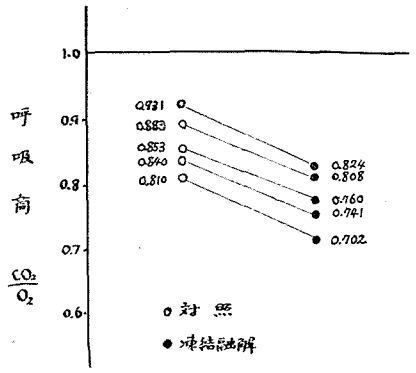
が求められる。

《実験成績》

結果は第34図の如く呼吸商は凍融により値が低くなる事が認められた。即ち対照と凍融菌のR.Q.の平均値は0.861と0.770で差は約0.1であつた。ブドー糖が酸素により燃焼される時は,

$$C_6H_{12}O_6+6O_2=6CO_2+6H_2O$$

でその呼吸商は1となるが，この結果の様に呼吸商が低くなる事は不完全なる酸化或は酸素分子の少いものの酸化，即ち蛋白質又は脂肪の如きものがこの死菌利用に関与しているものと考えられる。



第34圖　凍結融解による呼吸商(R.Q)の變動

總括並びに考按

凍結融解による細菌体そのものへの影響については，従来色々と実験され，種々の考察もなされているが，その機序に関しては，未だ定説がたてられていない。例えば，菌体への障害の原因として細胞外或いは細胞内凍結の結果生ずる氷晶の機械的影響，媒液或いは細胞液の濃縮による化学的影響等があげられているが，この点に関しては吾々の教室に於ても数年来，種々の角度から検討を行い，次の様な見解に達している。即ち種々の冷却条件のもとに菌液を凍結させ，機能的，形態的観察を行つた結果，多かれ少なかれこれ等の物理的，化学的障害がみられるわけであるが，その主因をなすものは細胞内凍結による細胞構造の破壊にあると考えるに至つたのである。

ところで細菌の有する酵素に関しては，菌体より遊離抽出されたものでは凍結融解により少しも影響されることなしにactiveの状態のまま残存されると云い，又却つて活性度が増大するとも云われ，或いは低下するものもあると報告されている。

又細菌酵素を菌体のまま凍結融解した場合に活性度の増強する事を報告しているものもあるが，それ等はいづれも単一の酵素を検査の対象としての実験である。

然し呼吸酵素は既述の様に複雑なサイクルをなした幾つかの酵素及び補助物質の連環であり，この連繋が絶たれた場合には呼吸作用は進行しなくなるものであるが，この系列に属する多数の酵素のうちある特定の酵素の活性度が假令増強或いは低下する様な影響をうけたとしても一連の呼吸酵素系全体としては，いかなる変化を示すかは慎重な検討を要する。要するに凍結融解により細菌体の破壊が起り菌の死滅を来たすと共に菌体成分の遊離も考えられる。

また一方増殖能を残存する生菌にあつても各種の生理的機能の変化の有無が問題となる。

本実験に於ては凍結融解を行つた結果，呼吸量が増大する機序について追求したものであり，凍結融解のために生ずると思われるこれ等の諸因子に対し逐時分析的に検討を試みて呼吸量増大に関与しない因子を順次除外して行つた結果，凍融による死菌には呼吸能のない事，

生残した菌の呼吸酵素の活性度増強も認められない事がわかり，最後にはこの生き残つた生菌が死菌を何等かの形で（例えば恰も基質として）利用するために呼吸量が増大するものである事を知つた。

この様に導き出された結論から再びこれ迄不明であつた二，三の点について考察を進めると，

1) 青酸に対する感性が大であつた事は生菌数減少の為の呼吸阻害度の増加によると考えるよりも，ウレタンによる呼吸阻害の成績及び基質を加える事による正常菌の青酸感性増大等の結果から，寧ろ死菌を恰も基質として利用する為に生菌数の減少にも拘らず呼吸酵素系特にチトクローム系酵素の反応及びその速度が大となり，青酸に対する感性が大となつたと思われるもので，これはチトクローム系酵素の活性度の増強を意味するものではなく，酸素消費量増大の為の見かけ上のものである。

2) ウレタンに抵抗性を有していた事は既述の通り，却つて脱水素酵素の不安定化の結果影響をうけにくくなつたものと思われる。

3) 乳酸，琥珀酸，蟻酸を基質として加えた場合の呼吸量が凍融菌に於いて生菌数としては少いにも拘らず，対照の呼吸量より大であつた事は，これ等基質に対する脱水素酵素が凍融によりあまり障害をうけずその為一定量の酸素消費量を示すが，更に死菌利用による酸素消費量増大が之に加わつて対照のそれより大となつたものと思われる。従つて基質を加えた場合もそれによる呼吸量の増加率を比較した事は意味はなくなるが，これは全体としての呼吸酵素の活性度の増強によるのではないという事を云う為のものである。

4) 反覆凍結融解をくり返した時，一定回数迄は呼吸量が増大し，その後段々減少するのは（単位生菌数に対する呼吸量は増加している）凍融菌の呼吸酵素の活性度増強によるのではなく，ある限度以上の生菌さえ生き残つていれば死菌が段々増えてもこれを利用し得るからで生菌がある限度以上迄減少すれば，死菌がいくらあつても利用される割合は少くなり最後に生菌が極く僅少になつた場合には，も早殆んど利用されなくなつてしまい，又利用されても生菌数の絶対僅少の為検圧計に現われるほど酸素消費は見られなくなるからであろう（又最後に呼吸量が認められなくなる事から凍融による死菌には呼吸能のない事が云える）。

この様な関係から実験 X でも明らかな様に，凍結融解によつて呼吸量が増大する機序は生残菌の呼吸酵素の活性度増強によるのではなく，死菌利用による酸素消費量の増大であり，その結果酵素系の反応及びその速度が大となつた為の見かけ上の酵素能増大を示したに過ぎないものと考える。

唯ここで問題となる事は死菌を利用するものとすれば，その利用さるべき呼吸物質即ち呼吸を促進させる様な物質がメヂウム中に溶出されていて然るべきように考えるが，実際には遠心沈澱による上清などでは少なくともこの様な物質の遊離は認められない。ただ抽出など，何等かの方法を講ずれば，之を証明出来るかも知れないが，現在の所では次の様に考えてよいの

ではないかと思う。

即ち恐らく凍結融解によつて細胞膜の破壊或いは細胞膠質状態の変化，更に進んでは菌体自身の完全な破壊が起る事が想像されるので（この点については一部形態的に変化が認められている）生菌と死菌との頻繁な衝突により，生菌が死菌と接触する際に死菌体部分の利用物質を自己の細胞内にとり入れるのではないかと考えられる。

なお利用されるべき物質が如何なるものであるかは決定出来ないが，凍結融解によつて呼吸商が低下する事から既述の如く，蛋白質脂肪等の如きものではないかと想像される。

結　論

凍結融解によつて細菌がうける影響についてしらべる為に大腸菌を用いて生菌数と呼吸作用を測定比較した所，生菌数が減少するにも拘らず，却つて酸素呼吸量が増大すると云う事実を認めた。

この機序を追求する為に種々の実験を行い次の様な成績を得た。

1) 各種処置（加熱，酸及びアルカリ処置）による死菌には酸素消費能が無い事が認められた。

2) 凍結融解を何回もくり返す時は，一定回数迄は生菌の減少に反して益々呼吸量は増大するが，次第に減少して，その後は生菌数減少と共に呼吸量の減少を認め，遂には，酸素消費量は全く認められなくなつた。これ等の事から，凍結融解による死菌には呼吸能のない事が言える。

3) 凍融菌浮游液遠心上清には呼吸酵素及び呼吸を促進する物質の遊離は認められなかつた。

4) 各種基質（ブドー糖，リンゴ酸，乳酸，蟻酸，琥珀酸）を加えて呼吸量を比較した所，ブドー糖及びリンゴ酸を加えた時には却つて凍融菌の方が呼吸量少く，この事はブドー糖及びリンゴ酸脱水素酵素が凍結融解により却つて障害された事を示し，他の三つの場合には，凍融菌の方が大であつたが，その基質を加える事による増加の割合は対照に比して少なかつた。

5) 生菌に各種処置による死菌（酸素消費能のない菌）を加える事によりその生菌の呼吸量が増大する事を認め凍結融解をくり返して死滅させた菌を加えた場合が，最もその増加率が大であつた。

6) 青酸による呼吸阻害度は，凍融菌の方が大であり，ウレタンに対しては凍融菌の方が却つて感性が鈍かつた（抵抗性を有していた）。

7) 凍結融解による生菌数減少を測定し，これと同数の生菌に凍結融解（40回）による死菌を加えて実験的な凍結融解のモデルを作り，自然の凍融菌と条件を等しくして呼吸量を比較した所，ほぼ同じ値を示した（前者の方が常にやや大があつた）。

これ等の事から生残した菌の呼吸酵素そのものの活性度が凍結融解によつて増強した為に

呼吸量が増大したのではなく（却つてある種の脱水素酵素は障害されている）凍融により死んだ菌を生き残つた菌が何等の形で（例えば恰も基質の如く）利用する事によつて増加するのであるとの結論に達した。

なおその他二，三の可能性について考察を加えた。

稿を終えるにあたり御懇切なる御指導と御校閲を賜つた恩師根井教授並びに林助教授に深謝致しますと共に御鞭韃と御校閲を賜つた恩師三上教授に深甚の謝意を表します。

文　　献

1) 藤田秋治　生物學的領域に於ける檢壓法とその應用．岩波書店.
2) Umbreit, W. W. 1951 Manometric techniques and tissue metabolism.
3) 坂口・植村 1951 酵素.
4) Nord F. F. 1932 Erg. Enzymforschg, **1**, 79.
5) Gard, M. 1932 Compt. rend. **194**, 1184, 3) より引用.
6) 小川忠人 1953 酵母カタラーゼに及ぼす低温の影響．低温科學, **10**, 173.
7) 根井外喜男 1954 酵母の凍結過程．日農化., **28**, 91.
8) 根井外喜男他３名 1954 酵母の機能に及ぼす低温の影響．日農化., **28**, 94.
9) 佐藤　徹 1955 低温處理による細菌死滅の機序について．低温科學, Ser. B, **12**. 39.
10) 秋元　博 1954 凍結融解による細菌の酸凝集性の變化に就いて．低温科學, Ser. B, **11**. 23.
11) Weiser, R. S. and Osterud, C. M. 1945 Studies of the death of bacteria at low temperatures. J. Bact., **50**, 413.
12) Haines, R. B. 1938 The effect of freezing on bacteria. Proc. Roy. Soc. London B, **124**, 451.

Résumé

As a result of studies which have been made to investigate the effect of freezing and thawing on bacteria by the use of the method of determining the viability and respiratory activity of Escherichia coli, it was recognized that the respiratory activity of the frozen-thawed bacterial suspensions obviously increased in spite of the survival-rate decrease due to low temperature injury.

It was therefore attempted to carry out the experiments in view of clarifying the mechanism of such an apparently conflicting phenomenon.

As the bacterial suspensions were frozen and thawed repeatedly, the respiratory activity progressively increased during the first several repetitions, and then decreased until its total actvity was lost at the fortieth freeze-thawing, while the survival rates were gradually reduced throughout the whole process.

From another experiment, it was confirmed that the bacteria, which had been brought to death from the damage caused by various kinds of physical or chemical treatments, such as heating, acid or alkaline chemical, lost their ability to consume oxygen.

The inference drawn from these facts was therefore that, the dead bacteria in frozen-thawed suspensions had no respiratory activity.

It was further demonstrated (i) that neither the substance such as respiratory enzyme nor the substance to be supposed to accelerate the respiration, was discovered in the supernatant obtained by centrifuging the frozen-thawed suspensions; and (ii) that

the respiration of the living cells in the untreated control suspensions was considerably activated, when the dead cells which had been destroyed by the some treatment and consequently showed no respiratory activity were added to the control suspensions.

The oxygen-consumption rate of the suspensions, frozen and thawed 10 or 15 times repeatedly, indicated a value similar to that of the model suspensions, prepared by adding the dead cells, which had been deprived of respiratory activity by freeze-thawing repeated 40 times, to the untreated living cells, the number of which was the same as in the 10 or 15 times frozen-thawed suspensions.

Various kinds of substrates, i. e. glucose, malic acid, lactic acid, formic acid and succinic acid, were added to the frozen-thawed suspensions and their respiratory activity was compared with that of the control suspensions. The amount of oxygen consumed by the frozen-thawed suspensions proved to be less than that of the control when glucose or malic acid was added but greater when lactic, formic or succinic acid was added. Besides, the respiration of the treated bacteria was more markedly inhibited than that of the untreated bacteria by cyanide, while, on the contrary, the former was less inhibited than the later by urethan.

From the above-mentioned experimental results, it might be concluded that the increase of oxygen-consumption of the frozen-thawed bacterial suspensions is due to the enhancement of activity of the respiratory enzymes in living cells, which arises not from the direct action of freeze-thawing but from the existence of the dead cells, produced by freeze-thawing, acting as substrates for the surviving cells.