



Title	低温処理による細菌死滅の機序について
Author(s)	佐藤, 徹; SATO, Toru
Citation	低温科学. 生物篇, 12, 39-61
Issue Date	1954-12-30
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/17569
Type	departmental bulletin paper
File Information	12_p39-61.pdf



低温処理による細菌死滅の機序について*

佐藤 徹

(低温科学研究所 医学部門)

(昭和29年12月受理)

緒 言

細菌は多くの生物のうちで低温に対する抵抗性の非常に強いものであることは古くから知られている事実である。このように抵抗が強いということは、細菌細胞が他の一般の大きな生体細胞に比較して、形態的に（特に微細構造的に）或いは機能的にいろいろな点で性質に差異があるからであろうと想像される。

しかしこういった点についてはまだ実験的な証明もなければ、適切な説明も与えられていない。一方近時種々の生物学的材料の乾燥保存の目的に凍結乾燥法が広く利用されるようになったが、細菌についてもその応用の道は広い。ところが細菌の凍結乾燥の場合には従来予備凍結の条件がとかく問題になっている。

これは細菌が低温に対して抵抗が強いとはいえ、凍結の過程に於て多少の障害を受けることを免れないからである。従つて低温のいろいろの条件によつて、細菌の形態や機能にどんな変化が起るかということ詳しくしらべることは細菌の耐寒性の機構を知るためにも、また凍結乾燥に於ける予備凍結の最適条件をきめるためにも非常に有力な手がかりになると思う。これまでにも細菌を種々の低温条件下で処理した実験の報告は必ずしも少なくはない¹⁾²⁾しかし今日なお低温による障害の機序に関して定説がないのは、これまでに行われた多くの実験が、その条件に於て一定せず方法に於ても不備があり、結局成績もまた区々であることに基ずくものと考えられる。

吾々の教室に於ては、かかる点に留意し種々の角度から検討を試みているが、著者も又その一部を担当し、主として大腸菌を用いてその機能特に増殖力に及ぼす影響を追求することによつて低温による障害の機序を明らかにしたいと考えた。

* 北海道大学低温科学研究所業績 第273号

實 験 方 法

1. 使 用 材 料

当研究所保存の *Escherichia coli* を使用した。即ち一夜ブイヨンに培養したものを普通寒天培地 (pH 7.2) に移植し 18~20 時間後に発育増殖した菌苔を掻きとつて、蒸溜水で 3 回遠心洗滌し、湿菌量を秤量してそれから一定濃度の蒸溜水菌浮游液を作つた。後述の菌濃度を変える実験の場合を除いては殆んど全て 1 mg/cc の濃度の菌液を用いた。なお特に浮游液のメジウムとして蒸溜水を用いたのは菌体以外の周囲の条件をできるだけ単一にして凍結過程に参加するとみなされる因子をなるべく簡単にし解釈を容易にしようと考えたからである。

2. 低温処理の方法

冷却速度、到達温度を種々に加減して低温処理を行うために前記のようにして作つた菌液を径 17 mm の試験管に 1 cc 宛分注し、冷却速度の速い場合はこれを直接液体空気 (凡そ -180°C)、ドライアイス・アルコール (凡そ -70°C)、或いはブライン (-30°C ~ -50°C) 中に浸し、冷却速度の遅い場合はこの試験管に更に径 25 mm の外套管をかぶせて二重にし、前記の寒剤中に挿入した。

二重管の間は空気層となつているため熱伝導は低く、冷却速度は小さくなるわけである。

以上のようにして試料を冷却し、所定の温度或いは時間に達したならば直ちに $+10^{\circ}\text{C}$ の水槽に移して融解を行つた。なお試料自身の温度変化の測定には自製の銅コンスタンタン (径 0.2mm) よりなる熱電対を用い、予め無菌的にしておいたその接点が菌液の中心部に達するように試験管中に挿入し、検流計を用いて 0.1°C までの精度の読みをもつて、冷却並に加温過程中の試料の温度変化を詳細に記録した。

3. 生菌数の測定

低温処理後各菌液を生理食塩水を以て適宜の稀釈を行い溶融寒天培地に注加して平板培養し、 37°C 20 時間おいて生じた集落数をもつて生菌数とした。実験に当つては必ず同一冷却条件のものを同時に 2 本づつ行い、同じ実験を 3 回くりかえした。また生菌数測定には平板培養上の誤差を可及的さけるために高濃度の範囲の稀釈は 10 進法で行つても最終稀釈度の附近は更に 2, 3, 5 倍と細分して稀釈し平板培養後生ずる集落数が大体 200 乃至 400 個前後になる処を採用するようにした。そのためには予め想定した最終稀釈度の前後を 3 段階くらいの範囲に亘つて培養し、同一稀釈度のものは必ず 2 枚づつの平板を用いることとして、できる限り測定の正確を期した。

實 験 成 績

I. 冷 却 条 件

1) 冷 却 速 度

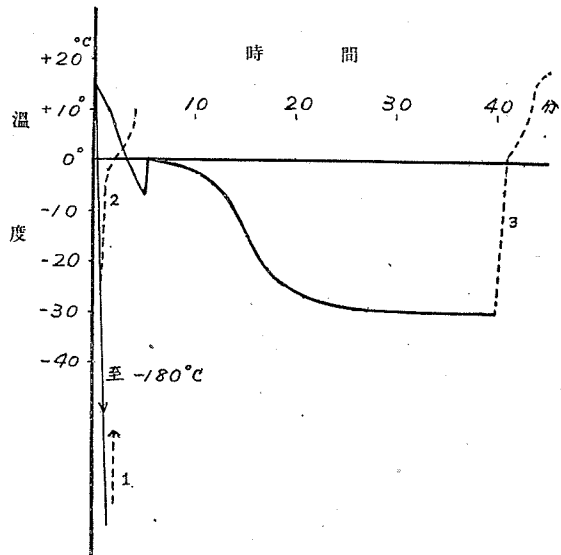
従来低温処理に関する実験で最も多く論ぜられていて、しかも成績が不定であつたのは冷

却速度に関することであつた。一般に冷却温度として扱われているものの中には当然冷却速度として、分けて考えるべきものも含まれているが、それらもすべて混同して扱われていたので本実験では特に試料自身の温度変化を測定することにより冷却速度と冷却温度とをできるだけ分けて考えることにした。

これは他の多くの生細胞の実験に於てもよく知られるように、試料の凍結の状態就中細胞内凍結の有無は冷却速度並びに冷却温度によつて大いに左右されるからである。

著者の実験に当つてはまず冷却条件として比較的極端な場合を3種とりあげた。

即ち 1) 直接液体空気に挿入して -180°C まで達したのも、2) 同じく液体空気で -30°C に達した時、速にとり出したもの及び 3) 二重管にして -35°C のブラインで緩慢に -30°C まで冷したも等いずれも $+10^{\circ}\text{C}$ で融解した。試料 1 cc を用いた場合の冷却曲線は第 1 図に示す通りで、所要の低温に達するまでにそれぞれ凡そ 45 秒、15 秒、40 分を要する。なお 1) と 2) は冷却速度を同じにして到達温度を変え、2) と 3) は到達温度を概ね等しくして冷却速度を変えたものとみなせるものである。



第 1 圖 凍結融解過程の菌液の温度曲線

なお実験を進めるに際し使用菌液の濃度がいかに影響するかが問題になるのでその点からまず吟味することとした。

用いた菌液は湿菌量にして 100 mg/cc から 7 mg/cc までのものである。前記の 3 条件で凍結融解後の生菌数は第 1 表並びに第 2 図に示す通りであつて、最も菌量の少ない 7 mg/cc のものでは 40% 位まで低下する場合があります、結局冷却速度が $3\sim 5^{\circ}\text{C}/\text{min}$ と $18^{\circ}\text{C}/\text{min}$ のものでは生残率に 100~80% と 100~40% のひらきが出来ることになる。

従つてこれらの結果から次のことが言えると思う。

- 1) 本実験で行われた範囲の条件では菌液が凍結すれば必ず生菌数の減少がみられる。
- 2) 菌液濃度の大きい方が生残率が大きい。
- 3) 冷却速度は遅い方が生残率が大きい。

4) 冷却温度 (到達温度) によつては余り大きな差がみられない。但しこの実験で疑義があるのは液体空気で冷却して -30°C に達した時に融解するという条件のときである。この場合 1 cc の菌液を内径 17 mm の試験管の底部に入れてあるので、このような量の試料を急速に

第 1 表 菌濃度を變えた場合の各冷却条件での生残率

菌濃度 (mg/cc)	實驗例	對 照		緩 慢 凍 結 (-30°C まで)		急 速 凍 結 I (-30°C まで)		急 速 凍 結 II (-180°C まで)	
		生 殘 菌		生 殘 菌		生 殘 菌		生 殘 菌	
		數	率 (%)	數	率 (%)	數	率 (%)	數	率 (%)
100	I II	413, 398 } 405.5 × 10 ⁸	100	408, 424 } 472, 391 } 423.8 × 10 ⁸	100	390, 369 } 421, 376 } 388.5 × 10 ⁸	95.0	356, 373 } 386, 358 } 368.3 × 10 ⁸	90.8
100	I II	262, 298 } 322, 329 } 302.8 × 10 ⁸	100.0	287, 297 } 306, 284 } 293.5 × 10 ⁸	96.4	300, 332 } 305, 297 } 308.5 × 10 ⁸	100	256, 275 } 246, 242 } 254.8 × 10 ⁸	84.1
80	I II	200, 194 } 250, 227 } 220.3 × 10 ⁸	100	172, 189 } 174, 174 } 177.3 × 10 ⁸	80.4	169, 161 } 138, 146 } 153.5 × 10 ⁸	69.6	166, 155 } 151, 154 } 156.5 × 10 ⁸	71.0
80	I II	248, 244 } 272, 264 } 274.9 × 10 ⁸	100	254, 215 } 234, 201 } 236.5 × 10 ⁸	86.2	228, 229 } 204, 234 } 222.4 × 10 ⁸	81.0	227, 240 } 234, 222 } 239.4 × 10 ⁸	87.0
50	I II	313, 331 } 339, 321 } 330.5 × 10 ⁸	100	276, 294 } 313, 343 } 306.5 × 10 ⁸	92.7	245, 277 } 276, 263 } 265.3 × 10 ⁸	80.2	266, 259 } 284, 260 } 267.3 × 10 ⁸	81.0
50	I II	246, 235 } 331, 254 } 266.5 × 10 ⁸	100	225, 266 } 248, 244 } 240.8 × 10 ⁸	90.3	195, 202 } 183, 193 } 193.3 × 10 ⁸	72.5	227, 222 } 160, 171 } 195.0 × 10 ⁸	73.1
25	I II	623, 674 } 630, 652 } 621.5 × 10 ⁷	100	536, 453 } 530, 476 } 487.8 × 10 ⁷	78.4	323, 340 } 323, 333 } 326.8 × 10 ⁷	52.3	371, 311 } 422, 444 } 367.1 × 10 ⁷	59.1
25	I II	596, 820 } 758, 758 } 789.5 × 10 ⁷	100	594, 739 } 697, 692 } 677.0 × 10 ⁷	85.8	619, 593 } 356, 352 } 468.0 × 10 ⁷	58.0	463, 480 } 421, 509 } 475.5 × 10 ⁷	60.2
16	I II	578, 544 } 694, 692 } 627.0 × 10 ⁷	100	607, 545 } 567, 532 } 562.8 × 10 ⁷	89.7	366, 385 } 400, 361 } 378.0 × 10 ⁷	60.2	ワレル, } 332, 378 } 355.0 × 10 ⁷	56.6
12	I II	427, 416 } 331, 340 } 378.5 × 10 ⁷	100	374, 373 } 326, 313 } 346.5 × 10 ⁷	91.3	145, 150 } 243, 207 } 186.3 × 10 ⁷	49.2	253, 255 } 208, 199 } 203.8 × 10 ⁷	53.8
7	I II	312, 307 } 309, 306 } 308.5 × 10 ⁷	100	272, 294 } 274, 293 } 283.3 × 10 ⁷	90.1	114, 129 } 145, 109 } 124.3 × 10 ⁷	40.0	123, 112 } 144, 129 } 127.0 × 10 ⁷	41.1

冷却した場合はどうしても液の外辺部と中心部とで温度勾配の生ずることはさげられない。つまり冷却過程で中心部（温度測定部位）の温度が -30°C に達した時は外辺部はもつと低くなっているはずである。

従つてこのような条件での急速凍結を -30°C までの緩慢凍結と比較する場合、冷却速度は確かに違うが、更に到達温度まで違っているかも知れない。

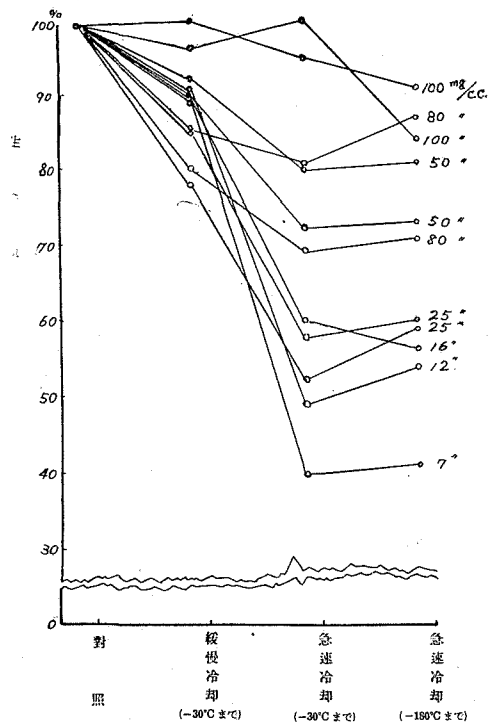
そこで確実に到達温度は同じにして冷却速度だけを変える実験を行つた。即ち -30°C （ブライン）或いは -70°C （ドライアイス・アルコール）の冷媒中に直接又は間接に挿入してそれぞれ -30°C 、 -50°C まで冷却し、冷却速度の比較をした。その結果は第2表に示すように、やはり急速に冷却したものの方が生残率が低くなることをみとめた。

2) 到達温度

前項の実験で急速冷却の場合の到達温度による差異はあまりはつきりみとめられなかつたが、この点を更に詳しくしらべてみた。なお本項より以下の実験では生残率について差がつきやすいように菌液はすべて 1 mg/cc の濃度のものを用いた。

今回は更に菌液量を少なくして 0.5 cc づつを内径 11 mm の小試験管にとり -70°C のドライアイス・アルコール中に直接或いは二重管にして緩急両様の冷却を行い、 -5°C 、 -10°C 、 -20°C 、 -30°C 、 -40°C 、 -50°C に達した時にそれぞれ直ちに融解した。この場合の所要温度に達するまでの時間は急速冷却で凡そ15秒乃至25秒、緩慢冷却で8分乃至14分であつた。このようにして凍結融解した後の生残率は第3表、第3図に示すような結果となつた。

それによれば緩慢冷却の場合は温度が低下するに従つて多少生残率が低下する傾向があるが、急速冷却では -5°C ですでに40%以下に減少してそれより温度が低下しても生残率には殆んど変化がない。なお蒸留水の場合に比較して菌周囲の凍結状態が明らかに違うような1%



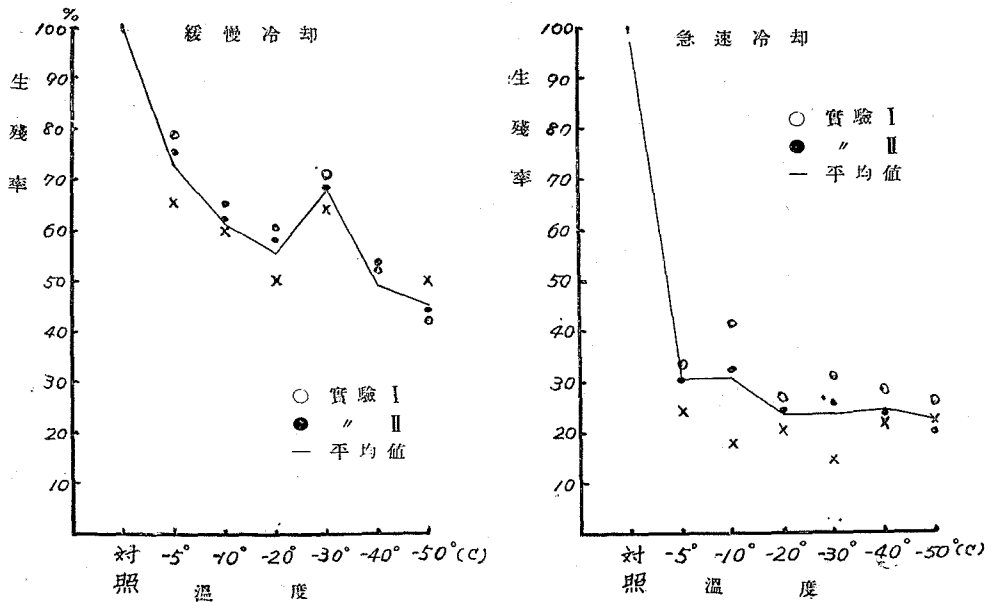
第2圖 菌濃度を變えた場合の各冷却条件での生残率

第2表 到達温度を一定にし冷却速度を變えた場合の生残率

到達温度 (°C)	到達時間 (分)	生残率 (%)
対 照	—	100
-30	3.5	70.8
	48	90.9
-50	3	67.6
	20	87.6

第3表 冷却速度を一定にして種々の到達温度でとり出したときの生残率
(メジウム： 蒸溜水, 菌液濃度 1 mg/cc, 液量 0.5 cc)

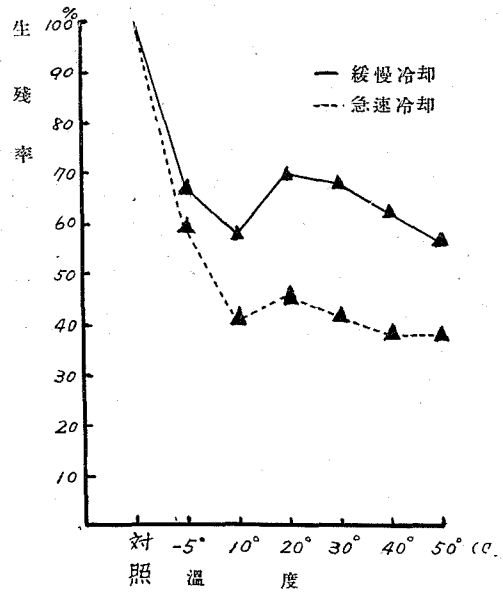
到達温度 (°C)	実験例	対 照	緩 慢 冷 却		急 速 冷 却	
		生 残 率 (%)	生 残 率 (%)	平 均 (%)	生 残 率 (%)	平 均 (%)
-5	I	100	78.9	73.3	36.6	30.3
	II	〃	75.4		30.3	
	III	〃	65.6		24.0	
-10	I	100	65.2	61.5	41.7	30.4
	II	〃	62.2		32.1	
	III	〃	60.1		17.6	
-20	I	100	60.5	55.7	26.1	23.5
	II	〃	58.9		23.8	
	III	〃	50.1		20.8	
-30	I	100	71.0	68.1	30.9	23.9
	II	〃	68.5		26.1	
	III	〃	64.9		14.8	
-40	I	100	52.8	49.6	28.2	24.7
	II	〃	53.5		23.3	
	III	〃	42.6		22.5	
-50	I	100	42.9	45.9	25.7	22.9
	II	〃	44.7		20.4	
	III	〃	50.1		22.5	



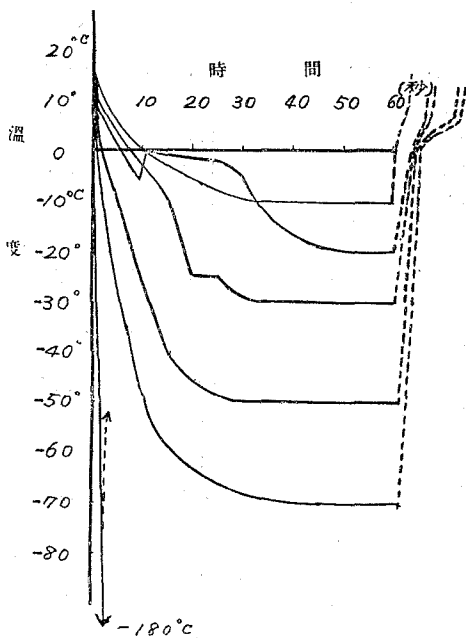
第3圖 冷却速度を一定にして種々の到達温度でとり出したときの生残率
(メジウム： 蒸溜水, 菌液濃度 1 mg/cc, 液量 0.5 cc)

第4表 冷却速度を一定にして種々の到達温度でとり出したときの生残率
(メジウム: 1% 蔗糖, 菌液濃度 1 mg/cc, 液量 0.5 cc)

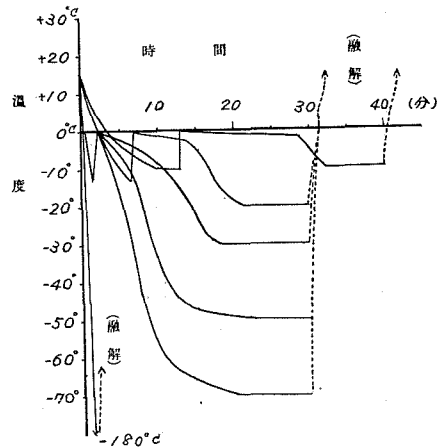
到達温度 (°C)	実験例	生 残 率 (%)		
		対 照 (%)	緩慢冷却 (%)	急速冷却 (%)
-5	I	100	66.7	59.2
-10	I	100	57.4	40.7
-20	I	100	69.8	45.3
-30	I	100	67.5	41.2
-40	I	100	61.8	37.7
-50	I	100	55.3	37.4



第4圖 冷却速度を一定にして種々の到達温度でとり出したときの生残率
(メジウム: 1% 蔗糖, 菌液濃度 1 mg/cc, 液量 0.5 cc)



第5圖 種々の温度まで急速冷却した場合の凍融曲線
(メジウム: 蒸溜水, 菌液濃度 1 mg/cc, 液量 0.2 cc)



第6圖 種々の温度まで緩慢冷却した場合の凍融曲線
(メジウム: 蒸溜水, 菌液濃度 1 mg/cc, 液量 0.2 cc)

蔗糖液をメジウムとする菌液を用いて同様の実験を行つてみると、生残率は全般として蒸溜水の場合よりも多いが温度差による変化はやや漸減の傾向はあつたけれどもあまりはつきりしなかつた(第4表, 第4図参照)。

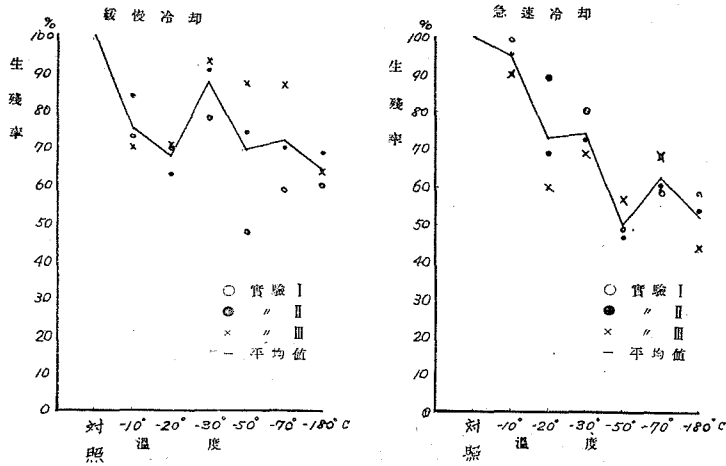
次に前項でも論じたように急速冷却の場合は温度測定 of 精度が問題となるので液中の温度勾配を少なくする為に、なるべく液量を少なくした。即ち特別に作つた毛細管(内径約3mm)に菌液量0.2ccを入れ、一方到達温度を正確にするために -10°C , -20°C , -30°C , -50°C , -70°C , -180°C の冷媒を予め準備しておいて、之に浸すと概ね20~30秒でそれぞれの温度に到達するが1分を経過した処で融解した。その凍結融解曲線は第5図である。

冷媒の温度が異なるために厳密に言えば、冷却速度は全く同一ではないわけであるが、その結果は0.5cc入小試験管の場合とやや違つて、温度の下降とともに生残率も漸減の傾向がある(第5表, 第7図参照)。

但し0.5ccでは -5°C で既に20~40%まで低下しているのに0.2ccでは -10°C でも90%にあることは前者の温度測定には、ずれが考えられるからであらうか。この毛細管による0.2ccの検索を念のため二重管の緩慢冷却についても行つてみると第6図のような凍結融解曲線を示し、結局毛細管での急速冷却、緩慢冷却で第5表, 第7図のような結果が得られた。

第5表 冷却速度をほぼ一定にして種々の温度まで冷却したときの生残率
(メジウム: 蒸溜水, 菌液濃度1mg/cc, 液量0.2cc)

到達温度 ($^{\circ}\text{C}$)	実験例	對 照	緩 慢 冷 却		急 速 冷 却	
		生 残 率 (%)	生 残 率 (%)	平 均 (%)	生 残 率 (%)	平 均 (%)
-5	I	100	72.8	75.6	99.0	94.7
	II	〃	83.8		95.3	
	III	〃	70.4		90.0	
-20	I	100	70.2	67.9	89.6	73.0
	II	〃	63.1		69.2	
	III	〃	70.4		60.2	
-30	I	100	78.1	87.7	80.1	74.1
	II	〃	90.9		73.0	
	III	〃	93.1		69.2	
-50	I	100	47.8	69.7	49.0	50.4
	II	〃	74.4		47.3	
	III	〃	87.0		57.1	
-70	I	100	58.8	72.0	59.3	62.8
	II	〃	70.2		60.7	
	III	〃	87.0		68.5	
-180	I	100	60.1	64.3	58.4	52.2
	II	〃	69.0		54.0	
	III	〃	64.0		44.2	



第7圖 冷却速度をほぼ一定にして種々の温度まで冷却した時の生残率

即ち緩慢冷却では 0.5 cc の際と同じように -30°C の処の高い山がみられた外は 0.5 cc の際とはやや異なつて $-10\sim-180^{\circ}\text{C}$ の範囲内で温度差による変化はあまり明らかではなかつた。

3) 反覆凍結

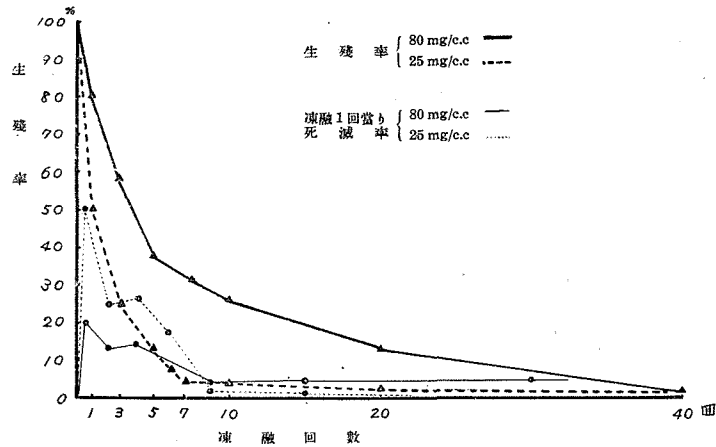
これまでに述べた実験で菌液に凍結が起れば必ず生菌数の減少がみとめられた。これは凍結に伴なう種々の状態変化によつて菌体が障害されることによるものと考えられるが 1 回の凍結融解で残存した生菌が更にくり返して次の凍結操作をうけた場合にどのように影響を蒙るかを検してみた。

方法は 1 cc の菌液を液体空気によつて急速に凍結し (2 分間浸けておく)、 $+10^{\circ}\text{C}$ で融解し (2 分間) 之を 40 回くり返して 1, 3, 5, 7, 10, 20, 30, 40 回目に生菌数の測定を行つたものである。

なお使用菌液は 80 mg/cc と 25 mg/cc の 2 種である。

第6表 凍結融解を反覆した場合の生残率と凍融各 1 回當りの死滅率

凍融回数	80 mg/cc 菌液		25 mg/cc 菌液	
	生残率 (%)	凍融 1 回當りの死滅率 (%)	生残率 (%)	凍融 1 回當りの死滅率 (%)
0	100	20.6	100	50.0
1	79.4		50.0	
3	57.7	13.6	25.0	25.0
5	38.9	14.5	11.6	26.8
7	32.9	7.5	7.5	17.6
10	26.6	4.3	3.7	1.2
20	13.0	5.1	0.8	0.3
40	1.2	4.5	0.8	0



第8圖 凍結融解を反覆した場合の生残率と凍結融解各1回當りの死滅率

その結果は(第6表), 凍結融解を重ねるに従つて生菌数を減じ第8図に示すような曲線を呈する。

この場合にも菌濃度の大きい80 mg/ccの方が25 mg/ccのものより生残率の低下が少なく, 5回の凍結融解で25 mg/ccの11.6%に対し39.8%の生残率となつている。なおこの成績を凍結融解1回當りの菌の死滅の割合から考えてみると第6表, 第8図に示すように最初のうちは死滅率は大きい, 凍融回数を重ねるに従つて次第にその率の低下することがわかる。

4) 低温のまま温度を変動させた場合

凍結とそれに伴う細菌障害の機序を更に追及するために, 所定の温度まで冷却し凍結させた菌液を適当な温度まで上昇させ(前項実験の融解にまで至らない 0°C 以下の範囲内), 再び冷却するという操作をくり返した場合に菌体に何らかの影響がないか否か, またこのような検討によつて細胞内外の氷晶の状態, 或いはそれによつて起ると考えられる障害の機序等が多少でも明らかになるのではないかと考えて本実験を試みたのである。

この点については Weiser も同様のねらいで実験しているが, 彼は菌体の内外ともに凍結したと考えられる場合に, もし菌体内成分の eutectic point がメジウムのそれより低いとするならば適当な温度まで上昇させると菌体外のメジウムは凍結したままで, 菌体内だけ融解させることができる筈と考えたのであるが, 結局このように低温下の温度変動をくり返しても殆んど死滅率は増さないという事実をみとめて, それを菌体内凍結の存在を否定する理由の一つとしている。

著者はまた別の角度からの吟味も含めたもので次のような方法で検討を試みた。即ち蒸溜水浮遊菌液を3群に分け, 液体空気ですづれも先ず -180°C に冷却し, それを -70°C , -40°C , -20°C までそれぞれ5回づつ温度を上下させて, 生菌数を測定した。

更に -180°C までの最初の凍結は急速冷却($180^{\circ}\text{C}/\text{min}$)と緩慢冷却($18^{\circ}\text{C}/\text{min}$)に分け

て行い、温度変動を5回反覆する処理時間は凡そ30~50分以内である。その結果は急速冷却の場合は第7表に示すように、対照の-180°Cまで下げてそのまま融解したものの生残率は36.6%であるのに対し、-70°Cまで反覆上下させたものは15.9%、-40°Cまでのものは19.8%、-20°Cまでのものは28.8%となつて、いずれも多少障害度を増したような結果となっているが、前項の凍結融解5回反覆した場合には1回凍結融解のものの50%乃至20%まで減少している事実と比較すれば殆んど問題にならないくらいの僅かの変化である。ただ-20°Cまで上昇させたものよりも、-70°Cまでしか上昇させないものの方がやや障害度が大きいようにみえる。

同様の実験を緩慢凍結で-180°Cまで冷却したものについて行つてみると、急速凍結の場合のような傾向もみられず、-20°C、-40°C、-70°Cの何れの温度まで昇降させても対照とほぼ同一の値を示し、温度変動による死滅は殆んどみとめられなかつた(第8表)。

もちろん上記両条件での実験で、一たん-180°Cまで冷却した後-20°C、-40°C、-70°Cまで温度の昇降をくり返したものは最初から、-20°C、-40°C、-70°Cまでしか冷却しないも

第7表 急速凍結後、低温のまま温度を變動させた場合の生残率

冷却条件		実験例	生残率 (%)	平均 (%)
対	照		100	
温度變動させない場合 (凍融1回)	-180°C	I	44.4	36.6
		II	40.6	
		III	24.8	
	-70	I	40.6	36.4
		II	31.2	
		III	31.2	
	-40	I	51.0	45.7
		II	52.5	
		III	33.7	
	-20	I	85.3	75.0
		II	78.9	
		III	60.9	
温度變動(反覆5回)	-180~-70	I	19.9	15.9
		II	14.6	
		III	13.3	
	-180~-40	I	21.0	19.8
		II	22.9	
		III	15.6	
	-180~-20	I	25.5	28.8
		II	23.8	
		III	37.3	

第8表 緩慢凍結後、低温のまま温度を變動させた場合の生残率

冷却条件		実験例	生残率 (%)	平均 (%)
対	照		100	
温度變動させない場合 (凍融1回)	-180°C	I	26.7	33.3
		II	36.4	
		III	36.9	
	-70	I	32.5	32.4
		II	29.3	
		III	35.5	
	-40	I	36.6	33.6
		II	32.3	
		III	42.1	
-20	I	64.6	63.2	
	II	57.6		
	III	67.4		
温度變動(反覆5回)	-180~-70	I	26.1	32.6
		II	40.4	
		III	31.5	
	-180~-40	I	23.8	30.2
		II	39.4	
		III	28.3	
	-180~-20	I	25.8	29.6
		II	—	
		III	33.4	

のに比較すれば、はるかに死滅率が高いことは申すまでもない。

以上の成績をくり返し吟味する意味で、同一試料について最初の冷却速度をかえたものについて比較してみると、やはりほぼ同様の結果が得られ、この場合にも急速冷却の方がやや障害度が大きいようにみえた(第9表)。

第9表 温度變動の場合の冷却条件による比較

冷却条件		実験例	生残率 (%)		冷却条件		実験例	生残率 (%)	
対照			100	平均 (%)	対照			100	平均 (%)
急速凍結	-180 (1回) °C	I	56.9	64.9	緩慢凍結	-180 (1回) °C	I	81.8	80.7
		II	73.0				II	79.7	
	-180~-70 (5回)	I	51.9	55.7		-180~-70 (5回)	I	59.6	63.9
		II	59.6				II	68.2	

II. 凍結状態に関するその他の因子

1) メジウムの検討

菌体周囲のメジウムの種類並びに濃度、菌体自身の成分或いは水分量等は菌液の凍結状態に深い関連をもつものである。

著者はさきに共同研究者とともに細菌の凍結乾燥に関する実験を行うに当り、メジウムの影響を検討して一定の成績を得た¹⁰⁾。今回更にその点を確認する意味で追試を行つたものである。

用いたメジウムは糖、塩類、蛋白成分等で実験には0.85%生理食塩水、2%、1%の蔗糖、0.5%ゼラチン、50%非働性牛血清等で、特に25 mg/cc菌液について検討したものである。(何れも予め2倍の濃度の溶液を調製しておき、之に50 mg/ccの蒸溜水浮游液を等量加えて菌液濃度を上記になるようにしたものである)。この場合の冷却条件は菌液0.5 ccの-30°Cまでの緩慢冷却と-180°Cまでの急速冷却である。

その結果は第10表、第9図に示す通りで一般に糖液、蛋白液を用いたものは蒸溜水や塩類のものに比較して生残率が多いことは前回の実験成績と同一傾向である。なおこれらのメジウムを用いてもやはり急速凍結のものはそれぞれ緩慢凍結のものよりも障害が大きい。

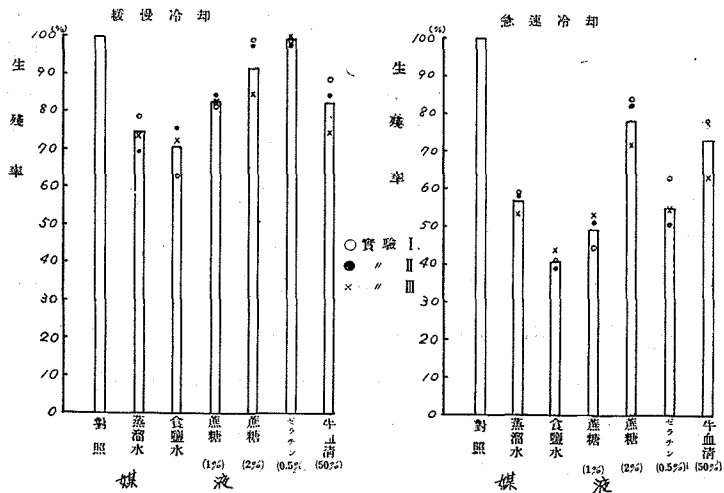
2) 菌の培養時間(菌令)

これまでは主として菌体以外の環境条件或いは処置の条件について検討してきたが、今度は菌体それ自身の性状がどの程度に関与するかを吟味してみた。

即ち300 ccの三角フラスコに入れたブイオン100 ccに菌体を接種し、37°Cで4時間(対数期の初期)、20時間(定常期)、80時間(陳旧培養)おいたものをそれぞれ3回蒸溜水で洗滌し菌液濃度1 mg/ccの菌液として型の如く低温処理を行つた。

第10表 各種メジウムを用いた場合の生残率

メジウム	実験例	対 照	緩 慢 冷 却		急 速 冷 却	
		生 残 率 (%)	生 残 率 (%)	平 均 (%)	生 残 率 (%)	平 均 (%)
蒸 溜 水	I	100	78.4	74.1	59.1	57.0
	II	〃	69.3		59.0	
	III	〃	74.6		53.0	
食 鹽 水	I	100	62.9	70.6	40.1	41.0
	II	〃	76.5		39.8	
	III	〃	72.4		43.1	
蔗 糖 (1%)	I	100	81.7	82.5	44.1	49.1
	II	〃	84.0		50.5	
	III	〃	81.8		52.7	
蔗 糖 (2%)	I	100	99.3	91.4	83.1	78.5
	II	〃	99.1		82.7	
	III	〃	84.3		71.0	
ゼ ラ チ ン (0.5%)	I	100	99.2	99.4	63.7	55.9
	II	〃	99.1		50.9	
	III	〃	100		55.0	
牛 血 清 (50%)	I	100	88.9	82.2	78.1	73.3
	II	〃	84.7		78.1	
	III	〃	73.2		63.7	



第9圖 各種メジウムを用いた場合の生残率

第11表 菌の培養時間を變えた場合の生残率

培養時間 (時間)	實驗例	對 照		緩 慢 冷 却 (-30°Cまで)			急 速 冷 却 (-180°Cまで)		
		生 残 數	平均 (%)	生 残 數	率 (%)	平均 (%)	生 残 數	率 (%)	平均 (%)
4	I	$292 \times 10^{6.2}$	100	$170 \times 10^{6.2}$	58.2	60.6	$60 \times 10^{6.2}$	20.5	20.8
	II	$222 \times 10^{6.2}$		$140 \times 10^{6.2}$	63.0		$47 \times 10^{6.2}$	21.1	
20	I	$392 \times 10^{6.2}$	100	$290 \times 10^{6.2}$	73.9	71.1	$102 \times 10^{6.2}$	26.0	27.8
	II	$392 \times 10^{6.2}$		$268 \times 10^{6.2}$	68.3		$116 \times 10^{6.2}$	29.6	
80	I	$56 \times 10^{6.2}$	100	$40 \times 10^{6.2}$	71.1	69.2	$24 \times 10^{6.2}$	42.8	45.6
	II	$95 \times 10^{6.2}$		$64 \times 10^{6.2}$	67.3		$46 \times 10^{6.2}$	48.4	

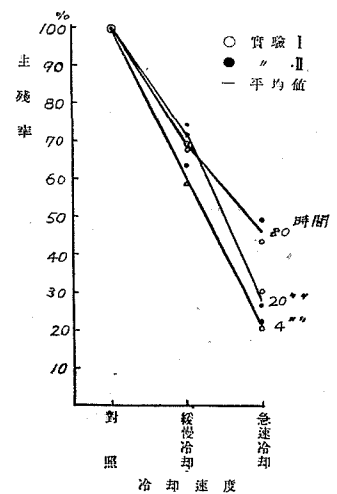
このように培養時間が異なると菌濃度を同一にしてもその中に含まれる生菌数は等しくならず、20時間後のものでは4時間後のものより生菌数がやや多いが、80時間後のものになるとかえつてかなり減少する。また凍結による影響については、緩慢凍結の場合は殆んど4、20、80時間、の三者の間に差はみとめられないが、急速凍結では培養時間の長いものほど生残率が高く、低温処理に対する抵抗性が増している様な傾向にある(第11表、第10図)。

このような事実は他の物理的・化学的な条件に対する細菌の抵抗性としても一般に認められる処の通性であるが、凍結の場合には特に菌体の形態或いは菌体構成成分、就中水分量の多寡などに左右されるものと考えられる。

3) 長時間保存

従来の細菌の低温に対する抵抗性に関する実験は主として長期保存による生死を論じたものであり、著者の本研究に於ては、低温処理による細菌の障害つまり冷却条件による即時死の機序を追求することを目的としているが、それと関連して多少長時間保存による影響の様相をもうかがつてみた。この場合にも凍結状態が大いに関係すると考えられるからである。実験には1mg/cc菌液を使用し、普通試験管に1ccづつ分注し10本を一組として-5°C、-10°C、-35°Cに保存し1日、3日、5日、7日、10日後にそれぞれの組よりとり出して生菌数の測定を行った。なお保存に当たつての最初の冷却速度については-5°C、-10°Cのものは室温から直接これらの温度に移し、-35°Cのものは予め-10°Cに数時間おいて緩慢凍結を起させた後、更に-35°Cに移したものである。

その結果は保存期間の経過とともに何れの場合にも生菌数の漸次減少する傾向がみとめられる。なお同温度で凍結のものと非凍結のものでは凍結のものの生残率は低い。



第10図 菌の培養時間を變えた場合の生残率

第12表 種々の温度で保存した場合の生残率の變動 (菌液濃度 1 mg/cc)

保存温度 (°C)	實驗例	生 残 率 (%)					凍結の有無
		對 照	1日後	3日後	5日後	10日後	
-5	I	100	98.8	80.6	73.8		} 不凍結
	II	〃	98.7	90.0	73.5		
-10	I	100	93.3	53.4	44.3		} 不凍結 凍結
	II	〃	93.4	69.5	66.1		
	III	〃	93.4	21.4	7.6		
-35	I	100	70.6	65.3	57.9	39.1	} 凍結
	II	〃	70.5	60.0	37.1	32.6	

ただ保存日数が短いため充分な觀察はできなかつたが、その結果は第12表、第11図に示すとおりである。

以上の結果からも保存によつて漸次生菌の障害されることが知らされた。その機序は氷晶の変形によるものか過冷却障害によるものかは不明である。

III. 非凍結の冷却条件の吟味

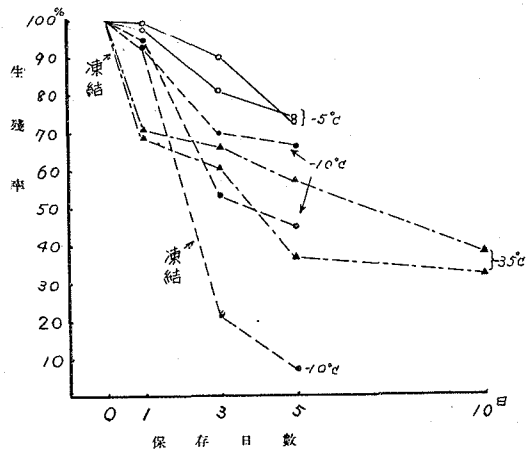
前項までに行つた実験はいずれも菌液の凍結点以下まで冷却した場合でももちろん肉眼的に菌液全体としての凍結をみとめたものである。しかし個々の菌体として冷却

による影響を考える場合に果して細胞内外に生成される氷結晶のみによるものとみなしてよいかどうか検討の余地がある。そこで凍結を起さない範囲で急激に温度を低下させることによつて生ずる障害について追求してみた。なお曾つて Sherman¹⁾ は菌体特に幼弱細菌を 45°C から 10°C まで急激に温度を下げた場合にかなり生菌数の減少することをみとめ、これを Cold shock と称して報告している。

1) 0°C 以上での急速冷却

1 mg/cc の菌液を既述の毛細試験管に入れ熱電対で温度変化を計測しながら +15°C から 0°C (氷と水との混合) に移して急速に温度を低下させ、2 分間放置後再び +15°C に戻した。

なお冷却して 0°C 附近まで温度が下降するのには 10 秒乃至 20 秒を要するので 15°C ~ 0°C の範囲での冷却速度を最初の実験の急速冷却、緩慢冷却と比較すれば凡そ 180°C/min, 3°C ~



第11圖 種々の温度で保存した場合の生残率の變動

5°C/min に対する 50°C/min で略々それらの中間に位する。そこで更に冷却速度を大きくするために、予め 29.7cc の生理食塩水をいれたマイヤーフラスコを 0°C に冷しておき、それに +30°C に保温した菌液 0.3cc を急激に吹き込んでよく混和する。このようにすれば、冷却速度は測定出来ないが極めて急速に 30°C から 0°C に下降させることが出来る。以上の

ようにして行つた冷却菌液を適宜の稀釈を行つて生菌数を測定すると第 13 表の如く殆んど対照の無処理のものと差がなく、結局この程度の冷却速度では菌体に何らの影響のないことをみとめた。

2) 0°C 以下の同一温度での凍結と過冷却 (非凍結) との比較

急速な温度変化であつても凍結が起らない限り殆ど菌体に無影響であることがわかつたので、低温処理による菌体の障害はやはり凍結に基づくもののように考えられやすい。しかし 0°C 以下の低温での処理が問題なのであつて、それには 0°C 以下であつても余り低くない温度範囲であれば菌体はある程度過冷却状態のまま存在するので、これを同一温度でありながら過冷却が破れて凍結を起したものと比較すれば、冷却速度、温度などを除外した全く凍結の有無だけの比較検討が出来る。

方法は数本の試験管に 1 mg/cc の菌液を 1 cc づつ分注し、-10°C の恒温槽に 3 時間ほど放置すると、たまたま過冷却状態で液状のままのものとすでに凍結したものが出来る。その割合は不定であるが、とにかくこのくらいの時間おけば菌液自身はいずれも -10°C くらいの同一温度に達している。この両者を生菌数について比較してみると過冷却状態のものはたとい -10°C くらいまで温度は低下しても殆んど生菌数に変わりはないが、一旦凍結を起すと 60% くらいとなつて明らかに凍結による障害がみとめられる (第 14 表)。

IV. 融解条件について

前項までに行つた実験はすべて冷却に関する条件の吟味のみであつたが、その結果を知るための生菌数測定の手段としては一旦室温まで温度を戻すことが必要となる。特に凍結した試料にあつては必ず融解という過程を経なければ結果を求めることは出来ない。

しかも融解という条件によつても菌障害の程度は左右されると考えられるので、この点を多少検討してみた。

使用菌液は 1 mg/cc のもので、その 0.2 cc を小試験管にとりすべて液体空気によつて急速凍結を行つた。融解条件は 1), 二重管にして室温 (+20°C) に放置したもの。2) そのまま室温

第 13 表 急速冷却 (非凍結) と生残率

種 別	実験例	生残率 (%)
対 照	I	100
	II	100
試験管	I	102
	II	99.8
フラスコ	I	100
	II	98.9

第 14 表 同一温度 (-10°C) での凍結と非凍結との生残率の比較

種 別	実験例	生残率 (%)
対 照	I	100
	II	100
非凍結	I	99.0
	II	98.7
凍 結	I	63.8
	II	60.8

に放置したもの。3) 10°C, 20°C, 30°C, 50°C の温浴槽に入れて +20°C に達するまで放置したもの等である。融解に要する時間は 1) 45 分, 2) 28 分, 3) 2 分 30 秒, 1 分 30 秒, 30 秒, 20 秒等であった。またこれらの速度で融解した菌液の生残率は第 15 表の如く融解速度の遅い方がやや低いような結果になった。

考 察

従来種々の低温条件が細菌に対して如何なる影響を及ぼすかということに関しては幾多の報告があるが、いずれも障害を与えよるとか、或いは殆んど与えないとかいつた程度のいわば定性的な実験成績が多く、具体的に細菌のどんな幾能に対してどの程度の影響を及ぼしたかというように定量的な数値をあげた報告は比較的少ない。特にいかなる機序のもとに障害を与えるものであるかの実験的証明乃至は考察を行つた業績に至つては甚だ寥々たるものである^{1), 2)}

この様な研究の現状に鑑みて吾々の教室に於ては種々の角度から低温処理細菌の性状についての検討を行つてゐるが、著者も亦その一部を担当し、主として生菌数に対する影響について実験を試みたものである。

ところでこれまでに低温に於ける細菌の障害の機序に関して樹てられた説に大体次のような 2, 3 のものがある。

1) 毛細管性説

比較的狭い間隙にある水はかなり低い温度まで冷却されても過冷却状態を保つたまま凍結し難いので、細胞膜に包まれた中にある細胞液のようなものについても、それを包んでいる周囲のメジウムが凍結しても細胞内凍結はおこり難いであろうと想像するものである。特に細菌のように粒子が小さくなるほど菌体中の水は凍り難くなると考えられるので、このことが細菌などの微生物の耐寒性である最大の理由とされていた^{1), 4)} しかしかかる微生物にあつても果して細胞内凍結は起らないものであるかいなかについては今なお種々の問題が残されている。

2) 氷晶による機械的破壊説

凍結の結果生ずる氷晶の膨大、圧迫等によつて細菌が機械的に破壊されると考えるものでこの場合に於ても細胞の内または外のいずれに氷晶ができるかを充分の考慮をめぐらして論じているものは僅かに Haines³⁾, Weiser²⁾ 等の 1, 2 の報告があるにすぎない。他は殆んどすべて菌体内もメジウム中もあまり区別せずに、ただ一般の液体についてと同様冷却の条件から氷結晶の大小を論じ、冷却速度が速ければ小さな氷晶が多数にできるので障害は少ないが、冷却

第 15 表 種々の融解条件での生残率 (菌濃度 1 mg/cc)

融解温度	実験例	生残率 (%)
對 照	I	100
	II	100
室 温 (+20°C) 二重管	I	57.4
	II	55.6
室 温 (+20°C)	I	34.8
	II	52.6
+10°C 水 浴	I	54.3
	II	56.3
+20°C 水 浴	I	63.2
	II	66.4
+30°C 水 浴	I	65.5
	II	72.4
+50°C 水 浴	I	57.4
	II	67.3

速度が遅ければ氷晶の数は少なくてもそれが成長して大きくなるから障害が大きいのであるとの単純な説明を下している。当研究所に於て今日まで得られた実験結果(根井⁶⁾・朝比奈⁶⁾)から生細胞における細胞内凍結の起る条件はある程度明らかにされたが、それらの実験に用いたのは比較的大きな細胞が多く、その中での最小のものは酵母であつて、これでも著者の試料である大腸菌に比較してはかなり大きく、かつ菌体内部構造も異なるものであるから、果して大腸菌の場合にも凍結の過程で酵母と同様の現象が起るとみなしてよいか否かは慎重に考慮しなければならない。かかる点については更に後でふれることにする。

3) 濃縮液による化学的影響説

細胞内液或いは菌体周囲のメジウムに凍結が起つて氷晶ができると液は濃縮されるので、細胞機能も亦その濃縮によつて化学的な影響をうけるというのである。

この場合に於ても細胞内凍結と細胞外凍結とを区別して、そのよつて来る障害の機序について充分の検討を行つたものは殆んど見当らない。著者の実験に於て主として蒸溜水浮游液を用いたのは、メジウムに於ける濃縮液の影響を除外できるようにとのねらいに外ならないのであつて、蒸溜水浮游液で細胞外凍結だけを起させるような条件にすれば、濃縮液による影響は除外して考えることができるわけである。

以上のような諸説並びに先人によつて報告された研究結果について、著者の得た実験成績からその当否を論じてみよう。まず著者の行つた範囲の冷却条件による低温処理の結果細菌が蒙る障害は、要するに菌液中に起る凍結という現象に基づくものであることは、非凍結の対照実験からみても明らかな事実であらうと思う。

次に種々の冷却条件とそれによる細菌障害度の差から考えて、更に徹視的観察を進めるならば凍結に伴なつて菌液内にどのような状態変化が起つたかを推察する必要がある。それにはまず第1にあげられるのは冷却速度と障害度との関係であつて、菌或いはメジウムのいかなる条件に於ても冷却速度の大きな方が常に障害度が大きいという事実については、前にも述べた様に当研究所に於ける他の多くの生細胞に関する凍結過程の分析的研究⁶⁾からみ、また当部門に於て行われた酵母についての形態的⁶⁾、機能的研究⁷⁾から考えても、急速冷却に於ては細胞内凍結が起りやすく、緩慢冷却の場合は細胞外凍結にとどまる可能性が多いと考えられる。

これらの引用例は次のような実験的事実から実証されている⁶⁾。即ち一般に生細胞で細胞膜の水の透過性のよいものでは、冷却速度の小さい場合、メジウムの凍結によつて細胞が脱水され、その結果細胞内液が濃縮されて過冷却度が大きくなり、細胞内凍結が起りにくくなる。

之に反して冷却速度が大きい場合はメジウムの凍結と殆んど同時に細胞内凍結が起るのである。然も細胞に対する障害は細胞外凍結のみのものよりも細胞内凍結も伴なうものの方が大きいことも確認されている。ただすでに述べたように、細菌のような微小な細胞に於ては果して細胞内凍結が起つているかどうかは未だに実証されていないが、やはり他の生細胞の場合と同様と考えた方が合理的なように思われる。

形態的観察についての唯一の報告者である Haines¹⁾ は凍結過程に於ける細菌の形態的变化をみとめていない。これは細胞が微小であるため測定上はつきりした差がみとめ難いことにもよるが、主として細胞膜が強靱であることから考えて、氷晶による細胞の機械的破壊 (Haines はむしろ細胞外凍結によるものと考えている) はみとめられないと言っている。結局 Haines は凍結融解直後における細菌の死滅については決定的な説明を下していない。

また Weiser²⁾ は単に各条件における細胞の死滅から推論して、細胞内凍結はみとめ難いと述べているが、その論拠としているところは、

- 1) 凍結温度によつて死滅度に差のないこと。
- 2) 0°C 以下での比較的高い温度で死滅度の高いこと (この附近では細胞内凍結は起らぬと考えている)。
- 3) -15°C ~ -180°C の範囲での温度の変動で殆んど死滅度の増加のみられないこと等。

大体以上の点にあるが、それに対して著者は次のように反論したい。

1) 細胞内凍結の有無は主として冷却速度によつてきまるので細胞内凍結が起るための一定の臨界温度があるわけでないから、凍結の温度で明らかな差が出来なくてもよい筈である。

2) 著者の成績ではむしろ高い温度では死滅度は低い。一方また温度は高くても冷却速度が大きければ細胞内凍結は起りうる。

3) 著者の実験成績もほぼ似たような結果を得たが、この点については後述する。

これらの点からしても、Weiser のように全然細胞内凍結を否定することには同意できない。

とにかく Haines, Weiser とともに急速凍結と思われる (冷却速度としては吟味していないが、冷却温度の低いもの) 条件の方が障害度が小さいという実験成績を得ているが、之は著者の得た結果とは根本的に相反する所見であつて、かかる差は如何なる理由に基づいて起つたものであるかはわからないが、強いて求めれば彼等は冷却条件を分析して与えていないこと、或いはメジウムが異なることなどによるのであろうか。

次に冷却速度をほぼ一定にして種々の温度まで到達させた場合について考えてみるのに、いずれの場合も多少の差はあるが、概して -20°C ぐらいまでは温度が低くなる程障害度が大きくなる傾向がみとめられる。

これは、この温度までは氷晶の成長の為に物理的、化学的な状態変化が続くからであろうし、次いで -30°C 乃至 -40°C を越して温度が低下するとほぼ平衡状態に達するので、もはや余り障害度に差は生じないものであろう。その中間の -30°C 前後の処で曲線の上では山を画き、やや生残率が良いような結果になっているのは如何なる理由によるのであろうか。Weiser の様に此の附近に細胞液の eutectic point があると考えて、それに何らかの根拠を求める外は今の処適当な解釈の道はない。

いずれにせよ到達温度による差異については、一定の明らかな結果は得られなかつた。更

に凍結による菌障害の機序を一層明らかにするため、Weiser にならい 0°C 以下でくり返し温度を上下させてみた。Weiser はもし細胞内凍結があるとすれば、温度を上昇させた場合、細胞内氷晶は細胞外氷晶よりさきに融解する筈であるから、その限界温度（細胞内氷晶だけを融して、細胞外氷晶を融さない温度）までの温度の上昇下降をくり返すことによつて菌がより多く死滅するようであれば、それは細胞内の凍結融解をくり返したためであつて結局細胞内凍結のあつたことを示すものと考へた。

ところが実際には温度の上下に拘らず殆んど変化しなかつたので、細胞内凍結の存在はみとめられないと述べた。しかし之は Weiser が細胞内凍結を起しても凍結融解をくり返さないかぎり生存するものと考えているからで、もし一たん細胞内凍結を起すと殆んど死滅するものであれば同一細胞が凍結融解をくり返しても新たな細胞が凍結しない限り全体としての生残率には大差がないことになる。従つて Weiser の細胞内凍結はないとの理由にはならないものとする。

著者の成績にもみられるように温度変動による障害があまり明らかでないということは、最初の急速冷却でも細胞内凍結を起さなかつた菌体は、周囲の氷晶によつて脱水されるためにますます凍結が困難となつて、温度の上下を反覆しても新たに凍結し始める可能性は少なくなるからであらう。しかし急速凍結の例でみられるように、対照よりもやや障害されるような傾向が事実としても、最高 -20°C までしか上昇させないのであるから蒸溜水であるメジウム中の氷晶の状態には殆んど変りはないはずであつて、結局このような影響は周囲の状態変化以外の因子にもとづくものとするしかないであらう。殊に -70°C までの上昇の場合の方がより影響があるような成績については、このような温度範囲での変動では如何なる部分に出来た氷晶であつてもその変形は殆んど考えられないことから、その解釈はますます難しくなる。

次に凍結融解を反覆すれば漸次生残菌が減少してゆくことは既に従来認められている處であり、著者の実験成績もまたそれらの報告と全く一致した。第1回の凍結に耐えた菌が第2回の凍結で障害されるのは、最初の処置でたとえ死滅するまでに至らなくても多少の影響を受けた結果、次の凍結によつて細胞内の凍結を起すか、或いは外圍の氷晶によつて障害されやすくなるのであらう。その死滅の割合が凍融の回数とともに漸次少なくなるのは種々の程度の抵抗性をもつた菌の菌液に於ける分布度を示すもので、回数を重ねるほど抵抗の弱い菌から順次死滅して生残菌が少なくなるからであり、或いは破壊された菌体から游出した菌体成分がいくらか保護膠質的に（例えば蛋白質をメジウムとした場合と同様に）作用するからであらうか。

なお凍結による菌の障害に関与する因子として、菌令、メジウムの種類等について多少の吟味を試みた。一般に細菌はその發育過程に於て物理的或いは化学的な種々の外界の条件に対する抵抗性に消長があり、發育初期から増殖期までの時期は概して抵抗性は弱いが、定常期以後培養日数を重ねるに従いある程度抵抗性を増すものである。

著者の実験に於ても大体それに近い傾向が見られるが、しかし一方陳旧培養の方が抵抗性

が低いとの報告⁵⁾もある。

またメジウムについては、著者がかつて発表したと同様に糖質、蛋白質等に保護作用がみとめられたが、その成績は従来の報告と殆んど同一の傾向を示している。この保護作用の要因は主としてメジウムの濃縮液に包まれることにあると考えられるもので、それから逆に想定すれば同じ冷却条件（主として緩慢冷却）での蒸溜水浮游液の障害は保護物質のない場合であるから、この場合の傷害がもし細胞内凍結のみによるものでないとなれば細胞外圍の氷晶による機械的影響ということも考えなければならないことになる。又前記のメジウムを用いた場合でも急速凍結の方が緩慢凍結より障害の大きいのは、やはり細胞内凍結が多くみられるからか或いは濃縮液と氷晶と菌体との関係が緩慢凍結の場合と異なるからであろう。

更に低温処理によつて生ずる菌体障害の機序を一層明確にするために、凍結を起さないような条件での検討を行つた結果、凍結が起らない限りはかなり急速に温度を降下させても、またある程度の低温まで下げても殆んど全く細菌に障害を来さないことから、低温処理による細菌の障害は主として凍結に伴なつて生ずる氷結晶に基づくものであることはまちがいのない事実である。

最後に長時間保存による貯蔵死については、Moran⁸⁾やHainesなどが比較的高い温度で(0°Cに近い)障害が大きいのは、試料中の非凍結液の変性に基づくものとみなしているが、細菌保存の場合にも細胞の過冷却保存による遅発死を考えてよいであろう。

さて凍結に伴なう細胞の障害を追究するためには、以上のような機能的な検査と平行して形態的な観察をも行う必要がある。然し細菌のような微生物を試料としたのでは、個々の菌体と氷晶との関係を調べる目的には余りにも対象が小さいので、光学顕微鏡での観察は容易でない。従つてこれまでは比較的大きな微生物、例えば酵母とか *B. megatherium* を用いての実験が僅かに報告されているにすぎない。そのうちで、Hainesは凍結時の菌体の大きさの計測では、氷晶による膨大がみとめ難いこと、凍融後の細胞の破壊像のみられぬこと、染色による細胞学的な変化のみとめられぬことから、細胞内凍結を否定している⁷⁾。しかし根井は酵母を用いての実験で冷却速度の大きい場合は細胞内凍結の起ることを凍結過程の顕微鏡所見⁹⁾でみとめ、また大腸菌に於ても凍結融解後の電子顕微鏡像から菌体の断裂破壊されている事実⁹⁾を確認しているので、著者の実験結果である大腸菌の機能的障害をこの形態的所見と対比して考えれば、やはりその主因は細胞内凍結にあるとみなした方が合理的なように思われる。しかし凍結に関与する条件を種々検討した結果は従来凍結融解死の原因とみなされている処の細胞外凍結による氷晶の機械的障害も無視出来ないようであるし、更にまた氷晶の影響だけでは説明のつかぬ場合もあつて、氷晶以外の因子の影響も考慮しなければならぬように思われる。

結 論

種々の冷却条件のもとに大腸菌浮游液を処理して、凍結によつて菌が障害される機序を主として生菌数の測定を根拠として検討した。

その結果

- (1) 冷却速度の大きい程、障害度は大きい、冷却温度による差は明らかでない。
- (2) 凍結融解をくり返えずと障害を増す。
- (3) -20°C 以下で温度の変動をくりかえしてもあまり障害は増さない。
- (4) 蛋白質液、糖液は菌体の凍融による障害に対して保護作用を示す。
- (5) 非凍結条件では殆んど障害がみとめられない。
- (6) その他低温処理に関連して2~3の事実をもみとめた。

以上の実験事実から、凍結融解による菌体の死滅は明らかに菌液の凍結に基づくものであり、特に主として細胞内凍結によるものであるが、その他細胞外圍の氷晶の機械的障害及び機序不明の因子も関係することがあると考えられる。

稿を終るに際し終始御懇篤なる御指導を頂いた根井教授に深甚の謝意を表す。更に常に絶大なる御援助、御協力を頂いた林助教授を始め当研究所各員に謝意を表す。

文 献

- 1) Haines, R. B. 1938 The effect of freezing on bacteria. Proc. Roy Soc. London, B., 124, 451.
- 2) Weiser, R. S. and Osterud, C. M. Studies on the death of bacteria at low temperatures. I. J. Bact., 50, 413.
- 3) Sherman, J. M. and Cameron, G. M. 1934 Lethal environmental factors within the natural range of growth. J. Bact., 27, 341.
- 4) Morrison, T. F. 1924 Studies on luminous bacteria. II. The influence of temperature on the intensity of the light of luminous bacteria. J. Gen. Physiol., 7, 741.
- 5) 根井外喜男 1954 酵母の凍結過程. 日農化, 28, 91.
- 6) 朝比奈英三 1948 生物の凍結過程の分析 V. 低温科学, 4, 85.
——— 1950 植物の生細胞の凍結過程と凍結した細胞の型. 科学, 20, 324.
- 7) 根井外喜男 外3名 1954 酵母の機能に及ぼす低温の影響. 日農化, 28, 94.
- 8) Moran, T. 1929 Critical temperature of freezing. Proc. Roy. Soc. London, B, 105, 177.
——— 1930 Bound water and phase equilibria in protein systems. Ibid., 118, 548.
- 9) 根井外喜男 外1名 1955 凍結融解による細菌体の破壊. 科学, 25, 36.
- 10) 根井外喜男・佐藤徹・有馬純 1951 生物學的材料の凍結乾燥法, (6) 種々なメデウムを用いた細菌浮游液の乾燥. 低温科学, 8, 179.

Résumé

Experimental studies were made to investigate the mechanism of death of bacteria by low temperature treatment, utilizing a plate count method for determining the viability of the organisms, *Escherichia coli* in suspensions, subjected to low temperatures under various conditions of cooling.

The results obtained are as follows:

1) The more rapid the rate of cooling, the more marked is the mortality due to low temperature injury, while the amount of temperature lowering does not vary the death rate to an appreciable extent.

2) Survival rate is progressively decreased as the suspensions are repeatedly frozen and thawed.

3) Repeated fluctuations of temperature of frozen suspensions ranging from -20°C to -180°C bring about no remarkable deviation in mortality from the case of freezing without fluctuations.

4) Protein or sugar solutions as suspending media show the protective effect on bacteria against damage from freezing.

5) Even if the suspensions are cooled below 0°C , destruction of bacteria does not occur as long as they are in the unfrozen, supercooled state.

6) Besides, some facts concerning low temperature injury are also revealed.

As a result of studies which have so far been carried out, it is recognized that the death of bacteria by low temperature treatment is essentially due to freezing of bacterial suspensions, especially due to intracellular freezing of organisms. It is, however, to be taken for granted that the mechanical destruction caused by extracellular freezing and also some unknown factors might possibly exert partial influence upon the low temperature injury of bacteria.