HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	凍結融解又は凍結乾燥による Bacillus megatherium の形態的並びに機能的変化について
Author(s)	佐藤, 正一
Citation	低温科學. 生物篇, 16, 107-127
Issue Date	1958-12-05
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/17613
Type	departmental bulletin paper
File Information	16_p107-127.pdf

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

Shoiti SATO 1958 Morphological and Functional Changes of *Bacillus megatherium* caused by Freeze-Thawing or Freeze-Drying. *Low Temperature Science Ser.* **B, 16.** (With English résumé p. 125)

凍結融解又は凍結乾燥による *Bacillus megatherium* の形態的並びに機能的変化について*

佐　藤　正　一
(低温科学研究所　医学部門)

(昭和 33 年 7 月受理)

I. 緒　　言

微生物は凍結とか凍結乾燥などの低温条件に対して，一般に割合強い抵抗を示すものであることが知られている[1),2)]。しかし抵抗が強いとはいつても多少の障害をうけることは免れない。このような凍結による障害については，従来いろいろの検索が行われているが，その機序についてはまだあまりはつきりしていない。著者等の教室に於いても，これまでに大腸菌や酵母などを用いて，凍結や凍結乾燥による形態的[3)~7)]或いは機能的[8)~10)]な変化の観察が行われており，著者もまたその点を明らかにしたいという目的で，特に *Bacillus megatherium* を使用して検討を試みた。

Bac. mega. は形態が比較的大きく，しかも細胞内構造について既にかなりの知見が得られているものであるから，この種の実験に用いる細菌としては好適のものと考えて採用した。特に形態的機能的観察を平行して行うには都合がよいと考えられる。

著者はこの *Bac. mega.* を実験材料として使用し，凍結融解又は凍結乾燥によつて菌体が蒙る障害の機構を，種々の検索方法を利用して出来るだけ広い見地から検討してみたので，その結果について記述する。

II. 実験材料並びに方法

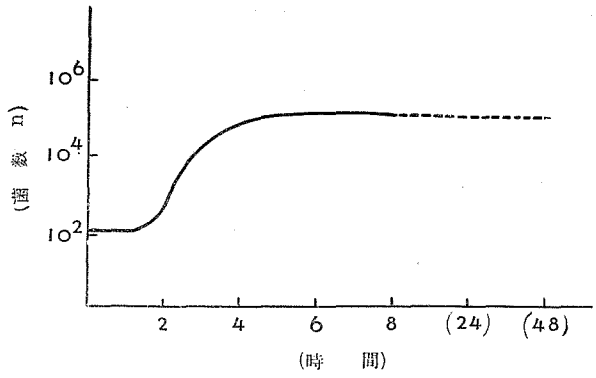
1. 材　料　　東大応用微生物研究所より分譲された *Bac. mega.* 株を保存培養して使用した。

2. 培養方法　　培養には肉エキス・ペプトン寒天培地を用いた。先ず保存菌株を 37°C に 15 時間毎に 3 日以上累代培養しておき，各実験のたびにそれから更に植えついで所要時間培養した菌をかきとり，滅菌蒸溜水に浮游させて遠心沈澱し (3,000 r.p.m. 30 分)，これを 3 回くりかえして菌を洗滌し，最後に適当な菌濃度にして実験に供した。菌濃度の測定は予め秤量

* 北海道大学低温科学研究所業績　第 445 号

瓶で湿菌重量を秤つた菌浮游液を標準として，比濁法によつて行つた。

本実験のような外的条件に対する菌の抵抗性をしらべる実験に於いては，被検菌の生理的状態を考慮しておく必要がある。例えば，対数的増殖期にあるものと，休止期にあるものとは，凍結融解や凍結乾燥の処理に対して各々その抵抗性も相当異なるものと思われるので，適当な発育過程にある菌を選択するために，先ずこの菌の発育曲線をもとめてみた。それにはブイヨンで24時間培養菌1ccを予め37℃に保存してある100ccのブイヨンに加えて培養し，30分毎にその1部をとり出しplate count 法により菌数をもとめ，発育曲線を得た（第1図)。



第1図 Bacillus megatherium の発育曲線

これによると，始めの1時間位は殆んど菌の増殖はみられないが，1.5時間頃より急激に増加して，6時間位で生菌数は最高に達する，その後増殖は停止して菌数の増減がなく，24～48時間での殆んど変化はなく，僅かに下向きの傾向を示すもののようである。このような発育曲線より，3時間と15時間培養のものを使用することにした。

一般に発育初期の菌は外界の諸条件に対して抵抗が弱いとされているので，本実験に於いても3時間培養のものは凍結などによる諸障害をしらべるのに適当であるが，ただ大量の菌を必要とする場合には15時間培養のものを用いて実験した。

3. 凍結融解並びに凍結乾燥の処理方法　これら実験目的によつて適当な時間培養を行つた菌を前記のようにして菌液とし，液体空気で凍結を行つたあと，凍結融解処理のものは室温又は11～13℃の流水に浸して融解し，凍結乾燥処理のものは引続き凍結乾燥機に接続して乾燥を行つた。なお後述のように，形態的観察の場合はデシケーターを，また機能的観察の場合は多岐管式を利用し，いずれも油廻転真空ポンプ及び液体空気の凝結器を具えた装置を用い，真空度 10^{-2} mmHg で5時間乾燥を行つた。

a) 細胞学的観察材料の実験方法　先に述べたように，一般に発育初期の菌は抵抗が弱いとされているので，3時間培養菌で0.5 mg/cc 濃度の蒸溜水浮游液をつくり，その1白金耳をカバーグラス上にとり，そのまま液体空気に入れて凍結し（約4秒前後で気泡が出なくなる)，凡そ10分後にとり出し室温に放置して融解した（完全に融解するには約2分を要する)。これを必要に応じて1～5回繰返した。更に室温において空気乾燥するのであるが，余り乾きすぎると対照の正常菌でさえ原形質が細胞膜から剝離するので，これが凍結処理によるものか，又は空気乾燥によるものであるか紛らわしくなる。そこで外見上大体乾いたと思う時にすぐ次の固定に移つた。

又凍結乾燥では同じようにして凍結したカバーグラスを，途中で融解することのないよう出来るだけ早く凍結乾燥に接続したデシケーター中に移し，直ちに乾燥を開始した。凡そ15～20分で外見上ほぼ乾燥は完了するが，5時間まで行つた。また乾燥過程は室温において特に周囲から冷却はしないが，途中で融解していないことは確認できた。

以上のように作つた試料はいずれも1% OsO_4 蒸気で2分間固定したあと染色を行つた。なお凍結融解処理の菌で特殊な形態観察には3時間培養の菌を寒天培地のままとり出し，ブロックに細分し菌面を下にしてカバーグラスの上に載せそのまま凍結融解を行い，OsO_4 蒸気で4分間固定したあと寒天をはがして空気乾燥した。

染色法は，観察の目的によつて数種の方法を採用した。即ち，細胞壁及び隔壁に対してはBisset & Hale 法[11]を改良した方法，細胞質には basic fuchsin の単染色法，細胞核に対しては Smith の方法[12] (Robinow[13] の核染色法の改良法) を採用して行つたのであるが，詳細についてはそれぞれの項で説明する。なおこれら形態的観察には出来るだけ同一条件にして処理する必要があるので，カバーグラスを互いに塗抹面を外側にしてゴム輪で張り合せて処理した。

このようにして作つた染色標本は特殊な場合を除き水でマウントし油浸で検鏡した。

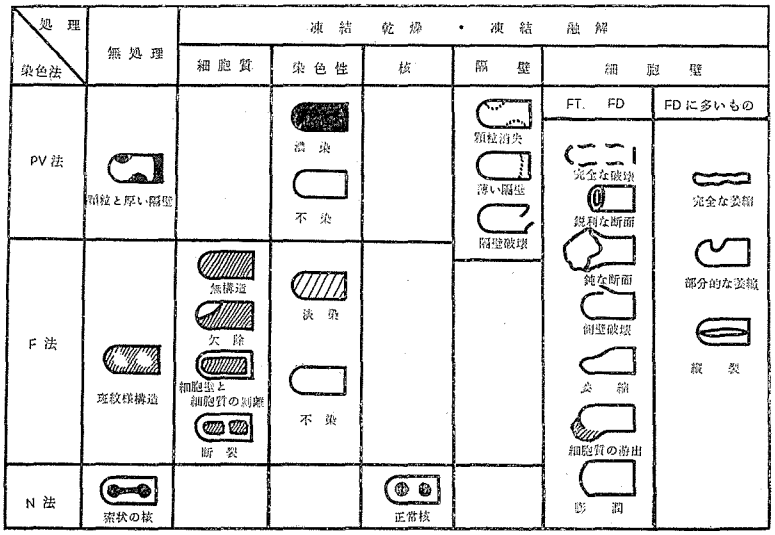
b) 機能的観察材料の実験方法　前述のようにして作つた菌液を小型 (径 11 mm) 或いは中型 (径 16 mm) 試験管に1 cc ずつ分注し，凍結融解にはそのまま液体空気に入れて凍結し (この際約3分で凍結するがなお10分間放置した)，凍結乾燥には特別に製作した凍結乾燥用平底アンプル (径 10 mm・高さ 70 mm) に菌液を1 cc 入れて液体空気を以て予備凍結し，直ちに凍結乾燥の多岐管にとりつけて室温で乾燥した。約2時間でほぼ乾燥は終了するが，念のため5時間行つた。この凍結乾燥菌の性状をしらべるためには蒸溜水を1 cc 加えて再び菌液として次の実験に使用した。凍結乾燥の場合稀薄な菌液を用いて乾燥を行うと，乾燥過程中に菌体が飛ぶ危険性があるので，その点を考慮して 10 mg/cc 以上の濃度の菌液を用いた。

形態的観察と機能的観察とでは，実験条件をなるべく同一にしてよく比較検討する必要があるが，上記のようないろいろの実験上の制約もあつて，必ずしも同一条件というわけにはいかなかつた。

III. 細胞学的観察の成績

A) 凍結融解及び凍結乾燥による細胞の機械的破壊　一言にしていえば様々な種類の破壊像がみとめられた。前述の特殊な染色法によつて始めてみられるものもあり，また細菌の普通染色法によつてわかるものもあつた。その破壊様式を簡単な模式図に表わすと第2図の通りで，わずかに細胞壁の残骸を認めるにすぎないくらいの大きな破壊をうけたものから，外形上著しい変化は認められないが僅かに細胞質が菌体外に游出しているか，或いは細胞自体軽度の膨潤又は萎縮がある程度の極めて僅かの障害のものに至るまで種々の段階が観察される。

これらのうち比較的多くみられる細胞の破壊像としては，先ず鋭利な切断面をもつて輪切りにされたような細胞がみられることである (**図版 I–1**)。又このような鋭利な切断面をもつた



第2図 凍結融解・凍結乾燥処理にみられる破壊様式

ものとはちがつて，ひきちぎつたような断面で細胞壁が不定形に大きく開いたようなもの（**図版 I–2**），又全く逆に小さく萎んだ形をもつた破壊細胞もみられる（**図版 I–3**）。これらは何れも細胞内成分のみえない場合が多いが，時には細胞壁は消失しても内部の細胞質が残つているようなものもある（**図版 I–4**）。このような破壊は細胞の中央部・両端部何れを問わずみられる。更にもう少し程度の弱いものとしては，単に細胞の側壁が部分的に破壊されており，その破壊口の小さいものからやや大きいものまでのいろいろの段階のものがある（**図版 I–5**）。このような細胞壁の破壊とはちがつて，菌体の一部が萎縮したような形状を示すものがある。又あまりはつきりした破壊口は認められないのに，細胞質が菌体外に游出したかのような様相を呈するものもみられる（**図版 I–6**）。以上は凍結融解処理によつてみられる形状の変化の代表的な例である。

次に凍結乾燥処理の結果みられる変化で，しかも比較的特徴のあるものは，細胞の部分的な萎縮像である（**図版 I–8, 9**）。更に程度の進んだものでは細胞全体にわたつて完全に萎縮したものがみられることである（**図版 I–10, 11**）。このような像を観察するためには，乾燥が終了して常圧に戻す際に出来るだけ早く OsO_4 蒸気で固定しなければならない。又細胞壁の破壊として凍結乾燥で特に多くみられるのは細胞の長軸に沿つた縦裂と思われるものであるが，これは凍結融解ではごく稀にしかみられない（**図版 I–12**）。これらの種々な変化の程度を，凍結融解1回処理のものと，凍結乾燥5時間のものとで比較してみると，凍結乾燥による形態的変化は凍結融解によるものより少ないように思われた。

以上の変化は染色度の多少の差はあるが，何れの染色法によつてもみられるものである。本実験では特に細胞壁・隔壁・細胞質・細胞核などの凍結による形態的変化を観察する事を主な目的としているので，それぞれ特定の染色法を利用して検索した。

B) 凍結融解及び凍結乾燥による菌体構造の変化

1) 細胞壁及び隔壁　細胞壁は細胞の外部を形成しているものであるから，凍結融解や凍結乾燥などの処理によつて比較的障害をうけ易いであろうと想像される。しかし，細菌体に於いては細胞壁はかなり強靭であるといわれているので，果してこれらの処理によつてどの程度の障害をうけるものであるかは興味のあるところである。この細胞壁の染色法として著者は Bisset 等[11] の方法をとりあげた。彼等の述べるところによれば，媒染剤として1% 燐モリブデン酸を用い，3～5分間処理したあと1% Methylgreen で同じ時間染色してかなり鮮明な細胞壁や隔壁をみているようである（**図版 I–13, 14**）。著者はこの Mythylgreen の代りに Victoria blue を試みたところ，一層鮮明な細胞壁と隔壁の像を得ることが出来た（**図版 II–17**）。即ち，1% 燐モリブデン酸で15分間処理したあと流水で充分洗滌し，次に0.05% Victoria blue で40秒間染色する方法が最も適しているように思われた（以下この方法を PV 法と称する）。

このような改良染色法を利用して観察し得た結果のうち，凍結融解や凍結乾燥による比較的特異な変化としては次のようなものがあげられる。

1) 対照の無処理の菌体内には顆粒がみとめられるが（**図版 II–17**），凍結融解や凍結乾燥の処理をうけるとこれらの顆粒が殆んど消失する（**図版 II–18**）。しかも凍結融解の回数を重ねるほど顆粒の消失した細胞の数が増すという傾向があつた。

2) 次に対照に比べて隔壁の厚さが薄くなつたようで不鮮明のものが多い（**図版 II–18**）。

3) 又細胞全体としての染色性が増して濃染するものがみられる（**図版 II–20, 21, 22**）。

これらのうち顆粒について更に詳細に観察してみると，これらの顆粒は個々の細胞についてはその中央部よりやや偏つた位置にあつて，而も細胞壁の内壁に接し，その形状は扁平・半円形乃至紡錘形をなして（**図版 II–23**），その尖端部は中心に向つているようであり，大さも大小さまざまで，小さい場合は数が多く扁平で，大きいときは数は少なく紡錘形をなしているようである。

以上のような所見からみて，顆粒は隔壁とかなり密接な関係を有するものと考えられる。

このような顆粒或いは隔壁が凍結融解や凍結乾燥によつて消失するのは，一つにはこれら処置によつて直接細胞外に游出してしまうことの外，媒染剤の化学的作用によるのではないかとも考えられる。後者では細胞壁の透過性の変化がおきた結果，対照に比べて燐モリブデン酸が早く細胞内に浸入するため，作用時間や量が増すということである。その点を吟味する目的で，対照菌で媒染剤を作用させる時間を長くしたり，濃度を増して実験してみたが，この結果は写真19に示したように幾分顆粒を有する細胞が減少したように思われる程度で著しい相違はみられなく，殆んど大部分の細胞は正常のまま残存している。従つて媒染剤の化学的な作用のため消失するのではなく，凍結融解或いは凍結乾燥そのものの影響により変化を受けたものと考えられる。

以上述べたような細胞壁の形状の変化のある菌とない菌との割合を正確に算定することは困難であるが，検鏡の際任意の視野数カ所より算出してみると，変化のあるものは凍結融解で

は約11% であつた。又顆粒の消失する割合は60% であつた。

2) 細 胞 質　細胞質に対しては現在のところこれだけを特異的に選択染色する方法はみ当らない。普通に用いられる染色剤はそれが酸性色素でも塩基性色素でも，細胞壁に強い親和性があるため細胞質の観察には適さないようである。それ故成るべく細胞壁に対しては親和性が弱く，而も細胞質に対しては強い親和性をもつているような染色剤を選ぶ必要がある。このためいろいろな色素を用いて検討した結果，本実験では OsO_4 蒸気で2分間固定したあと，1% basic fuchsin で40秒間染色したものが比較的好結果を得たように思われた。この染色法(以下F法と称する)を用いて染色したものでは細胞壁は淡染し，細胞質は割合によく濃染される。而も適度に濃染された細胞質は一様な染り方を示さず，斑紋様に濃い部分と淡い部分とに分れて観察される。このような斑紋様の構造を示すのは，細胞構成成分のこの色素に対する親和性が同一でないことによるもので，特に核の色素に対する親和性が細胞質のそれより少く，そのため細胞質の内部に比較的光の透過性のよい明るい部分として現われるのであろう。このことは核染色法による核の位置及び形状とほぼ一致していることからもわかる。

このF法を利用する事によつて対照の正常細胞では斑紋様構造がみられるが(**図版 III–27**)，処理細胞では一様な無構造な様相を呈するものが多くなる(**図版 III–28**)。勿論処理をうけた細胞でも斑紋様構造を示すものもあるが，しかしこの場合対照に比較するとあまりはつきりしない。

その他細胞質自身の変化としては，膨潤した細胞壁に伴つて細胞質が菌体内を満している場合があつた。この点ではF法だけでなく前述したPV法によつても同じような結果が得られた。又細胞壁から離れて萎縮した像を示す場合がある。このような剝離萎縮像もその程度のごく僅かなもの，即ち細胞端・側壁・細胞接合部などのごく一部に局限されているものより，側面全体にわたる割合範囲の広いもの，又両側面全体にわたつている場合など，いろいろの段階があるようである。

これらの剝離萎縮像とはちがつて，細胞質の一部を欠除しているような状態のものがみられる。この様なものは剝離萎縮像と類似しているが，剝離萎縮しているものはその境界が明瞭であるが，欠除している場合は不鮮明である故区別出来る。

次に細胞質が部分的に断裂して細分されたものもある(**図版 III–30**)。このようなものは殆んど大部分が長軸に対してほぼ直角に分断されており，その数も2個位が最も多く，又切れる位置も大体隔壁か或いはそれが生ずると思われる所あたりに多いようである。

又破壊された細胞壁より細胞質が露出しているような状態のみられることは既に述べた通りであるが，このような一部細胞質の游出したものに対して，細胞壁は破壊されていないようであるが，その外側に細胞質と思われるものを附着している状態のものをしばしば観察した。

凍結融解を5回行つたものでは，障害を余りうけていないと思われる細胞と共に，破壊された細胞壁片など混在している不定形の顆粒様物質がみられるが，これらは細胞質の破壊されたものであろうと考えられる(**図版 III–30**)。これはF法ばかりではなく前述のPV法によつて

も同じく観察できる（**図版 III–31**）。PV 染色法によると凍結融解や凍結乾燥処理をうけたものでは，処理の対照にはみられない濃染細胞が出現することは前述した通りであるが，このF法を使用して染色した場合には，PV 法とは逆に凍結処理菌に淡染する細胞が多くみられるようになる（**図版 III–27，28**）。

なお特殊な固定，即ち寒天ブロック上で処理し，そのまま固定を行つたものでは，破壊された細胞壁口から gel 状の細胞質が游出しようとしている状態がみられる。この場合特にブロックを薄くし（約 1～2 mm），OsO_4 蒸気による固定は普通よりやや長時間（約 4 分間）行う方がよい結果が得られるようであつた（**図版 III–32～35**）。

このようなF法によつてみられる細胞質の変化があるものとないものとの割合は，PV 法の場合と同様正確な算出は困難であるが約 51% みることができる。

3）細胞核　Smith[12] は Robinow[13] の核染色法を改良した方法を用いて *Bac. mega.* の核についてしらべ，その形状を記載している。著者はこの Smith の核染色法を利用して，核が凍結融解や凍結乾燥などの処理によつてうける変化を観察した。即ち 3 時間培養の菌を蒸溜水で浮游液とし，これをカバーグラス上にとり，室温乾燥後直ちに OsO_4 の蒸気で 2 分間固定し，その後 50°C の 1N 塩酸で 10 分間処理し，水洗後 1% ホルマリン溶液に 3 分間つけ，再び水洗後 1% basic fuchsin で 30 秒間染色した。この方法（以下 N 法と称する）によつて観察される核の形状は，1 分節中に 2 個の核があつて，形は亜鈴状である。これらの核は互いに独立していてその間に連絡はみられないものが多いが，僅かではあるが索状に連絡しているものもある。

凍結融解を行つた菌の核は対照のものと殆んど差は認められないようである。即ち核はその形状・大さ・染色性について著しい変化はみとめられないが，ただ対照に僅かながら認められる核と核との間の索状のものが，凍結融解又は凍結乾燥の処理を受けることにより消失するか，或いは少なくなるように思われる（**図版 III–36，37**）。

次に特に注目すべき点は，核染色法の塩酸処理の時間を短縮した場合，対照の菌では鮮明な核の像は得られないのに，処理をうけたものでは比較的鮮明な核の像がみえることである（**図版 III–38，39**）。このような現象は細胞壁の透過性の増大，或いは他の機能的な変化と関連して興味あることと思われるので，後でまたふれることにする。

以上細胞壁・隔壁・細胞質・核などについての形態的な観察の結果について述べたのであるが，凍結融解に於いて 1～5 回と処理を繰返すことは単に障害を受ける細胞が多くなるいわゆる「量的関係」の変化のほかは，特に質的な差を生ずるようには思われない。又このような凍結融解と凍結乾燥の処理による形態的変化の差異としては，形状の変化の極く一部（縦裂・萎縮細胞の出現）を除いては特に著しい差は認められなく，ほぼ同じような変化がみられるように思われる。

又塩酸処理だけでなくエーテル処理によつても凍結による障害の様相を観察することが出来る。例えばエーテルの中に 48 時間つけて，その後充分水洗し，前述の PV 法により染色して

みると対照に比べて形態上著しい変化をみることが出来た（**図版 IV-40, 41**）。即ち凍結処理したものでは無処理のものに比べて細胞全体著しく膨潤しており，しかも細胞壁と細胞質との間は剥離をおこし，細胞質は隔壁により僅かながら断裂しているような所見が得られた。

IV. 生化学的観察の成績

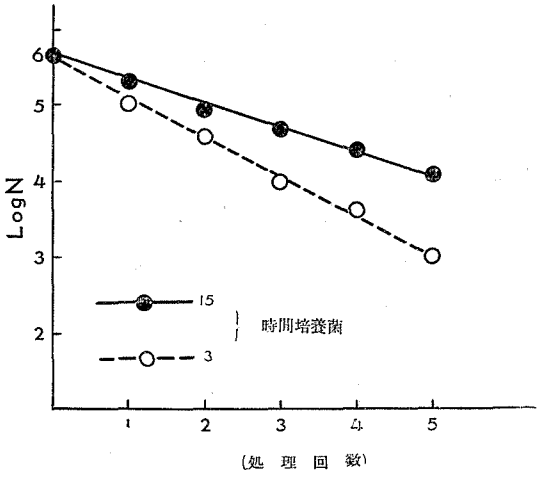
凍結融解や凍結乾燥などの低温処理の際にうける細胞の障害，即ち，細胞壁・隔壁・細胞質・細胞核などの変化を形態的に観察して，それぞれ相当障害を与えていることがわかつたが，次にこれらの細胞の機能的な方面，特に生化学的な面での変化をしらべてみた。

1) 凍結融解並びに凍結乾燥の生残率に及ぼす影響

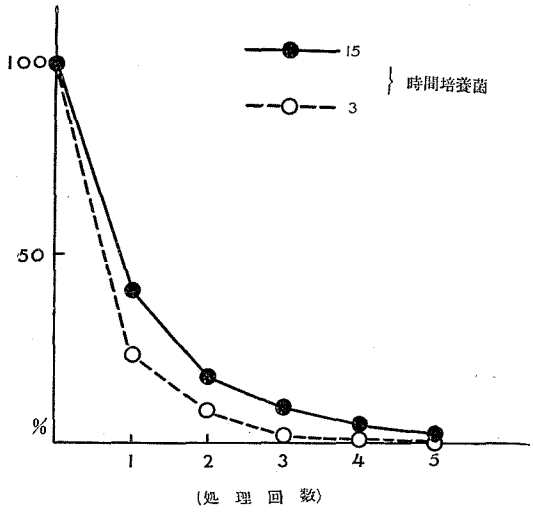
形態的観察と機能的観察とではそれに必要な菌量は必ずしも同一ではない。例えば形態的には各1単位の細胞について観察するのに反して，機能的には細胞の総量を以て検索しなければならないことが多いからである。

生残率の検索に際しては相当多量の菌を必要とするので，すべて平板培地を用い3時間並びに15時間培養したものを0.3 mg/cc 及び 0.5 mg/cc の菌液とし，各1～5回迄凍結融解の処理を加え，凍結乾燥には5時間乾燥したものを使用して，それぞれ無処理のものを対照として plate count 法によつて生残率をしらべた（平板上に発育するコロニー数が大体100～500くらいになるように適宜の稀釈を行つた）。

この生存菌数を対照に対する百分率で示したものが第3図である。これによると凍結融解の回数とともに生残率は漸次低下するが，各回共3時間培養のものより15時間培養のものの方が生残率が高い。これは若い細胞より古い細胞の方が凍結融解に対して抵抗が強いという従来の知見と一致するもので，*Bac. mega.* についても同じことが云えるようである。



第3図 凍結融解による生残百分率



第4図 凍結融解による生残数

この曲線は縦軸を菌数の対数にとつて表わすと第4図のようになる。

3時間，15時間培養のもの，共にほぼ直線を示して等比級数的に低下することを示している。これは要するに凍結融解で生菌数は漸次減少し，しかも障害を受けて死滅した菌は生菌に対して保護的な作用を与えていないことを示し，また3時間と15時間培養のもので開きが増してくることは，培養時期により抵抗性が多少異なることを意味しているものと考えられる。

一方凍結乾燥による生残率をみると，3時間培養菌では対照に比べて20.3%の値を示している。これは凍結融解の生残率に比較してみるとほぼ1回の処理に相当するようである。又15時間培養菌では30.3%で同様に第1回の処理に相当している（第1表）。

第1表　凍結乾燥による生存率

	対　照 (%)	凍結乾燥処理 (%)
3時間培養菌	100	20.3
15時間培養菌	100	30.3

何れの処理に於いても古い培養菌の方が若い培養菌に比べて生残率はよく，凍結に対して抵抗性の強いことを示している。

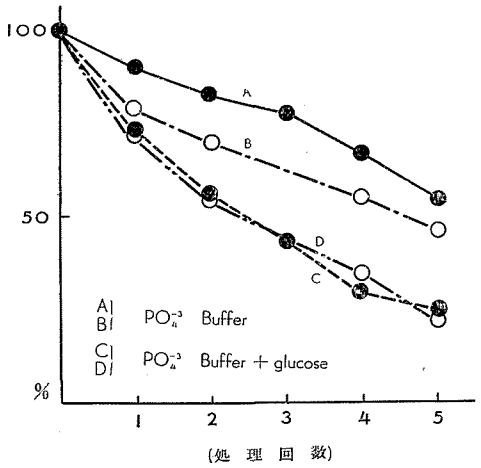
2)　凍結融解，凍結乾燥の酸素呼吸に及ぼす影響

機能的には生残率に対して相当障害を与えることがわかつたのであるが，これらの処理が細胞の自己呼吸やグルコースを基質とした場合の酸素呼吸に対してどのような影響を与えるものであるかを，Warburg 検圧計を使用してしらべてみた。

この実験に於いても多量の菌を必要とするので，15時間培養の50 mg/cc 菌液を使用し，37°C で1時間測定した。即ち，50 mg/cc 菌液に自己呼吸測定には pH 7.0 の燐酸緩衝液を加え（A液），基質呼吸には3%の割合にグルコースを含有させた燐酸緩衝液（B液）を加えた。

1)	主　室	50 mg/cc 菌液	1 cc
		A 液又は B 液	2 cc
2)		20% KOH	0.5 cc

このようにして得られた結果は第5図に示したように，1) 自己呼吸，基質呼吸共に凍結融解を重ねることにより漸次処理回数にほぼ比例して低下する傾向を示した。2) 自己呼吸の場合より基質呼吸の方がその低下度は著しいようである。即ち5回の凍結融解の処理で自己呼吸は50%に低下するのに反して基質呼吸では25%である。3) 又これら障害をうけた菌の酸素消費量の低下の割合を生残率のそれと比較してみると，生残率よりはその障害は著しくないようである。



第5図　凍結融解による呼吸低下の百分率

一方凍結乾燥の処理によつてうける酸素呼吸能の変化としては第2表に示したように，基質のないのは無処理のものに比べて58.8%に低下しており基質のある場合は84.1%に低下し割に障害は少いようである。障害のうけ方と基質の有無との関係は凍結融解の場合と全く逆な値を示している

第2表　凍結乾燥による酸素呼吸低下の百分率

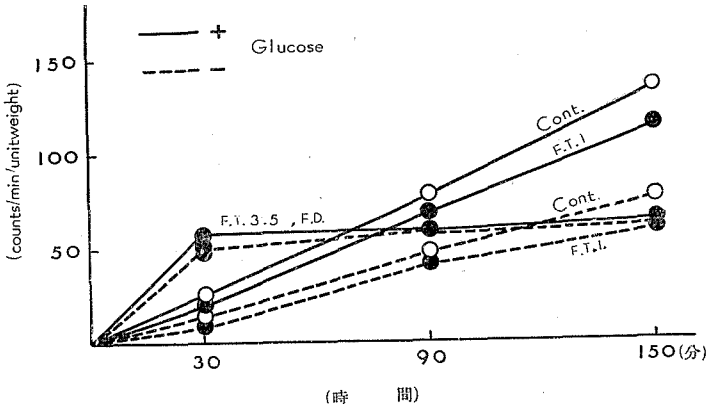
	対　照 (%)	凍結乾燥処理 (%)
基質の無い場合	100	58.8
基質の有る場合	100	84.1

3)　凍結融解，凍結乾燥の酸化的燐酸呼吸に及ぼす影響

既に述べたように生残率に与える影響と，酸素呼吸能に与える影響とはほぼ同じ傾向を有するが，しかし，一致した成績を得なかつた。

呼吸はそれと共軛しておこる燐酸化を通じて細胞の生存に影響を及ぼすことが知られているが[14]，普通は呼吸と燐酸化がうける障害の程度とは必ずしも一致しないものである。それ故$P^{32}O_4$を使用して呼吸と同時におこる燐酸化，即ちP^{32}の細胞内に導入される割合を測定することにより，酸化的燐酸化の面から追求してみた。

この実験に於いても相当多量の菌を必要とすることは酸素呼吸の場合と同様であるので，15時間培養の50 mg/cc菌液を使用した。これらの菌液を小試験管に2 ccずつ分注して，おの



第6図　P^{22}の吸収及び交換の速度

第3表　P^{32}吸収及び交換の速度 (counts/min/unitweight)

	30分		90分		150分	
	グルコース		グルコース		グルコース	
	(+)	(−)	(+)	(−)	(+)	(−)
対　照	25	16	78	49	137	78
凍結融解1回	21	13	69	44	116	66
〃　3回	55	52	58	60	66	65
〃　5回	56	55	57	60	63	62
凍結乾燥	—	—	60	58	60	91

おのを1, 3, 5回の凍結融解と凍結乾燥5時間の処理を行い，37°Cの恒温器の中に保存し，これを30, 90, 150分毎に取出して蒸溜水で3回遠沈洗滌し (9,000 r.p.m. 15分)，金属皿に移し，風乾してから G.M. Counter で測定して P^{32} 導入の速度を求めた（第6図，第3表)。

この図に示されるように，1) 基質のない条件に於ける P^{32} 導入の割合と基質のある場合の導入とは，基質の有無にかかわらず同じ傾向を示して，時間と共に漸次増大してきている。2) 凍結融解1回処理したものについてはいずれも約15% 前後の能率低下がみられる。即ちこれは基質の有無にかかわらず燐酸化は呼吸と同程度の障害をけることを示している。3) 凍結融解3回以上或いは凍結乾燥5時間の処理をうけた細胞では，最初の30分間で細胞内の P^{32} の量は最大値に達して，その後は平衡状態となり，P^{32} の導入は殆んどみられないようである。

これらの所見から考えられることは，呼吸系に与える障害と同時にそれと共軛しておこるところの燐酸化系に対しても同様な作用を与えているものと思われる。しかし3回以上処理したもの，及び凍結乾燥処理したものに於いては機能的燐酸化とは関係のないと思われる P^{32} の自由拡散現象（この現象は，死滅した菌に対する凍結或いは乾燥の2次的な効果としておこる細胞壁の透過性増大によると考えることにより説明されるであろう）が現われてきたようにみえる。

この様に酸素呼吸能や燐酸化能がうける障害と，先に述べた生残率の低下との間には直接的な関係がみられない。呼吸系以外の機能，例えば細胞の合成系なども凍結融解や凍結乾燥などの処理によつて，より強い障害をうけているのではないかと考えられる。

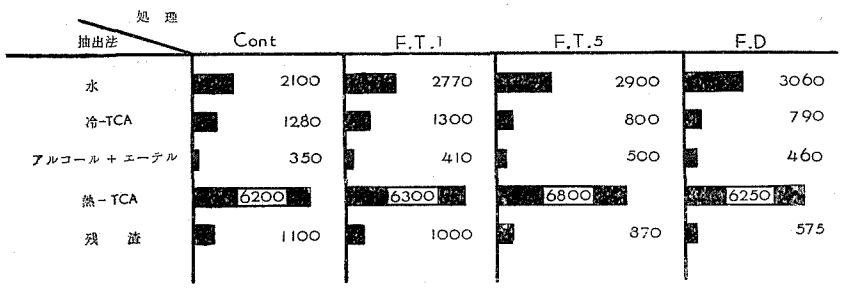
4) 細胞の構成物質に及ぼす影響

従来の多くの報告や本実験の P^{32} の導入に関する結果などから，凍結融解や凍結乾燥の処理によつて細胞壁の透過性に著しい変化の生ずることは容易に理解し得ることであるが，しかしこの透過性の変化は細胞膜の構造のどのような変化に対応するものであるかについてはまだ余りよくわかつていない。

他方凍結融解或いは凍結乾燥が細胞構成物質の溶解性，被抽出性に対して，どのような影響を与えるかについてもよく知られていないようである。これらの点を明らかにするために次のような実験を試みた。

P^{32} を含む培地に15時間培養して得た菌体を，前述の通り3回遠沈して洗滌し50 mg/cc の菌液を作る。無処理の対照と凍結融解1回，5回のもの，及び凍結乾燥を行つたものについて Schneider 法[15),16)] によつて抽出分劃を行い，各分劃中の P^{32} の強度を測定した。なおこの際混在する無機の P^{32} の activity は菌体内の P^{32} の activity の 1/1,000 以下であることを予め測定により確めておいた。

その結果は第7図，第4表に示すように，水溶性物質として抽出されるもの（これには24時間蒸溜水で抽出した）は凍結乾燥処理を行つたものが最も多く，凍結融解5回，1回が之に次ぎ，無処理のものが最も少ないようである。残渣分劃に於いては水溶性分劃の場合と多い少ないの順序は全く逆な関係を示している。有機溶媒に抽出される P^{32} はいずれも無処理のもの



第7図 凍結融解及び凍結乾燥処理による細胞組成の変化
(数字は P^{32} の relativectiity を示す)

第4表 凍結融解及び凍結乾燥処理による細胞組成の変化 (百分率)

	対照 (%)	凍結融解1回 (%)	凍結融解5回 (%)	凍結乾燥 (%)
水	19.1	23.5	24.4	27.5
冷-T.C.A	11.6	11.0	6.7	7.1
アルコール＋エーテル	3.2	3.4	4.2	4.2
熱-T.C.A	56.3	53.5	57.3	56.1
残渣	10.0	8.5	7.3	5.2

に比べて著しい差は認められず，熱-トリクロール醋酸 (TCA) 抽出分劃はほぼ同じような値を示し，冷-TCA 抽出分劃に於いては凍結乾燥が最も少なく残渣分劃と同じような傾向を示しているが，その差は余り著しくないようである。しかし酵母などではこの分劃の水溶性化は知られているようである[17]。

以上のような成績から水溶性分劃中に含まれる P^{32} の化合物は一体どのようなものであるか，これを確めるために更に次のような実験を行つた。即ちこの分劃を風乾して5：1ブタール醋酸 (水飽和) を溶媒とし，ペーパークロマトグラフイを行い，ラジオオートグラムをX線フィルム上に48時間感光させて得たものが写真44である。

この写真で示されているように，おのおの原点とそれより僅か上方とに2種の強いスポットをみることが出来る。この部分の物質はニンヒドリン陽性であることから，蛋白又はペプチドであり，無処理の菌からも溶出されるが凍結処理によつて溶出が促進される性質のものであると考えられる。

このような結果は，1) *Bac. mega.* 細胞は菌液として放過された場合，時間と共に含燐ペプチド或いは蛋白を放出する。2) 凍結融解或いは凍結乾燥などの処理はこの放出を促進することを示しているように思われる。

形態的になおこのことを裏付けるために，α-アミノ基の分布状態を Berg のニンヒドリン試験[18]を利用して検索してみた。即ち形態的観察の際に述べたような方法により得たカバーグラス上の菌を OsO_4 の代りに10% ホルマリン液で5分間固定し，水洗後2 mℓ のニンヒドリン

で1分間煮沸，水洗後グリセリンでマウントして得た結果が写真42，43である。

この方法で得られた結果は無処理のものでは僅かに淡い青色に染色されている。主に隔壁の位置と細胞端が比較的よく染色されている。一方凍結融解の処理を受けたものでは無処理のものに比べて極く僅かに染色されていて，対照にみられるような鮮鋭な像は得られないようである。

この事は凍結融解によりα-アミノ基が影響をうけて不染性になつたためか，或いは菌体外に游出したためにおこる現象と思われるが，先の実験でもみられたように，ペプチド或いは蛋白の放出と併せて考えるならば，蛋白の游出と考えてよいのではないか。

V. 考　　察

微生物は低温に対して一般に強い抵抗を示すといわれているが，その際与えられる条件或いは被検材料の種類などによつて差はあるとしても，或程度の障害を受けることは免れない。これら細胞がどのような機序で障害をうけるものであるかについては従来いろいろと検索されているが，そのうち主なものをあげると，細胞内外に形成される氷晶により単に機械的に障害を与えられるものであるとする説，或いはこれら凍結の際の氷晶形成による脱水のために媒液又は細胞質自身の濃縮がおこる結果障害を受けるとするもの[3),4)]などがある。いずれにせよ凍結による障害には氷晶の形成が重大な因子をなしていることは疑いのないところであろう。従つて従来は凍結時の条件と菌の障害度との関係をしらべる実験が多く，それも主として菌の生残率を基準にして検討されていたにすぎない。著者は特にこれまであまり省みられていなかつた菌自身のいろいろな障害の受け方を質的に吟味することにより，菌障害の機序を知ることが出来ないかと考えて本実験を試みたものである。特に同一菌について形態的変化と機能的変化を平行してしらべ，両者の関係からより一層正確にその機序を知り度いと考えたからで，そのためには *Bac. mega.* が比較的好材料であることを知つてこれを採用したのである。

さてこの *Bac. mega.* を使用して得た結果を今迄に行われた先人の業績と比較してみるに，細胞壁については元来細胞固有の外郭を維持し，しかも生活機能に必要な成分の吸収，分泌，呼吸などすべてこの細胞壁を通じて行われ，外界よりの侵襲も先ず細胞壁に対して強く加えられるものと考えられる。凍結融解や凍結乾燥の処理に際してもこの細胞壁が氷晶の生成に対してどのような態度を示すものであるか，細胞自身の構造からみても興味のあることである。酵母に比べて強固な細胞壁を有しているものと思われるにもかかわらず，*Bac. mega.* はこれら低温処理によつてかなり多くの細胞壁の障害のあることを知つた。その理由としては，他の微生物の場合にも考えられるように，先ず第一に氷晶による機械的破壊をあげることができようが，しかしその細胞壁の破壊像を観察してみると，最も軽微なものは外部に殆んど損傷がみられないが内部からの細胞質の游出のあることから損傷の存在が想像されるくらいのものがあり，また最も障害の甚だしいものは原形を留めないくらいの破壊像がみられ，特に破裂したような破壊像或いは鋭利な切断面を示す細胞など，きわめて種々雑多な破壊像がみられる。

この事からも唯単に氷晶による影響のみでなく，かなり複雑な因子によるものではないかと想像される。

又凍結乾燥による細胞の破壊様式を凍結融解によるそれと比較してみると，あまりはつきりはしないが多少の差があるように思われる事は，既に述べた通りである。凍結融解，凍結乾燥とも凍結という条件ではそれぞれ全く同じ過程をへるのであるが，其の後に於いては一方は直ちに融解，他方は乾燥，復水というよな操作が加えられる。従つて差ができても当然のことと考えられる。なお凍結乾燥では萎縮した細胞がみられるが，このような細胞を観察するためには，乾燥終了後常圧に戻して直ぐ固定しなければならない。常圧に戻してから時間がたつとこのような萎縮した細胞をみることが出来難い。これは空気中の水分を吸収して原形に復帰するためではないかと考えられる。それ故乾燥したままの状態をみるのには，空気中の水分を吸収しない前に固定して観察することが必要である。

次に縦に裂けたように見える菌が凍結乾燥の際に観察されるが，その出現の機序は明らかではない。ただ乾燥終了後常圧に戻す時，急激に真空を破るほど数多くみられることから，凍結乾燥によつて多少脆弱になつている細胞壁に加わる急激な圧力の変化により生ずる技術的な問題ではないかと想像される。

隔壁や顆粒の消失は形態的変化のうちで最も著しい変化であり，機能的観察に際して細胞構成蛋白が水溶性化して細胞外に多くみられる事実，或いは形態的観察上細胞壁の透過性の増大する事と併せて考えるならば，これらの顆粒は主として蛋白より形成されており，凍結に対して非常に不安定なもので，これらの処理によつて細分されて小さな粒子のものとなり，透過性の増大した細胞壁より細胞外に游出したものと考えられるようである。この事は又同じように，完成に近い巾のある隔壁が薄くなる現象についても云えるものと思う。

破壊細胞壁の染色性については，細胞壁は元来これが機械的に破壊された場合には，著しく難染性を示す事は知られているが，単なる機械的或いは物理的な操作による破壊だけでなく凍結融解，凍結乾燥の処理によつて破壊された細胞壁についても，これらのものと同じように著しい難染性を示すことがここに確認された。

処理された細胞の染色性の変化については，いずれの処理方法によつてもPV法では濃染し，F法では淡染する細胞が出現するが，濃染細胞は凍結融解1回の処理のものよりも，処理回数の多いもの程増す事実，及びこれらの細胞はその外形が幾分変形をおこしていることが多いことより，当然障害を受けた細胞であると考えられる。しかし処理菌が何故PV法では対照より濃染し，F法ではかえつて淡染するのであるかこの機序に対しては明らかにしなかつた。又PV法により濃染する場合，細胞壁と細胞質の何れの染色性の増加であるかを詳細に観察してみると，細胞壁よりはむしろ細胞質自身の染色性が増大したために濃染していることが判る。又F法によつてはPV法とは全く逆に淡染する細胞がみられる機序に関しても明らかにする事は出来ないが，双方何れにせよ細胞質自身凍結融解や凍結乾燥によつて或種の変性を受けて色素に対する親和性に変化をきたしたものと考えられる。

又細胞質が凍結融解，凍結乾燥などの処理によつて分断，欠除，或いは游出することは既に述べた通りであるが，F法により観察した場合にはPV法でみられるような変化とちがつて，細胞壁の破壊口が認められない場合でも，細胞質が障害を受け分断していたり，欠除している場合をしばしばみる事ができる。これら細胞壁の破壊がなく単に細胞質のみ破壊されている場合，凍結の外的な要素により受ける障害と考えるより内的な要素即ち細胞内凍結による分断，或いは欠除と考えた方が説明し易いように思われる。又細胞質の游出の場合は多少その様子が異なり，外形上はみられないがごく微細な細胞壁の破壊口があつて，それから細胞質が游出したものと考えてもよいであろう。

細胞壁と細胞質とが剝離しているような細胞は，双方の処理の際にみられるのであるが，特に凍結乾燥の処理の際に多くみられるようである。この原因として考えられる事は，細胞壁と細胞膜との結合が凍結によつて弱められたものであるか，又氷晶による圧迫により細胞が収縮し，融解の際（或いは復水の際）に細胞壁と細胞質との復元力の相違によりおこる現象であるか明らかではないが，凍結乾燥の際にみられる萎縮した状態の細胞ではこのような剝離は認められない。

斑紋様の構造は，核と細胞質との色素に対する親和性の相違からみられるものであるらしいことは既に述べた通りである。これらの構造を示すものが凍結融解或いは凍結乾燥によつて一様な無構造の様相を呈するという事実は，一方核の観察に於いてその大さ，形状，又は染色性についても殆んど変化が認められないことがわかつているので，核の光の屈折性が細胞質のそれに接近したためと考えるよりも，核をとりかこんでいる細胞質が強く変性したために，色素との親和性に変化をきたして核の存在を認め難くしたのだと考えた方が妥当のように思われる。何れにせよ細胞質の質的変化のために染色性が変つたものと想像される。

核については，この実験結果からは著しい変化は認められなかつたが，この核に変化のない事については，菌体の比較的内部に存在するために影響を受け難いのか，或いは核自身の抵抗性の強い事によるのかは明らかでない。凍結による核の変化のみられない事は，細胞成分の分析的な観察で，熱-TCA　分劃に殆んど変化のない事実からも想像される。

細胞壁の透過性の増大は，核染色の場合に塩酸の処理時間を短縮しても，対照と比べて同じように核のみえることから想像できたのであるが，この点をもう少し細胞壁の構造からも検討してみようと思う。

細胞壁の構造物は，主として蛋白，多糖類，炭水化物及び類脂質などといわれているが，凍結融解や凍結乾燥の処理の際に蛋白質又はペプチドの游離が促進される事は，形態的観察ではニンヒドリン染色法によつても，無処理のものに比べて淡く染色されること，又細胞構成成分のうち水抽出分劃を風乾して得た所見も，蛋白或いはペプチドである事によつても肯定できる。この事は細胞壁の構造が粗になり，このため内部の蛋白体やその他の成分が細胞外になお游出し易くなるのではないかと推論される。これ故塩酸処理の際みられる現象やP^{32}導入について行つた実験の際みらる現象などが一層説明され易くなるものと思う。

又エーテルによつて細胞自身に著しい変化がみられる事に関しては，いかなる機序によるものであるかを深く追求してみなかつたのであるが，何れにせよ塩酸だけでなく，エーテルもまた凍結処理による細胞障害を証明する一方法になるものであろう。

細胞壁及び細胞質の変化と生死との関係については，細胞壁が完全に破壊しているものは勿論完全に死滅していると考えられるが，不完全な破壊や極く微細な破壊の程度でも，分裂能力を失うこともあり得るであろうし，凍結乾燥にみられるような単に萎縮した場合には，分裂能力を失つてはいないかもしれぬ。又正常菌よりも濃く或いは淡く染まる菌，斑紋様構造を失つた菌，隔壁に変化のある菌などは，生死何れにあるか測定する事は困難である。しかし，ここで述べたような色々の障害を受けたと思われるものは，すべて分裂能力を失つたものとして考えるならば，これらはPV法では約71%，F法では約49%で，機能的観察による死滅率76.3%に比べて，F法ではるかに少ないようであるが，PV法によつてみられる顆粒の消失は，かなり高率にみられる（約60%）から，その他濃染菌（約80%），細胞壁の破壊菌（約3%）を合せて，これらをすべて分裂能力を失なつたものと考えるなら，培養によつて測定された死滅率とかなり一致する成績のように思われるが，実験的に確認できる程正確な数量的取扱いはしなかつた。

一方機能的な面よりよると凍結融解や凍結乾燥による生残率の変化は，*Escherichia coli* に於けると同様[10] *Bac. mage.* に於いても等比級数的な低下をみた。しかも *E. coli* よりは低下の程度は著しいので，凍結融解処理に対する抵抗性は *E. coli* ほど強くないようである。この事は細胞自身のいろいろな性質の差によるものであろう。又凍結乾燥による生残率は同様に低下を示していて，これは凍結融解のほぼ1～2回行つた程度の障害である。この事は一般に凍結乾燥は凍結融解より障害が著しいという従来の知見と一致するものである。

このように生残率の上からみて，これらの処理は相当の障害を与えていることがわかるが酸素呼吸能の変化と比較してみると，両者の傾向は似ているが必ずしも一致はしない。細菌の種類によつて凍結融解菌液の呼吸量の増加するもの[19),20)]，或いは減少するもののあることが報告されているが[21)]，*Bac. mega.* では *E. coli*, *Neisseria gonorrheae*, *Hemophilus pertusis* などとは異つて，処理回数による生菌の減少に伴なつて呼吸量も減少している。従つて *E. coli* やその他のものとはその代謝の機構又は障害のうけ方が異なるものと想像される。しかし，何れにしても凍結乾燥では凍結融解の1～2回位の処理に相当した障害の受け方で，この点では生残率と一致した成績のようである。

又 P^{32} の吸収については，前述の燐酸化能測定結果を以て酸素呼吸と直接関連した現象とみる事はできない。それは呼吸系と共軛する燐酸化のみが測定されるのではなく，他の酵素系に於ける燐の交換反応も当然測定にかかつているはずであるからである。しかし，燐の交換反応は燐酸転移の如き細胞のエネルギー利用能の一部を担うものであるから，全体として燐導入の速度は細胞の生化学的活性をあらわすものと見做すことができる。このような見地や，また測定によつて得られた導入速度が凍結処理回数の少ない菌では呼吸能にほぼ比例している事実

などから，凍結処理による菌の死滅が呼吸系（広い意味での）の障害によつて直接もたらされるものではない事が推測される。しかし呼吸測定などと同様，このような生化学的な測定は，その精度の点から生菌数測定には及ばないので，生残率10%以下の場合に於ける生菌の活性について云々する事は不可能である。

そもそも細胞は多種多様な要素から構成され，それらの要素がまた多数の異なる物質によつて組立てられており，更にそれらの間に複雑な連関が成立つて生命が維持されるものと考えられるが，それらに関する具体的な証明はまだまだ充分でない。本実験に於ける実験結果に対する考察の主要な論点も，種々の条件での凍結処理によつて，細胞の「構成」が如何なる影響を受けるかを解明せんとする事にあつた。数多くの物質とそれらの有機的な相関関係が，ある特定の方法のみによつて説明し得るとは思わないが，P^{32}によつて標識した細胞内物質の抽出が，凍結融解又は凍結乾燥によつて変化する事が，*Bac. mega.* に於いても細胞構造障害の機構を知る一つの重要なてがかりになつたと考えられる。このことは他の細胞についても既に知られていることではあるが[22]，これによつて *Bac. mega.* のもつ性質の一面がうかがわれるものと思う。例えば，酵母などの微生物細胞の凍結融解は細胞質の低分子物質の溶出を容易にする[22]のに対し，*Bac. mega.* ではその他にある種の蛋白物質を游離し易くする事である。このような事は酵素の抽出に利用されているが[23]，本実験のラジオオートグラムの定性的な結果から，*Bac. mega.* で溶出されるものは燐蛋白質であろうと推定される事は，従来あまり知られていないこの種の蛋白質の細胞構造に於ける役割に何らかの示唆を与えるかも知れない。

以上述べた諸現象の説明だけでは，所期の目的即ち凍結融解及び凍結乾燥の細胞に対する作用の機作を解明するのにはまだまだ不充分ではあろうが，とにかくこの問題に関する系統的研究を行うに当つての比較的重要ないくつかの実験結果を提供し得たと考えるが，今後の解明にまたなければならない点の多いことは勿論である。

VI. 結　　言

凍結融解や凍結乾燥などによつて，微生物がどのような障害を受けるかについて明らかにしたいと考え，*Bac. mega.* を使用して，形態的には細胞壁，隔壁，細胞質，細胞核に対する変化を観察し，併せて機能的には生残率，酸素呼吸能，P^{32}の吸収速度及び構成物質に与える影響について検索してみたところ，次のような結果を得た。即ち形態的変化としては

1) 細胞壁に対する障害の程度には種々の段階があつて，大は形状をとどめない位ひどく破壊されたものから，小は外見上殆ど変化はみられないが細胞質の游出することから細胞壁の破壊を想像されるものまである。特に凍結乾燥では凍結融解であまりみられない縦裂或いは萎縮した菌がみとめられる。

2) 隔壁は，細胞に殆んど変化の認められないような場合でも，その厚さが減少したり，或いは全く消失したりした。

3) 細胞質は，細胞壁の破壊に伴なつて変化がみられるが，細胞壁の変化が著しくないよ

うな場合でも，膨潤，剝離萎縮，断裂，欠除などの障害をうけている。

4) 核には殆んど変化は認められなかつたが，塩酸の透過性が増大しているようである。

5) 色素に対する親和性に変化があり，対照よりも濃染したり淡染したりした。

機能的観察の結果は次のようである。

1) 生菌数は凍結融解を反復すると等比級数的に生残数は低下し，凍結乾燥に於いても低下した。

2) 酸素呼吸能もほぼ処理回数に比例して低下した。

3) P^{32} による燐酸吸収能は細胞壁の透過性が増大するため特異な吸収曲線を示した。

4) 細胞構成物質にも変化があり，TCA 分劃と共に残渣分劃の水溶性化がおこり，蛋白質及びペプチドの游離が促進される。

以上総合してみると，凍結融解や凍結乾燥の処理によつて，*Bac. mega.* は，細胞壁並びに細胞質などに質的，量的変化を受け，その透過性が増大し，細胞構成物質の変化と相俟つて生存に必要な菌体成分の游出が促進され，特に呼吸系よりも合成系の機能が強い障害をうけるために，細菌の生存に致命的な影響を及ぼすものと考えられる。

擱筆に当り終始御懇篤な御指導を賜つた恩師根井教授に衷心より謝意を表すると共に，種々御教示を戴きました林助教授に，また多大の御援助を戴きました二瓶氏に感謝の意を表します。

文 献

1) Luyet, B. J. and P. M. Gehenis 1940 Life and Death at Low Temperatures. Biodynamica, Normandy, Missouri.
2) Molisch, H. 1897 Untersuchungen über des Erfrieren der Planzen, Jena.
3) Haines, P. B. 1938 The effect of freezing on bacteria. Proc. Roy. Soc. London B, ***124***, 451.
4) Weiser, R. S. and C. M. Osterud, 1945 Studies on the death of bacteria at low temperatures. 1. J. Bact., ***50***, 413.
5) 根井外喜男 1954 酵母の凍結過程. 日農化, ***28***, 91.
6) 根井外喜男・佐々木芳郎 1955 凍結融解による菌体の破壊. 科学, ***25***, 86.
7) ———— 1955 凍結乾燥菌体の電子顕微鏡像. 科学, ***25***, 86.
8) 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.
9) 大原吉輝 1954 凍結融解の細菌呼吸に及ぼす影響の機序について. 低温科学, 生物篇, ***12***, 1.
10) 佐藤 徹 1954 低温処理による細菌死滅の機序について. 低温科学, 生物篇, ***12***, 39.
11) Bisset, K. A. and C. M. F. Hale 1953 Complex cellular structure in bacteria. Exp. Cell Res., ***5***, 449.
12) Smith, A. G. 1950 Electron and light microscopic studies of bacterial nuclei. J. Bact., ***59***, 575.
13) Robinow, C. F. 1945 Nuclear aparatus and structure of rod-shaped bacteria. Addendum to R. J. Dubos, The bacterial cell. Harvard University Press. Cambridge Mass.
14) Greenberg, D. M. (edt.), 1954 Chemical pathway of metabolism. ***1***, 490. Academic Press. Inc. publ. New York.

15) Schneider, W. C. 1945 Phosphorus compounds in animal tissues. J. Biol. Chem., ***161***, 293.
16) Steele, R., T. Sfortunato, and L. Ottolenghi, 1949 A micromethod for the determination of the nucleic acid. J. Biol. Chem., ***177***, 231.
17) 坂上康雄 1958 酵母の発育及び代謝に対する凍結処理の影響 (仮題). 未発表.
18) Glick, D. 1949 Tech. of Histo and Cytochemistry. Interscience public. Inc., N. Y. and London.
19) 福島正憲 1955 淋菌の酸化酵素活性に関する実験的研究. 仁泉医学, ***5***, 1.
20) 中村安治郎 1956 百日咳菌の凍結融解による酸化酵素活性の変化に就いて. 仁泉医学, ***6***, 1.
21) 勝呂隆彦他3名 1955 凍結融解による野兎病菌の酸化酵素活性の変化に就いて. 仁泉医学, ***5***, 199.
22) Hansen, I. A. and P. M. Nossal 1955 Morphological and biochemical effects of freezing on yeast cell. Biophy. Acta, ***16***, 502.
23) Putnum, F. W. 1954 Protein denaturation. The Protein (ed. R. Neurath and W. Bailey), ***1***, 802.

Résumé

Microorganisms are known to get damaged by the treatment of freeze-thawing or freeze-drying, as is the case with various kinds of plant and animal cells.

It is the object of this study to investigate the mechanism of cell injury caused by freeze-thawing or freeze-drying from morphological and functional points of view. Bacillus megatherium was used as an experimental material, for it is large compared with other bacteria and is adapted for clear perception of cytological structure.

Morphological examinations were conducted by employing the method of stainning specific for each cell constituent:

1) Cell wall and separate: Improved Bisset's method modified by substitution of 0.05% Victoria-blue for 1% methyl-green;

2) Cytoplasm: 1% basic fuchsin;

3) Nucleus: Smith's method (modified Robinow's).

For observing the functional change the following tests were carried out:

1) Cell survival immediately after the treatment was measured by the plate-count method;

2) O_2-consumption rate of treated cells was determined by the use of Warburg's manometer.

3) Incorporation rate of P^{32} into cells was measured by using G. M. counter and distribution of P^{32} in the cells was tested by means of autoradiography and Ninhydrin stainning.

The morphological changes caused by the treatment of freeze-thawing or freeze-drying were as follows:

1) Various degrees of injuries of cell walls were observed, for instance, cell debris which were intensely damaged and lost their original forms or cells which looked like normal but were slightly hurt as inferred from the photomicrograph showing some cell components around the cell walls. Especially in freeze-dried samples many shrunken cells and few longitudinal cracks in the ordinary-shaped cells were observed.

2) The morphological changes of cytoplasm, such as swelling, exfoliating, shrinking,

lacking or cracking, were found even in the cells, of which the cells were scarcely damaged.

3) Change in stainability of cell by various dyes was produced: cytoplam came out to be more deeply stained by Victoria-blue and more faintly by fuchsin than in the case of normal cell.

4) Nucleus did not show any remarkable morphological change but could easily be stained by a brief pretreatment with HCl on account of increased permeability.

The results obtained through some examinations on functional changes were as follows:

1) Cell survival showed gradual decrease as freeze-thawing was repeated. The survival immediately after freeze-drying was similar in number to the case of the cells subjected to freeze-thawing but once.

2) O_2-consumption of the treated cells also diminished with repetition of freeze-thawing.

3) The rate of incorporation of P^{33} was decreased by treatment. P^{32} was absorbed by the repeatedly frozen cells more rapidly at the initial stage of incubation but the total quantity of P^{32} absorbed by the treated cells was less than by the normal cells.

4) By freeze-thawing or freeze-drying water-soluble substances became easily extractable.

In short, Bac. mega. is markedly influenced by freeze-thawing or freeze-drying. It is to be inferred that cells are more or less morphologically and functionally damaged due to destruction of cell membrane, increase in permeability, elution of cell components, injury of synthetizing system in cell metabolism and so on caused by such treatment.

写　真　説　明

第1図　鋭利な切断面を有する輪切りの状態の破壊細胞壁。凍結融解 (FT), F 法, ×2,250

第2図　不定形に大きく開いた破壊細胞壁。弁状に破壊された細胞側壁もある。(FT, F 法, ×1,500)

第3図　2とは逆に萎縮した破壊細胞壁。(FT, PV 法, ×1,500)

第4図　細胞壁は破壊されても尚細胞質は残存している。(FT, Bisset 法, ×2,250)

第5図　側壁の小破壊。
第6図　側壁の大破壊。　凍結乾燥 (FD) PV 法, ×1,500

第7図　細胞質の菌体外游出。(FT, PV 法, ×1,500)

第8・9図　菌体の部分的萎縮と細胞質の遊出が認められる (9)。8は対照。(FD, PV 法, ×1,500)

第10・11図　萎縮した菌体の各段階がみられる (11)。10は対照。(FD, PV 法, ×1,500)

第12図　凍結乾燥に多くみられる縦裂と思われる細胞。(PV 法, ×2,250)

第13・14図　Bisset 法による染色。PV 法よりは鮮明ではないが隔壁は厚く顆粒も認められる (14)。FT によつて隔壁は薄くなり顆粒は消失破壊細胞と濃染菌も認められる (14)。(×1,500)

第15図　細胞質は分断されている。(FD, PV 法, ×1,500)

第16図　細胞壁と細胞質とは剝離をおこしている。(同上)

第17・18図　13・14に比較して鮮明な像で，菌体内顆粒は存在し隔壁も厚い (17)。18は FT 処理で顆粒は殆ど消失しかも隔壁も薄い。(PV 法, ×1,500)

第19図　燐モリブデン酸処理60分，顆粒は消失せず又隔壁も余り薄くなつていない。(同上)

第20・21・22図　濃染菌の種々の段階を示す。21は FT 1回，22は FT 3回，20は対照。(PV 法, ×1,500)

第23図　紡錘形の顆粒。(PV 法, ×1,500)

第24図　対　照

第25図　FT 1回

第26図　FD 5時間

第27図　対照の斑紋様構造。(F 法, ×1,500)

第28図　斑紋様構造の消失，淡染及び破壊細胞。(FT, F 法, ×1,500)

第29図　細胞質の欠除 (F)，膨潤，破壊。(FT, F 法, ×1,500)

第30図　FT 5回。種々破壊細胞に細胞質の破壊物と思われる顆粒が混在している。(FT, F 法, ×1,500)

第31図　同上。(FT, PV 法, ×1,500)

第32～35図　特殊な固定法による細胞質の破壊状態 (33～34)。32は対照。FT, PV 法, ×1,500)

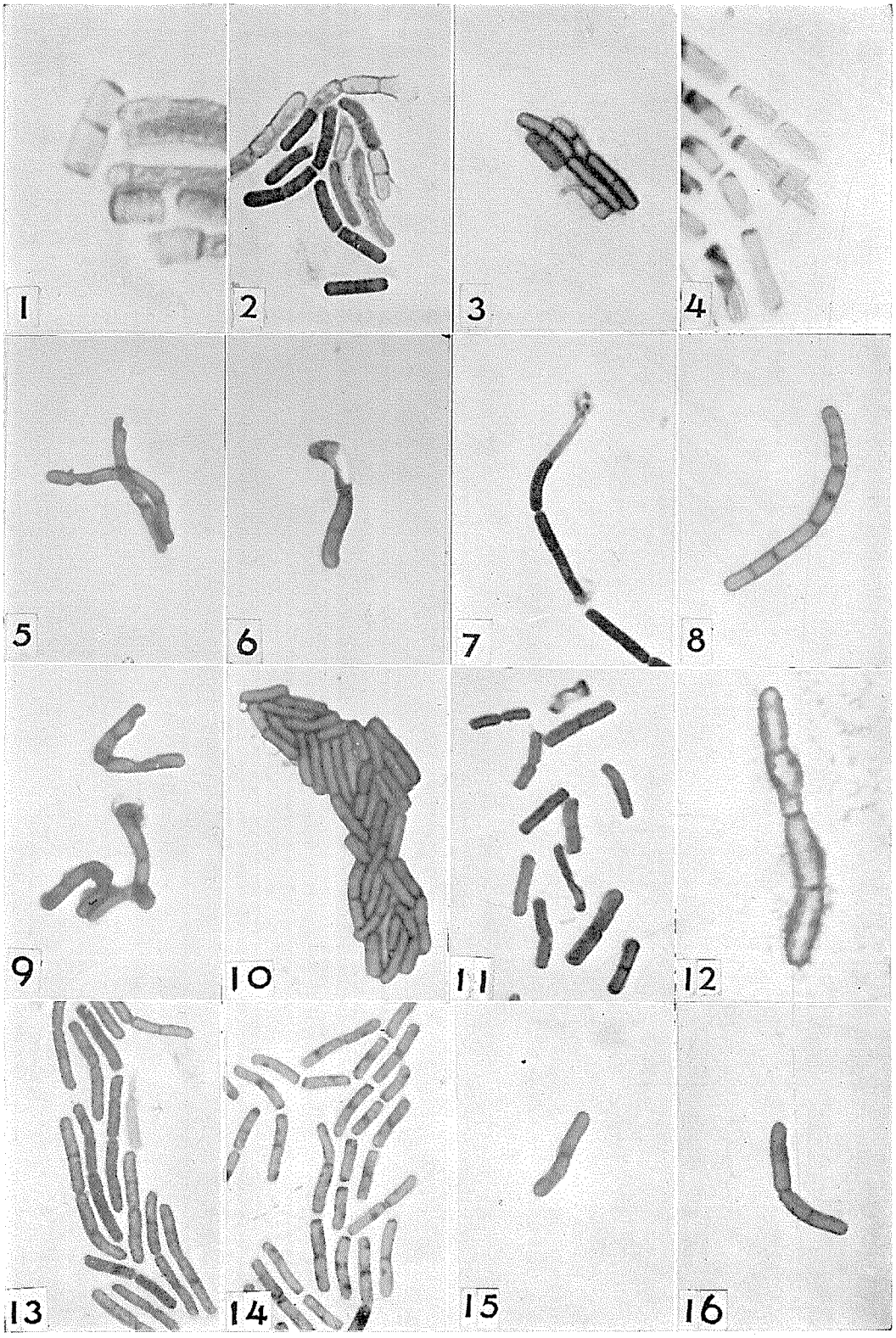
第36・37図　対照に多くみられる索状の核 (37)。凍結処理によつて余りみられなくなる (36)。FT, N 法, ×2,250)

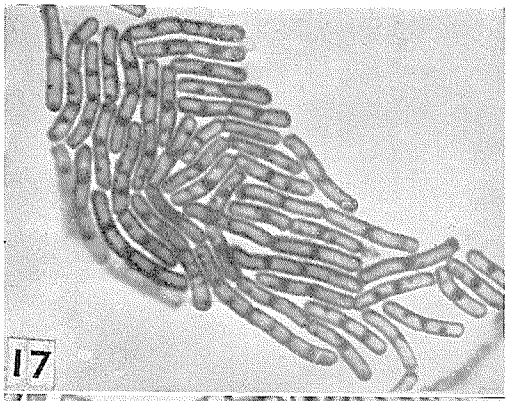
第38・39図　塩酸処理を5分に短縮した際の核の状態，対照 (38) の核は不鮮明であるのにかかわらず，処理したものでは (39) 割合鮮明な核が得られる。(FT, N 法, ×1,500)

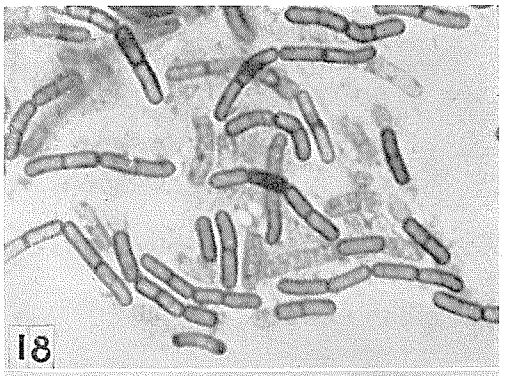
第40・41図　48時間エーテル処理した場合にみられる細胞の状態，対照(40)に比較して処理したもの(41)では著しく膨潤し，細胞壁と細胞質は剝離をおこしている。(FT, N 法, ×1,500)

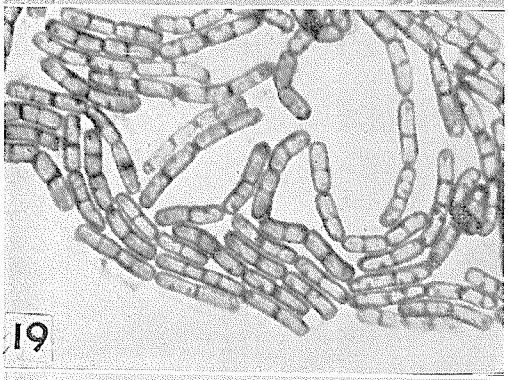
第42・43図　ニンヒドリン染色法による菌の染色度合。対照 (42) は割合に染色されているが，全く同じ条件での処理菌は (43) 殆ど染色されていない。(FT, ×1,500)

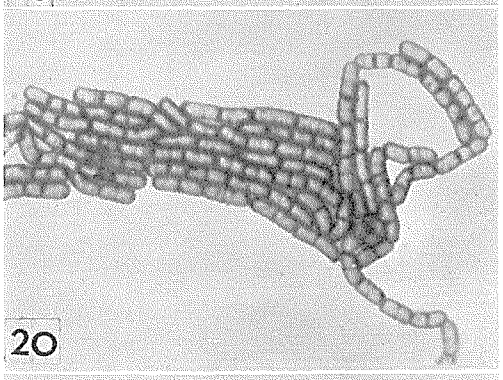
第44図　水溶性分割を風乾して得たペーパークロマトグラフ。原点とその上方にスポットを見る。

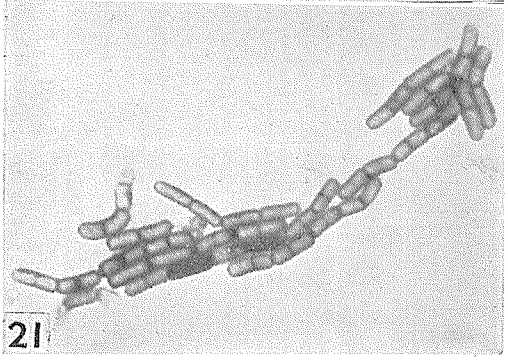

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16

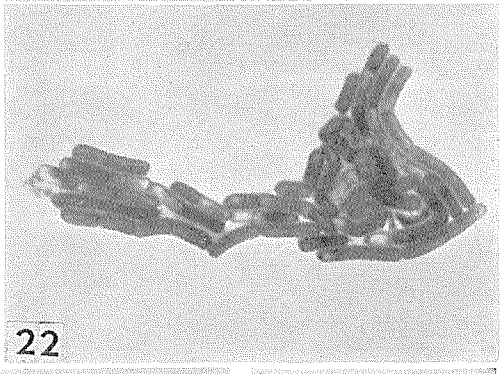

17

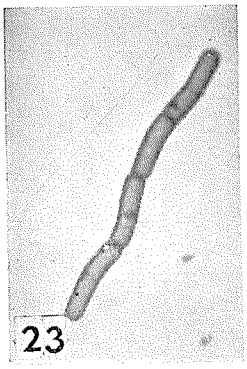

18

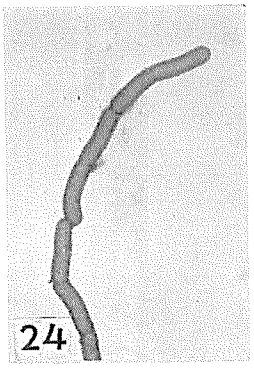

19

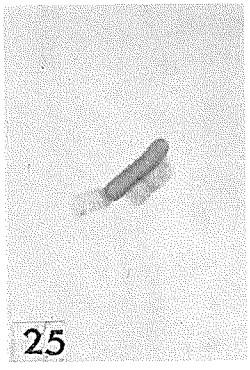

20

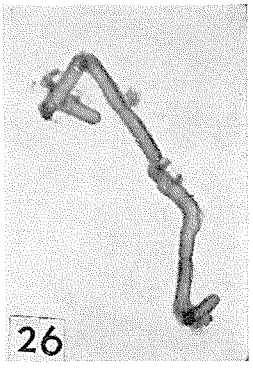

21

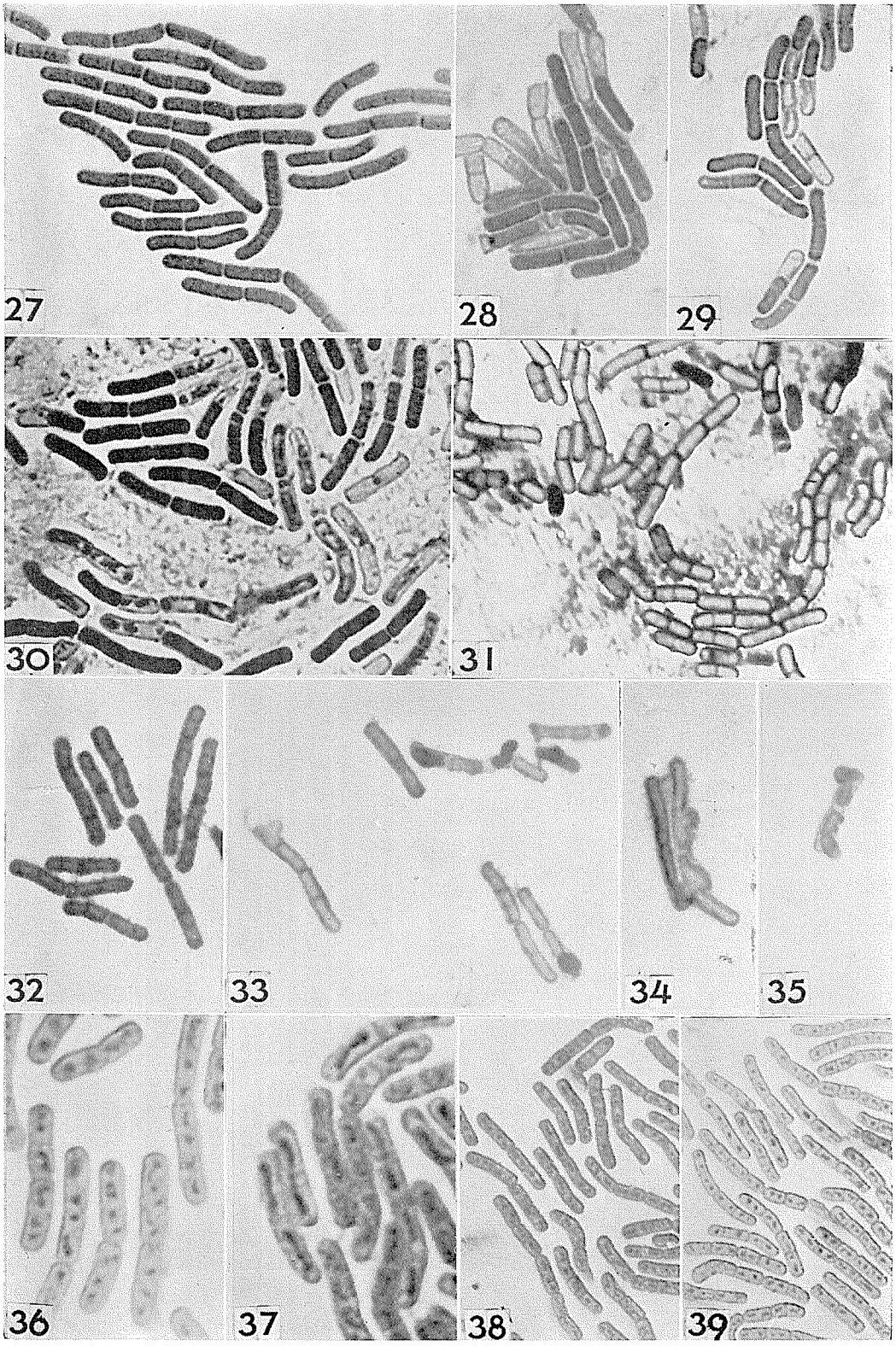

22

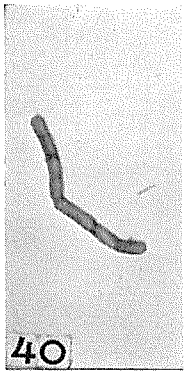

23

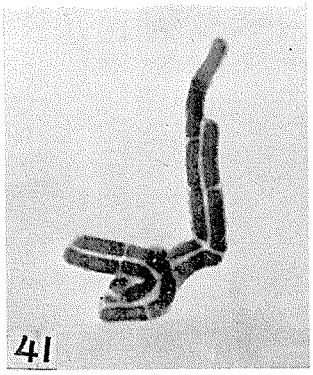

24

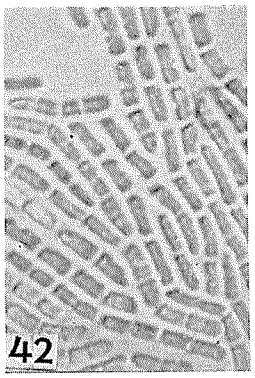

25

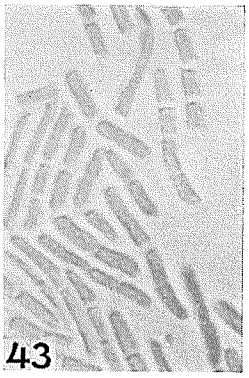

26

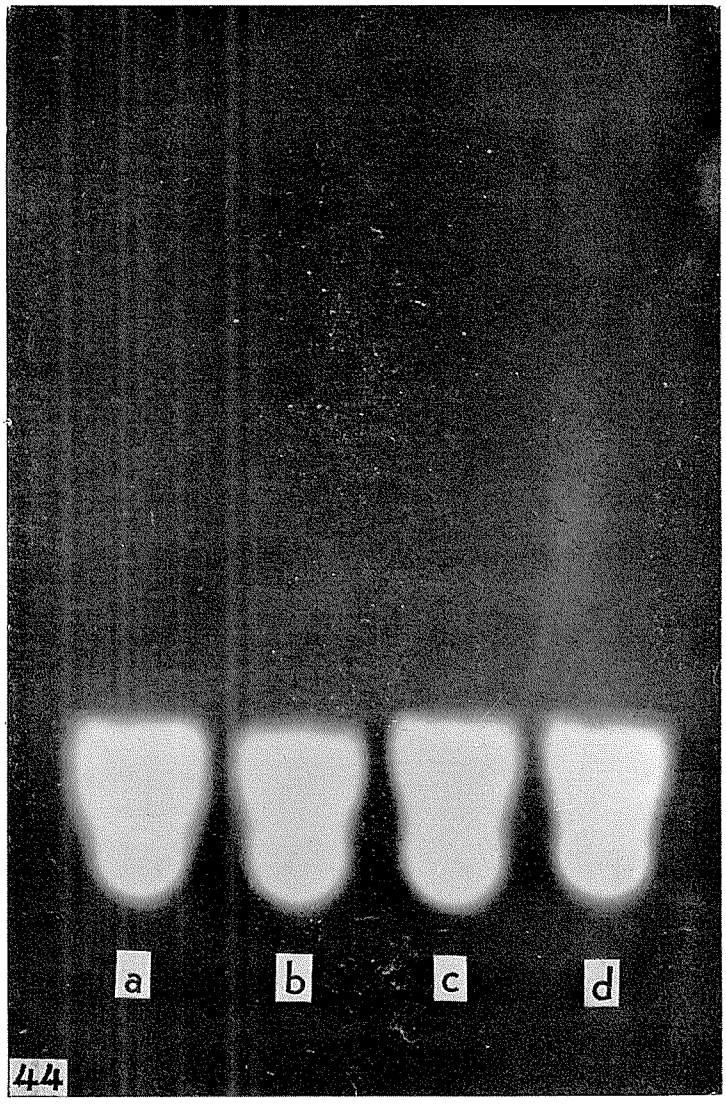

27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39


40


41


42


43



44