

高圧の細菌に及ぼす影響に就て

岡山大学医学部生理学教室 (主任: 林 香苗教授)

安 田 浩 士

[昭和34年8月20日受稿]

I 緒 言

高圧の微生物に及ぼす影響に就いては、既に十九世紀より報告されて居り、例えば Certes⁷⁾; Chlopin 及び Tamman⁸⁾; Basset 及び Macheboeuf等¹⁾~⁸⁾; Hite, Giddings⁶⁾; Larson, Hartzell, Diehl 等¹⁵⁾~¹⁸⁾, 多くの研究者により実験されて居る。併し実験の目的方法を異にして居り成績も一定していない点がある。最近でも Johnson,⁵⁾ 18), 14), Zo Bell²²⁾ 等の海棲菌特に発光菌に関する一連の詳しい研究がある。

曩に生活組織への高圧の影響に就いてその一環として酵母菌の研究²¹⁾をなしたが、更に之より下等な細菌に就き市橋¹¹⁾と共に加圧実験を行ない、その成績は大部分既に報告されているが、未だその一部として、緑膿菌を用いて特に基質の種類による呼吸の変化、適応酵素産生に及ぼす影響、色素産生に及ぼす作用など未発表の成績があるので報告する。又従来多くの研究者により報告されている如き非常に高い圧力でなくとも、十分に圧作用の影響が現われることも明らかとなつた。

II 実験方法、装置及び材料

実験に使用した高圧ポンペ装置は、既に詳しく報告されている¹⁹⁾, ²⁰⁾ので省略する。2000 kg/cm²迄加圧可能であるが、実験には1600 kg/cm²迄の水圧を使用した。

用いた菌は、細菌学教室より分与された緑膿菌1株と結膜炎患者より分離した1株計2株で、普通寒天平板培地に37°C、18時間培養せるものを用いた。白金耳にて菌集落を集め生理的食塩水にて毎分10,000回転、10分間遠沈し、洗滌(2回)して後秤量して1cc中4mgの割合の食塩水又は食塩磷酸緩衝液の浮游菌液を調製した。加圧後は滅菌綿を用いて油滴をとり、ピペットにて必要量を取り出す。菌液は初め2分しておき、一方を加圧、他方を対照とし、一定(加圧)時

間後同様に油をとり、同濃度の対照菌液を得た。

増殖を観察するには、比濁計(単一式分光光度計4型の改良型、使用フィルター570m μ)を使用し、前述の調製した菌液に加圧しそれを肉汁ブイオンに移し、その増殖を濁濁度により判定した。

色素産生に及ぼす作用をみるためには、5%グリセリン寒天(グリセリン培地には色素産生を著明にする作用があると云われている)を作り、之に孤立集落を得る様に適当に稀釈した菌を移植し、24時間37°C培養後観察し、更に24時間室温に放置して観察した。

呼吸に対する作用は、Warburgの検圧計を応用して菌の酸素消費量を測定比較した。Warburg検圧装置の使用法¹⁰⁾、使用緩衝液、容器内各重量等は、市橋の報告¹¹⁾と同様であるので省略する。寒天平板培養せる菌を食塩磷酸緩衝液にて洗滌後 resting bacteriaとして実験に供した。

適応酵素産生に及ぼす影響は、結膜炎患者より分離した緑膿菌の1株で、安息香酸を適応的に分解するものを使用し、適応現象はO₂消費の消長を検圧計により観察する方法によつた。

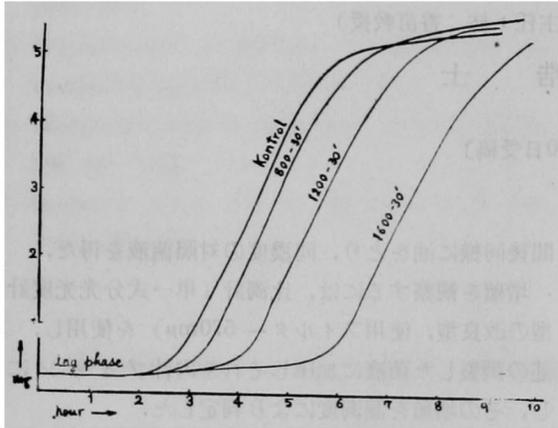
III 実験成績

(1) 増殖に及ぼす作用

対照菌液並に加圧菌液より各々1白金耳をとり適当に稀釈し、之を平板培地に移植すると、1600kg/cm²、30分加圧の場合、対照に於て約8時間後に肉眼的に認められる多数の小集落の生育が見られるに反し、加圧菌の集落の形成は16~20時間を要し、其の数も非常に少ない。この関係を明らかにするため、比濁法により増殖曲線に現われる変化を追求してみた。第1図の如く800kg/cm²、30分加圧でも対照に比し約30分lag phaseの延長が認められる。1200kg/cm²、30分で60分、1600kg/cm²、30分で約180分の延長がみられる。加圧時間が短い場合、例えば5分では1600kg/cm²で約60分の延長があるが、800kg/cm²では全

く延長は認められない。即ち lag phase の延長は圧力の高さと加圧時間との二因子による。

第一図

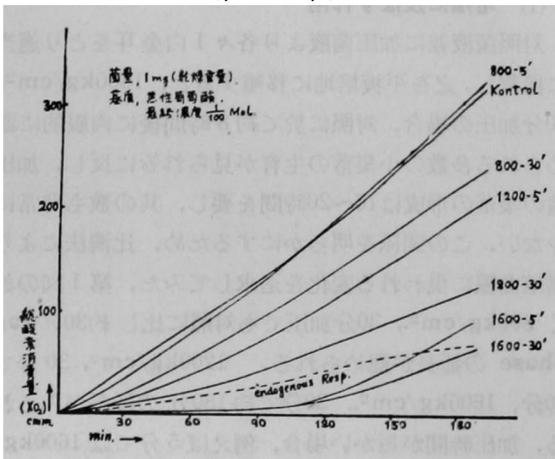


緑膿菌増殖曲線に及ぼす高圧の影響
比濁計波長 570m μ .
初菌量 0.2mg/10cc
Bouillon

(2) 色素産生に及ぼす作用

1200kg/cm², 30分加圧では対照と全く変化を認め得ないが, 1600kg/cm², 30分加圧では明らかに対照に比し色素産生が阻害される。即ち対照では集落の周囲のみでなく培地全体に diffuse に緑色の着色を来すのに対して, 加圧菌では集落の周囲のみに著明な着色を示し, 集落と集落の間隙に着色しない部分を残している。室温に放置24時間後では対照の培地の色調は益々緑色を帯びるが, 加圧菌の色素産生はそれ程著しくは増えてない。以上から緑膿菌の色素産生に対し高圧は阻害的に作用すると云えよう。

第二図

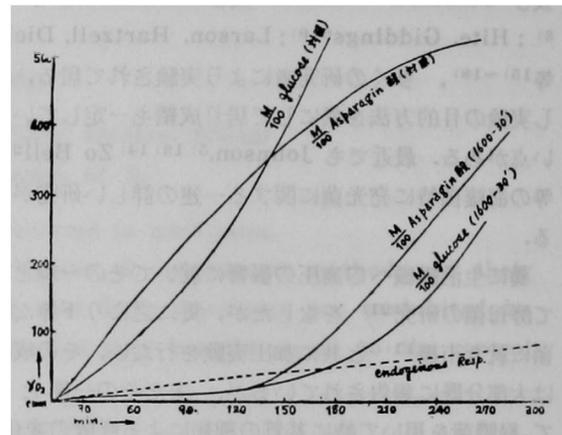


緑膿菌(P II)の呼吸に対する高圧の作用

(3) 呼吸に対する作用

400kg/cm². では殆んど影響を認めないが, 800kg/cm²., 30分の加圧では O₂ 消費量の減少が認められる。圧が高くなるとその度が大となり, 1600kg/cm²., 30分では呼吸は全く停止し, 消費されるO₂量は零に近く所謂呼吸の酸素消費量より下廻る。又, 加圧時間によつても異なり5分と30分加圧とでは可成りの差が認められる(第2図)。尚, 1600kg/cm²., 30分加圧の場合, 一時全く呼吸を停止した如くみえているものが, 除圧後2時間乃至3時間で次第に酸素を消費し, 4時間後には急激にO₂消費量の増加が見られる(第3図)。之は圧による障碍から恢復する姿であろう。

第三図



緑膿菌(P II)の呼吸恢復の現象

次に各種の基質を用いた場合に夫々の基質の分解能力が同一なるか否かを検討した処, 加圧によつて生ずるO₂消費量の減少, 即ち呼吸の抑制の程度は基質の種類により同程度のものもあり, 著しく異なるものもある事が判明した。即ち4種の糖類, 8種の多価アルコール, 及び若干のアミノ酸を基質として用いた場合(第1表(1)), グルコース, フルクトースは対照に比し, 800kg/cm²., 30分でも尙60%のO₂消費量を保っているが, マンノース, マルトースは僅か20%を示すに過ぎない。同様にリンゴ酸, 乳酸は同傾向を示すが, コハク酸, 焦性ブドウ酸は前二者よりO₂消費の抑制が大であり, フマール酸, 醋酸, クエン酸, グリセロリン酸等はO₂消費の減少が認められず, 乃至は増加しているものもある。アミノ酸でもプロリン, アスパラギン酸よりグルタミン酸は抑制が大である。1200kg/cm². の圧では一般にO₂消費は激減するが, 一部に比較的多いO₂消費を保たせる基質がみられる。

次に同じ緑膿菌でも菌株が異ると, 上述の基質を用

第1表(1) 緑膿菌P I株の呼吸抑制(数値は2時間の酸素消費量(XO₂)を示す)

基 質	800 kg/cm ² , 30分			1200kg/cm ² , 30分		
	対照	加圧	率(%)	対照	加圧	率(%)
グルコース	16.5	8.3	50.2	19.0	0.0	0.0
マンノース	18.0	4.0	22.2	18.5	0.0	0.0
フルクトース	43.4	26.0	60.0	39.0	2.0	50.0
マルトース	64.0	30.7	16.6	37.8	7.2	19.0
リンゴ酸	109.8	74.0	67.3	98.5	6.0	6.1
フマル酸	134.0	124.0	92.5	126.0	19.4	15.4
醋酸	115.0	133.0	(115)	137.0	28.0	20.4
乳酸	209.0	163.0	78.0	218.0	10.5	4.8
コハク酸	263.0	118.5	45.0	239.0	12.0	4.8
クエン酸	22.0	34.5	(156)	18.5	9.0	46.0
グリセロ磷酸	83.0	87.0	(105)	97.5	16.0	16.4
焦性ブドウ酸	173.0	78.5	45.4	191.0	7.0	3.7
プロリン	100.0	50.6	50.2	88.0	11.0	12.5
グルタミン酸	139.0	36.6	26.3	144.0	20.0	13.9
アスパラギン酸	355.0	187.0	52.7	348.0	32.5	11.1
グルコサミン	10.4	16.5	(158)	13.0	0.0	0.0

第1表(2) 緑膿菌P II株の呼吸抑制(数値は2時間のXO₂を示す)

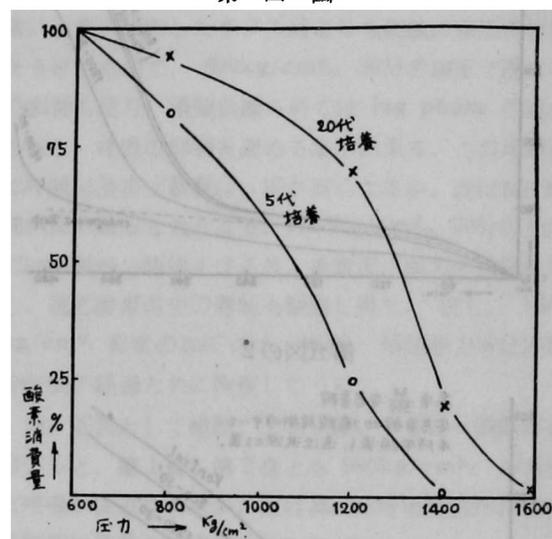
基 質	800 kg/cm ² , 30分			1200kg/cm ² , 30分		
	対照	加圧	率	対照	加圧	率
グルコース	103.0	78.0	75.5	110.0	26.7	24.2
フルクトース	91.0	68.5	75.0	88.0	19.5	22.2
コハク酸	150.5	102.0	67.8	143.0	31.3	21.9
乳酸	278.0	230.0	83.2	295.0	132.0	44.7
焦性ブドウ酸	189.0	158.0	83.5	201.0	51.2	25.4
クエン酸	20.5	21.6	105.0	17.7	21.8	123.0
グリセロ磷酸	48.5	50.0	103.0	53.5	25.4	47.5
アスパラギン酸	96.0	84.0	87.5	82.4	30.5	37.0
グルタミン酸	78.0	70.5	90.5	85.6	37.8	44.2

いた場合に高圧に対する抵抗性が可成り異なる様である(第1表(2)).即ちP I(細菌教室株)とP II(患者分離株)とを比較すると, 1200kg/cm², 30分の加圧の場合, 乳酸ではP Iは対照の5%のO₂消費量しか示さないが, P IIでは45%も保つて居り, 各基質により異なるが, 一般にP IはP IIよりも圧に対する抵抗が弱い。

継代培養した場合には, 例えばP IIに於て分離初期に比し20代培養したものは圧に対する抵抗が強い。前

者は1400kg/cm².で呼吸を停止するが, 後者では尙相当のO₂消費を示している(第4図)。

第4図



使用株: P II
対照のQO₂を100としたときの加圧菌のQO₂を%で示す。基質: 焦性ブドウ酸 $\frac{1}{100}$ Mol

要するに, 緑膿菌の呼吸は800kg/cm².前後より抑制をうけ, 1400kg/cm²., 1600kg/cm²., 30分の加圧で全く停止する。それは圧の強さが大なる程, 又加圧時間が長い程著しいが, 基質の種類, 菌株, 或は培養期間によつても差異を示す。

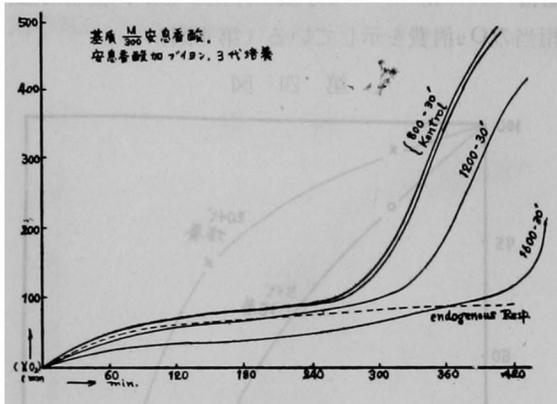
(4) 適応酵素産生に及ぼす影響

安息香酸を適応的に分解する緑膿菌(患者より分離せるもの)を用い, その菌の適応酵素産生が高圧で如何なる影響をうけるかを見た。

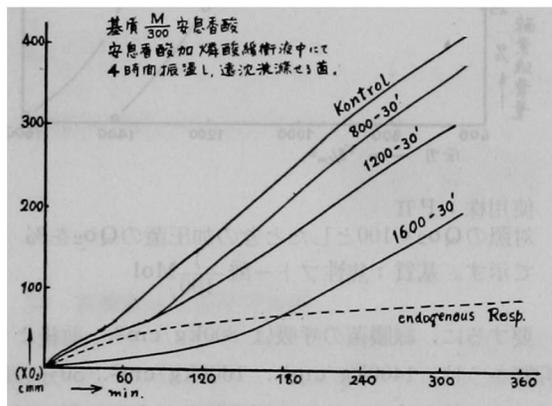
対照菌では4~5時間で安息香酸を分解し, O₂消費を始める。加圧菌では, 800kg/cm²., 30分のもは対照と変わらず, 1200kg/cm²., 30分のもは若干おくらせてO₂消費を示し, 1600kg/cm²., 30分では約2時間以上遅延し, 且つO₂消費量の増加も極めて緩慢である。

次に適応酵素が一旦形成された菌に就いての変化をみるため, 安息香酸を入れ4時間振盪して後洗滌し対照と加圧菌とに分け再び容器に入れてから新しく安息香酸を与えてみた。対照は始めから安息香酸を分解しO₂を消費し始めるが, 加圧菌に於ては同様に最初よりO₂消費を行うが, 圧の強さに従つて対照よりはO₂消費は少ない(第5図)。即ち高圧は適応酵素の産生を遅延せしめるが, 一旦形成された適応酵素の作用に対しては他の構成酵素と同様の抑制を示すものと考えられる。

第五図の1



第五図の2



IV 考 察

本実験に用いた圧は、全局より平等に圧の加わる液圧であるから、個々の菌に対しては全く同様に圧は加わる。而して圧に対し個体により態度を異にしているかもしれないが、その一々を追求することは不可能であり一つの集団として細菌体に及ぼす影響を考えたものである。

従来の文献は必ずしも成績が一定して居らず、Chlopin, Tamman⁸⁾ は3,000気圧以下では圧は細菌に対し影響を及ぼさないが、同じ圧を連続繰返し加えると菌の増殖力、醗酵作用、毒力等を阻害又は抑制すると云っている。又 Larson 等^{15) 6)} は6,000気圧14時間加圧でも芽胞を有しない細菌は殺すことができるが、芽胞菌は12,000気圧でも抵抗性を有つと云い、Basset, Macheboeuf^{1) ~ 8)} は17,600気圧、45分でも芽胞菌は生きてると云う。一方、Johnson, Zo Bell^{12) ~ 14) 22)} 等は海棲菌のあるものは高圧に対し抵抗性を有する許りでなく却つて常圧下よりも発育の促進の見られることがある事を報じ、“barophilic”なる言葉を用いている。

酵母、細菌に対する高圧の影響の一連の研究によ

り、それ程高い圧力でなくとも十分に阻害作用を与えることを見たが、緑膿菌の場合はそれよりも尙低い高圧で作用が顕われるのであつて、1600kg/cm²程度の圧で増殖に対し抑制的に作用し、lag phase を著明に延長せしめる。又、色素産生に対しても或る程度阻害的に作用する。

微生物の酵素作用に就いても、Chlopin 等⁸⁾ は3000kg/cm²、96時間加える事により酵母の醗酵を阻害する事を報告しているが、私の行なつた酵母の実験²¹⁾ では1600kg/cm²でも十分抑制作用を認めた。緑膿菌の呼吸の観察では既に800kg/cm²、30分の圧で呼吸が抑制されることを確認した。唯、馬鈴薯菌(芽胞菌)はO₂消費量に増加があり¹¹⁾、圧に抵抗性が大なるのみでなく、新陳代謝を却つて高める場合があつたが、緑膿菌でも基質によつては800kg/cm²位の圧力で呼吸のたかまる場合もあることが判つた。

緑膿菌の増殖に於て lag phase の延長を認める事は、呼吸の観察に於て1600kg/cm²加圧によりO₂消費が零に近いものが、除圧2~3時間後に急激に酸素を消費し始めることと対比して、圧により障害を受けた菌が除圧後時間の経過と共に恢復してゆくと考えてよからう。チフス菌でも幾分の傾向は認められている¹¹⁾。尙除圧後のO₂消費の急激な増大は、Benthaus⁴⁾ の Pancreas lipase の activity が除圧すると一時促進するという事と関連し興味あることである。

次に基質を異にした場合、同一の実験に於てもO₂消費の抑制の程度に差のある点は特異な現象である。基質としてフマル酸、醋酸、クエン酸、グリセロ燐酸などを用いると、圧力により却つて呼吸の促進がみられた。此はP_IでもP_{II}でも認められることだから偶然のことでなく、之等基質の時は高圧が呼吸促進に働くことを物語ると解してよからう。尙、特定の基質の分解酵素が特に圧に対して抵抗が強い、又は弱いという風に考えるよりは、寧ろ菌体の受ける障害が複雑なため、集団として観察された場合、酵素作用の歪みが生ずると考える方が、色素による染色性の変化、重金属による吸着現象、或はポーラログラフによるSH基の変化など細菌表面構造に及ぼす高圧の影響¹¹⁾からみてもよいのではあるまいか。

Johnson¹²⁾ は高圧による蛋白の変化を論じているが、1600kg/cm²の圧でも細胞膜や表面構造には何等かの変化を生じ得ると思う。著者等は別に電子顕微鏡写真により緑膿菌等の細胞膜の変化、原形質の膨化或は集簇崩壊したと思われる状態をも明らかにしている¹¹⁾。

継代培養した場合、長く培養した方が圧に対する抵抗が強く第4図の如く呼吸の抑制の程度が少ない。之はチフス菌¹¹⁾で培養時間の長いもの程圧の影響が少ないという成績とも考え併せて、培養期間の長いもの程圧に対する抵抗が大であると云えよう。

次に適応酵素産生に対し高圧が之を遅延せしめるといふ事は、やはり菌に高圧が加えられると一時的の障碍状態が続き、酵素作用も全く抑制され、従つて基質安息香酸に対する適応酵素の活性化も之等の細菌が恢復する迄は生起し得ないと思われる。即ち高圧の作用は適応酵素の作用を選択的に阻害するのではなく、菌の生活活動の障碍により酵素的適応をそれだけ時間的にずらしたという二次的現象ではあるまいか。従つて一旦形成された酵素は構成酵素と全く同様の高圧による抑制を受けているのであり、上述の如く遅延は認められない。

尚、芽胞菌の外に葡萄状球菌の如き球菌にもみられた圧による刺戟状態¹¹⁾は、同様に緑膿菌にもあるのであろうが、促えがたいため抑制のみの面が強く表れたのであろう。

文

- 1) Basset et Macheboeuf : C. R. Ac. Sc., 195, 1431, 1932.
- 2) Basset, Macheboeuf, Wollman et Bardach : C.R. Ac. Sc., 196, 1138, 1933.
- 3) Basset, Wollman, Wollman et Macheboeuf : C. R. Ac. Sc., 200, 1072, 1935.
- 4) Benthous : Biochem. Zeitschr., 311, 108, 1941-42.
- 5) Brown, Johnson a. Marsland : J. of Cell. a. Comp. Physiol., 20, 151, 1942.
- 6) Cattell : Biol. Rev., 11, 441, 1936.
- 7) Certes : C. R. Soc. Biol., 36, 220, 1884 ; C. R. Ac. Sc., 99, 385, 1884.
- 8) Chlopin u. Tamman : Z. Hyg. InfektKr., 45, 171, 1903.
- 9) Hite, Giddings a. Weakley : Bull. W. Va. agric. Exp. Sta. No. 146, 1914. (6)より引用)
- 10) 藤田 : 検圧法とその応用, 1949.

V 結 論

細菌に対する高圧の影響を見る目的で、緑膿菌を主として加圧実験し、次の如き結果を得た。即ち、緑膿菌は市橋の報告したチフス菌よりも鋭敏に高圧の影響をうけるもので、800kg/cm²、30分の加圧で既にその影響を蒙り、増殖曲線を於ては lag phase の延長を来し、呼吸の抑制を認める事が出来る。この増殖並に呼吸に及ぼす影響は、圧が高くなるか、或は加圧時間が長くなると大となる。1600kg/cm²、30分の加圧では呼吸が一時停止する外、色素産生能力の減弱を来し、適応酵素産生の遅延も観察し得た。併し、1600 kg/cm² 程度の加圧では、呼吸、増殖能力等は圧除後時間の経過と共に恢復してくる。

尚、基質として醋酸、クエン酸、グリセロリン酸等を用いると、第1株、第2株とも800kg/cm² の高圧で呼吸が促進されたが、之は高圧の呼吸阻害作用機序の解明に意義ある事実かも知れない。

擧筆するに当り終始御懇篤な御指導と御校閲を賜わつた恩師林教授に並びに実験に御協力頂いた細菌学教室市橋博士に衷心から謝意を表する。

献

- 11) 市橋 : 岡医誌, 66, 1, (699), 129, 昭29.
- 12) Johnson, Eyring a. Polissar : The Kinetic Basis of Molecular Biology, Wiley, New York, 1945.
- 13) Johnson a. Lewin : J. of Cell. a. Comp. Physiol., 28, 47 ; 77, 1946.
- 14) Johnson a. ZoBell : J. Bact., 57, 359, 1949.
- 15) Larson, Hartzell a. Diehl : J. of Infect. Disease, 22, 271, 1918.
- 16) Regnard : C. R. Ac. Sc., 98, 745, 1884.
- 17) do : Recherches expérimentales sur les conditions physiques de la vie dans les eaux, Paris, Masson. 1891. (6)より引用)
- 18) Roger : Arch. de Physiol. norm. pathol. 5th, ser, 7, 12. (12)より引用)
- 19) 丹原 : 岡医誌, 64, 5, (683), 909, 昭27.
- 20) 大和 : 岡医誌, 64, 5, (683), 859, 昭27.
- 21) 安田 : 岡医誌, 71, 10の2(777), 昭34.
- 22) ZoBell a. Johnson : J. Bact., 57, 179, 1949.

**On the Influences of high Hydrostatic
Pressure upon Bacteria**

By

Hirosi Yasuda

1st. Dep. of Physiol. Okayam Univ. Medical School

(Director : Prof. K. Hayasi, M.D.)

With *B. pyocyaneus* following results were obtained.

(1) When bacteria are exposed to moderate high pressure (800kg/cm², 30 min.), the lag phase of their reproduction is prolonged and their respiration inhibited.

(2) At higher pressure up to 1600kg/cm², the respiration of bacteria stops and their other functions decline.
