細菌膜の滲透的性狀と菌体内自由水

細菌の抵抗機構に関する研究の III

大 西 正 男

東京医科歯科大学微生物学教室 (主任教授 清水文彦)

〔受付: 6 月 9 日, 1950 年〕

水の持つている種々の物理的恒数は生命がこの中に宿つた事の必然性を説明するに充分である。先に行つた乾燥と生残率に関する観察は、生命と水の繋りに対して行われたものと考えている。その時述べたように生体内の水は、生物学的に生命に密接な繋りをもっている結合水とそうでない自由水に區別できることが Jackson の実験によつて示された。一方物性論的にも溶媒和の現象が知られているので、物理化学的な意味で測定された結合水と、生命現象を結び付けて観察することは生物学及医学において非常に重要なことになつた。

細菌体結合水に関しては既に Friedmann and Henry²⁾ の測定があり、芽胞の耐熱性が結合水の増加によつて説明されんとしている。また Wieringa³⁾ は酵母の水を分つて菌膜に吸湿している 13%, 自由水 13.6%, 結合水 48.4%, 固形分 25% と報告している。

赤血球の Continuous Phase は Haematocrit 法によつて測定されている⁴⁾。Ege によれば赤血球容積と溶媒の滲透圧の間には van't Hoff-Boyle-Mariotte の法則があてはまるから、次の式から Continuous Phase が計算できるという。

$$P(V-x) = P_0(V_0-x) \dots\dots\dots (1)$$

V 及 V_0 は溶媒の滲透圧 P 及 P_0 に相当する赤血球の容積。x は滲透的仕事に無関係な disperse Phase を意味する。

この方法が細菌の Continuous Phase 測定に使えるかどうかについては疑問がある。Hylkema⁵⁾ は酵母と細菌の細胞膜はつよいために高張液内での容積変化から細胞膜の滲透性を研究することはできないという。また Dubos⁶⁾ も高張液内では細菌体に原形質剝離が起ると考えているようである。多くの細菌は高張培地内でもよく発育できることが報告され、それを分類に利用することが考えられているほどである⁷⁾。菌種によると乾燥状態にある食塩結晶上に生存できる上に、16%以下の食塩濃度では生長できないものもあるという⁸⁾。以上の結果からすると、細菌原形質の滲透圧なるものを知らないという Falk⁹⁾ の見解にも一應頷くことができる。

私の以下の報告は細菌体の体積と溶媒滲透圧の関係を Haematocrit 法で求め、これから計算した自由水に関する知見についてである。

1

Haematocrit 法で菌体容積を測定するためには遠心によつて菌体間の水を完全に圧排できることを仮定しなければならない。血球では Kuppe の Criterion によつて遠心の終末点で決まるといふが、細菌ではこれに相当する透明化は見られなかつた。しかし 7000 r.p.m. で 4 時間以上遠心すると、体積は恒常となつた。細菌用遠心沈澱管は内径 2 mm の肉厚硝子管の底を平らに閉じて作つた。種々の予備的実験の後、次のような方法を採用した。

培養菌を中性生理食塩水で 4 回洗い、沈渣の一定量宛を小試験管に入れ分ける。各試験管に等量の各種濃度の中性食塩水 (とくに第 1 管には中性蒸溜水、第 2 管には中性生理食塩水、以下は種々の中性高張食塩水) を加え、各管の内容を混和する。これ等を毛細管ピペットで内径 2 mm の前記遠心沈澱管に目盛 (底より 6 cm) まで容れ、700 r.p.m., 4 時間遠心する。遠心後液の高さ l_0 (約 6 cm), と沈渣の高さ l_b をコンパレーターで測り、 l_b/l_0 を求める。この値に相当する食塩水濃度 Cr は Gough¹⁰⁾ の計算法¹⁰⁾に従つた。 l_b/l_0 が 0.2 の辺りの濃さの菌液を使つた時が一番誤差が少なかつたのでそのように菌液を作つた。

2

大腸菌の普通寒天斜面で 17~18 時間 37°C で培養したものについて食塩水濃度と菌容積の關係を見た。5 回の測定結果を第 1 表に示した。各濃度における l_b/l_0 を生理食塩水の場合のそれに対する百分率で表わしたものを比容積とすると、食塩水濃度 Cr と比容積の關係は第 1 図のようになる。Ege の (1) 式の P を食塩水濃度に置

ONISHI, Masao: Studies on the mechanism of resistance of bacteria. III. The permeability of bacterial cell-membrane and the free water in the bacterial body. Japan. J. Bact., 5(6): 361-365, 1950.

第 1 表

	C_0	Cr	l_b/l_0	相対値	l/Ca	l_b	l_0
1	0.0	0.36	0.1339	107.2	2.78	7.847	58.606
	0.85	0.85	0.1249	100.0	1.18	7.286	58.389
	2.0	1.50	0.1115	89.3	0.670	6.749	60.472
	3.0	2.06	0.1135	91.0	0.486	6.791	59.785
	4.0	2.60	0.0980	73.6	0.385	5.887	60.112
	5.0	3.17	0.1026	82.3	0.316	6.178	60.232
	6.0	3.72	0.1005	80.6	0.269	6.068	60.397
	8.0	4.81	0.0970	77.8	0.203	5.795	59.825
2	0.0	0.36	0.1320	103.8	2.77	7.890	59.823
	0.85	0.85	0.1204	100.0	1.18	7.169	59.527
	4.00	2.59	0.0937	82.0	0.386	5.969	60.502
	5.00	3.17	0.1037	86.0	0.316	6.172	59.491
	8.00	4.80	0.0954	79.2	0.208	5.657	59.411
3	0.0	0.35	0.1433	103.0	2.82	8.650	60.394
	0.85	0.85	0.1329	100.0	1.18	7.795	58.660
	2.0	1.49	0.1211	91.3	0.755	7.225	59.626
	3.0	2.06	0.1145	86.3	0.485	6.831	60.131
	4.0	2.61	0.1060	79.8	0.383	6.366	60.053
	8.0	4.83	0.1012	75.8	0.207	6.056	59.904
4	0.0	0.35	0.150	111.5	2.86	8.945	59.578
	0.85	0.85	0.135	100.0	1.18	8.133	60.364
	2.0	1.50	0.114	84.5	0.666	6.796	59.829
	3.0	2.08	0.121	89.7	0.481	7.301	60.060
	4.0	2.62	0.110	81.8	0.382	6.631	60.157
	5.0	3.18	0.106	73.8	0.314	6.383	60.066
	6.0	3.74	0.106	73.8	0.267	6.271	59.989
5	0.0	0.32	0.1138	99.8	3.08	6.739	59.235
	0.85	0.85	0.1140	100.0	1.18	6.645	58.439
	2.0	1.49	0.0920	87.3	0.672	5.952	59.823
	3.0	2.04	0.0952	83.3	0.491	5.742	60.324
	4.0	2.58	0.0893	78.5	0.388	5.445	60.619
	5.0	3.13	0.0902	79.3	0.320	5.395	59.913
	6.0	3.72	0.0933	82.0	0.263	5.580	59.831
	8.0	4.78	0.0934	82.0	0.209	5.613	60.075

第 1 図

換えると,

$$Cr(V_r - x) = C_0(V_0 - x) \dots\dots\dots(2)$$

V_0 はこの場合 100, V_r は比容積, x は菌体内 disperse Phase の容積である。これを變形して,

$$V_r = C_0(V_0 - x) / Cr + x \dots\dots\dots(3)$$

細菌膜が半透過性で菌体外の食塩水の濃度変化に應じて菌容積を收縮或は拡張する場合, 細菌膜に抵抗性がなければ第 1 表の $1/Cr$ と V_r は直線であればならぬ。第 1 図の B は $1/Cr$ と V_r でプロットしたもので, 低張部を除いた部分の実測点は直線に乗っていた ($a=0.01$)。各点から最小自乗法によつて, $C_0(V_0 - x)$ は 22.2, x は 73.9% と計算された。

大腸菌体を高張液に入れた場合は, van't Hoff の式に従つて体積を縮小すると思われる。一般に (3) 式によつて菌膜の透過性を考えることが可能である。

(3) 式で, Cr が無限大のときは $V_r = x$, 従つて (3) の直線が Y 軸を切る点が disperse Phase である。 $V_0 - x$ は continuous Phase 或は自由水の容積となる。簡単に考えて, 食塩水の濃度が大きくなり, その比重が菌体の比重と等しくなるときは, いかに強く遠心しても菌体は沈まない。従つて実験的には x は求められない。しかし (3) 式を用いて x を計算すれば正しい値を推定することができる。

食塩水内での容積の変化を Cr による仕事と見ると,

$$V_r - V_0 = \int_{V_0}^{V_r} Cr dV$$

(2) より

$$\begin{aligned} V_r - V_0 &= \int_{V_0}^{V_r} C_0 \frac{V_0 - x}{V - x} dV \\ &= C_0(V_0 - x) \ln \frac{V_r - x}{V_0 - x} \\ &= C_0(V_0 - x) \ln \frac{C_0}{Cr} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} V_0 - V_r &= C_0(V_0 - x) \ln Cr - C_0(V_0 - x) \\ &\quad \ln C_0 \dots\dots\dots(4) \end{aligned}$$

(4) によると濃度の対数と菌体容積の変化は直線関係でなければならない¹⁰⁾。(4) の傾斜度は透過による仕事の難易を意味すると思うが, この値は (3) の傾斜度に等しく, 細胞内の disperse Phase によつて決まる。

(3) に $C_0(V_0 - x) = 22.2$, $x = 73.9\%$, $Cr = 0.35\%$ を代入すると, $V_r = 137.4\%$ となる。これは低張液内の大腸菌の推定容積である。実測された食塩水 0.35% に対応する容積は約 107.0% であつた。大腸菌は低張液内では, (3) 式とは異つた物理化学的法則に支配されている。

3

以上の観察を大腸菌以外の菌について行つた。Sal.

第 2 表

菌 名	培養時間	$C_0(V_0-x)$	x	V_0-x	α	低張部の容積(%)	
						實測値	理論値
Esch. coli	1 h.	21.8	75.6	24.4	0.01	112	139
	3	33.6	60.7	39.3	0.01	97	157
	17	22.2	73.9	26.1	0.01	107	137
	32	19.2	77.3	22.7	0.01	96	130
	4日	16.5	79.3	20.7	0.01	93	122
Bac. subtilis	17 h.	21.8	74.3	25.7	0.01	101	133
	32	16.5	79.7	20.3	0.01	99	130
	4日	13.2	85.1	14.9	0.01	101	121
	sporh	0	100	0	—	—	—
Vib. El Tor	17 h.	20.6	75.6	24.4	0.01	115	132
	32	14.6	82.2	17.8	0.05	114	134
	4日	13.1	85.3	14.7	0.01	109	123
S. paraty. A	17 h.	23.9	71.5	28.6	0.01	96	139
S. paraty. B	17 h.	22.8	73.1	26.9	0.01	98	137
Shig. dysent.	17 h.	21.2	75.3	24.7	0.01	101	130
Pseud. aerug.	17 h.	21.0	74.7	25.5	0.01	104	133
Bac. brevis	17 h.	22.5	74.2	25.8	0.01	90	130
Yeast	17 h.	25.6	70.2	29.8	0.01	98	141

α は $Vr = C_0(V_0-x) - \frac{1}{Cr} + x$ に對して檢定した場合の危険率

低張部は 0.34%~0.40%, 平均 0.36%食鹽水

paratyphi A, *Sal. paratyphi B*, *Shig. dys.* (*Shiga*), *Pseud. aeruginosa*, *Vibrio El Tor*, *B. subtilis*, *B. brevis*, *Staph. aureus* (寺島), *Sarc. conjunctiva*, *Yeast* を普通寒天培地 37°C, 17時間培養したものをしらべた。

結果は第2表のようであつた。*Staph. aureus* 及 *Sarc. conjunctiva* 以外の菌は高張部で全部1%以下の危険率で(3)式にあてはまつていた。

桿菌はグラムの陰陽をとわず 24.4%から 23.5% 平均 25.9%の自由水を持つていた。*Yeast* 細胞も細菌と同様(3)式で容積を変化し, 自由水は 29.8%と計算された。

これ等の菌も大腸菌と同じように低張部では(3)式では取扱えず, 容積はほとんど増加しなかつた。*Vibrio El Tor* と *B. brevis* 以外の菌は平均 0.36%の食鹽水内で平均 101%(最大 107.1%, 最小 96.2%)の容積であつた。これ等の菌は測定方法の精度からみて低張部で容積を変化しないと考えられる。*Vibrio El Tor* は 0.37%食鹽水内で 114.6%の比容積で少し容積を増し, 反対に *B. brevis* では比容積 90.0%で容積を減少していた。

Staph. aureus では約 2%の食鹽水までは容積を変化せず, それ以上高張になると(3)式で取扱えるようになる。無限大濃度における容積から計算される自由水は約 14%であつた。

Sarc. conjunctiva では他の桿菌とおよそ同じように高

張部で容積を減少していたが, 危険率は大きく(3)式にあてはまるとはいえなかつた。無理に最小自乗法で求めた直線から自由水を計算すると 9.4%で非常に少なかつた。いずれにしても球菌の場合は桿菌とは少し違つていた。

4

培養時間とこれ等の量の関係を求めた。大腸菌, *B. subtilis*, *Vibrio El Tor* の3種について実験した(第2表)。

培養時間を増すと共に全部自由水を減少している。枯草菌の芽胞についての実験では(3)式があてはまらなかつた。7回の実験結果はかなり誤差が大きいが確かな判断は困難であつたが, その比容積は滲透圧の変化に関係のないように思われた。

考 察

前報告でえた種々の細菌体水分が培養時間と共に変化する模様を今の実験でえた自由水の変化に組合してみた(第3表)。細菌体固形分は培養時間によつて変化しないと仮定して, 菌体水分をこの量に対する百分率で表わした。計算の便利上から菌体の比重を1とした。第2図の a , b , c がこの表を図示したものである。図中1と2の間が菌体間隙をみたす水と思われる W_2 を意味し, 2と3の間は菌体内の自由水, 2と4の間は W_1 であ

第 3 表

菌 名	培養時間	固形分	W 3	Wf	W 2	W 2 + W 3
Esch. coli	h. 3	18*	%	%	%	%
	5	18	82(456)	39(218)		
	17	39*		39(218)		
	18	39	61(156)	26(67)	32(82)	233
	32	38*		23(60)		
	42	38	62(163)		40(105)	268
	90	37	63(170)		37(100)	270
	96	37*		21(56)		
V. El Tor	112	42	58(138)		47(112)	250
	162	43	57(133)		51(119)	252
	15	12	88(734)			
	17	23*		24(104)		
	18	28	72(257)		44(157)	414
	32	27*		18(67)		
	42	26	74(285)		52(208)	493
	66	37	63(170)		62(167)	337
B. subt. spor	96	42*		15(36)		
	112	47	53(113)		107(228)	341
	480	43	57(132)		126(293)	425
	5	29	71(245)		63(217)	462
	17	36*		26(72)		
	18	36	64(178)		48(133)	321
	32	40*		20(50)		
	66	48	52(108)		170(354)	462
B. subt. spor	84	60	40(67)		156(261)	328
	96	60*		15(16)		
	65	35	54(54)		233(359)	413

W 3 は第 3 期の水分

W 2 は第 2 期の水分

Wf は自由水

* は推定値

() の中は固形分に對する百分率

る。3 と 4 の間を菌体の結合水と見るなら、誘導期に細菌は結合水と自由水を多量にとり入れ、対数期に入ると共に結合水と自由水を減少する。W₂ は培養時間と共に多くなる。そして細菌に關係のある水の総量はおよそ不変のようである。以上は菌体固形分が培養時間に伴つて変化しないという仮定に立っていることを再び指摘する。

芽胞が高張液内で容積を変化しなかつたことは 2 通りに解釈できる。即ち自由水が無いのか、菌膜がつよくて

第 2 図 菌体水分の変化

奪水があつても原形質剥離によつて容積減少を補つてゐるかどうかである。芽胞の耐乾性とか Friedmann and Henry の実験成績から考えて芽胞内の全部の水は結合水であると考えたい。

低張液内で細菌はほとんど容積を変化しない。細菌の収縮に対して機械的な抵抗を示さない菌膜が反対に膨張に対して抵抗したと解釈されるが、興味のある事実である。細胞が水を取り入れる機序は複雑で單なる透過ではないのだからと思う。この事が蒸留水中で細菌が長く生存できるという事実¹²⁾の説明であるかも知れない。

最後に今までの全部の実験結果を集めて、細菌の乾燥死と自由水の關係を考察する。細菌の乾燥死に対する限界乾燥度を菌体重量に對する比較重量で表わし、また菌体の比重を 1.3¹³⁾ と仮定して、菌体自由水を重量比率で表わしたものが第 4 表である。この計算結果から、大腸菌と *Sal. paratyphi B* では菌体原形質の continuous Phase が乾燥されつくす以前に乾燥死が生じ、綠膿菌では乾燥が菌体内に及ばない間に死ぬ。この結果から間接的にはとにかく、結合水と乾燥死を直接結付けることはできないと思う。

結 論

Haematocrit 法を細菌に應用して、各種高張食塩水中の菌体容積の変化を測定した。桿菌、Vibrio、Yeast は van't Hoff の法則に従つて高張液内で体積を縮小した。

第 4 表

菌 名	固 形 分	水 分	限 界 乾 燥 度			自 由 水 (d=1.3 とし計算)	
			固形分に 對して	菌體に 對して	水 分	容 積 比	重 量 比
Esch. coli	39%	61%	152%	59%	41%	26.1%	20.0%
S. paraty. B	39	61	175	68	32	26.9	20.6
Ps. aerug.	29	71	440	128	-28	25.3	19.5

その結果は高張部で x を disperse Phase とする Ege の補正式から導いた。

$$V_r = C_0(V_0 - x) 1/Cr + x$$

によく適合した。自由水と考えられる $V_0 - x$ は桿菌及 *Vibrio* で平均 25.9%, Yeast は 30% であつた。球菌は桿菌のように上式の取扱えなかつたが推定される自由水は約 12% で菌体水分同様少なかつた。低張液内では菌体は容積を変化しなかつたが、これは細菌が蒸溜水中で長く生存できることと関係があると思う。細菌は培養時間と共に自由水と結合水を減少するように推定された。芽胞は高張液内で容積を変化しない。これは自由水が無いためかと思う。

自由水と乾燥死の限界乾燥度を比較すると、結合水と乾燥死との間には間接的な関係はないと思う。

清水文彦教授の御指導を深く感謝する。

引用文献及説明

- 1) Gortner, R. A.: Ann. Rev. Biochem., 1, 21, 1932. に詳しい。
- 2) Friedmann, C. A. and B. C. Henry: J. Bact., 36, 99, 1938.
- 3) Wieringa, K. J.: Protoplasma, 8, 522, 1929-

30.

- 4) Gough, A.: Biochem. J., 18, 202, 1923; G. Krevisky, Biochem. J., 24, 815, 1930; R. Ege, Biochem. Z., 150, 99, 1922; E. Schiødt, Biochem. J., 25, 8, 1931.
- 5) Hylkema, B.: De permeabiliteits verhoudingen bij gisteellen en bacterien, Proefschr. Utrecht, 1916, cited in Wieringa.
- 6) Dubos, R. J.: The Bacterial Cell, p. 32, 1949.
- 7) Scherman, J. M. and H. M. Hodge: J. Bact., 40, 11, 1940; Knorr, M., Centb. f. Bakt., I, Orig., 102, 297, 1927.
- 8) Browne, W. W.: Proc. Soc. Exp. Biol. and Med., 19, 321, 1922.
- 9) Falk, I. S.: Abs. Bact., 7, 33, 1923.
- 10) $Cr = \frac{0.5C + (0.5 - l_b/l_0) 0.85}{1 - l_b/l_0}$,

C は加えた食鹽水の濃度。高張液内で滲出したのは等張液と假定している。

- 11) 實驗結果はこの式に合つていた。
- 12) 吾々の實驗では生理的食鹽水中よりも蒸溜水中の方が長く生存した。又 Winslow, C. E. A. and O. R. Brooke: J. Bact., 13, 235, 1927.
- 13) Armquist, E.: Z. f. Hyg., 28, 321, 1898.