加熱による溶菌現象について (第1報)

川 田 十 三 夫

九州大学医学部細菌学教室 (主任 戸田忠雄教授)

〔受付: 5月5日, 1952年〕

細菌の自己融解に関しては, 自己溶菌を容易におこす肺炎球菌に就いて Avery & Cullen¹⁾, Goebel & Avery²⁾, Dubos³⁾ 4) 等により広汎な研究がなされている。Dubos³⁾ は autolysis が細胞の蛋白, リポイド, 核酸, 多糖類等の分解に與る多様な酵素による細胞崩壊を伴う複雑な現象であると述べている。私は人糞より分離された *Aerobacter* 属の一菌株 (C4 菌と仮称) のファージについて, ファージ吸着実験を行つている際, この菌を 60°C 水浴中で 30 分間加熱すると, 菌液が著しく透明化することに気付いた。此の現象は耐熱性の自己融解酵素により菌が崩壊する爲におこるのではないかと考え, 次の様な実験を行つた。

実験材料及び方法

菌液: 18~20 時間 37°C で普通寒天平板上に培養した菌を生理的食塩水に浮游し, 遠沈により洗滌後, 菌濃度が凡そ 10 %/ml 程度になる様に再び生理的食塩水に浮游し菌液とした。実験に用いた C4 菌は *Aerobacter* に属し, その生物学的性状は *Aerobacter cloacae* に類似する点が多いが, 橙黄色の色素を産生する。

菌液の加熱: 菌液は通常 10~15 ml 宛試験管に分注し, 一定温度の水浴中で加熱した。

菌液透明度の判定: 所要の時間に菌液を約 2 ml 取出し, 流水で速かに冷却した後, 比色計のセルに移した。比色計は A.K.A. 光電管比色計 (島津製作所) を使用し, その際セシウム電池, Filter O とし, 被検菌液の透光度 (%T) を生理的食塩水の透光度 100 %T に比して読み取った。

実験成績

1. 諸温度の C4 菌液透明化に及ぼす影響

C4 菌液を 50°C, 60°C, 70°C, 80°C, 90°C, 100°C の水浴中で, 夫々加熱し, 菌液の透光度の変化を時間の経過と共に読み, 第1図に示す成績を得た。60°C 加熱の場合菌液の透明化は最も著しく, 15~30 分迄は急速に透明化が行われ, その後は緩徐になり 1 時間後には大体平衡状態に達する。70°C に於ても 15 分間加熱では 60°C 加熱のその時間のものより却つて透明化が著しいが, 其

の後は余すゝまない。恐らく菌液加熱を最初常温から行う爲, 菌液が所定の温度になる迄に若干の時間を費し, より低温の時期には透明化が行われるが, 高温に達すると透明化が減弱又は停止する爲と思われる。80°C 以上の高温では益々透明化は減ずるが幾分ながらも行われるのは 70°C の場合と同様な理由があるからであろう。50°C に於ては極めて徐々ではあるが透明化がみられ, 1 時間加熱後も曲線は上昇する。これは 50°C の場合は菌が徐々に死滅すること一因であろう。因みに C4 菌は 60°C 30 分加熱で死滅する。

第1図 諸温度の C4 菌液透明化に及ぼす影響

2. 諸種菌の 60°C 加熱による菌液濁度の変化

教室保存の黄色葡萄球菌 (209-P 株), 赤痢菌 (志賀菌及び駒込 B III 菌), 腸チフス菌 (H 901 株), パラチフス A 及び B 菌, 大腸菌 (*E. coli communis*), コレラ菌 (原型及び中間型), 肺炎桿菌, 緑膿菌, 変形菌 (OX-19 株), 霊菌, *Aerobacter aerogenes* (予研株) について C4 菌と同様に 60°C 加熱を行い, 菌液透光度の変化を調べた。

KAWATA Tomio: On the bacteriolytic phenomenon by heating. Department of Bacteriology, Faculty of Medicine, Kyushu University. —Jap. J. of Bact., 7(5): 529-533, 1952.

処、靈菌及び緑膿菌では可成 C4 菌に劣るが透明化が見られ、他の諸菌でも極く僅かながら透明化がみられた。

鳥取大学医学部衛生学教室より分與された *Aerobacter* 属の 8 株について同様な実験を行い、C4 菌と同様な菌液透明化がおこる菌株が 2 株あることを知った。これらの菌については検索中である。

3. 諸 pH の C4 菌液透明化に及ぼす影響

菌液の medium の pH が加熱時の菌液透明化に如何に影響するかを知る爲、McIlvaine 磷酸曹達一枸橼酸緩衝液を菌液の medium とし 60°C 水浴で加熱し、第 2 図の如き成績を得た。pH 5.8~6.8 に C4 菌液透明化の至適があり、それよりアルカリ域乃至酸性域に傾けば透明化は減弱し、pH 4.2 以下では菌液濁濁度は却つて増し、pH 2.0 では逆に透明化が幾分みられる。

第 2 圖 諸 pH の C4 菌液透明化に及ぼす影響
(初發菌液透明度：32% T 30 分間 60°C
加熱後の% T を示す)

4. 加熱による C4 菌の形態及び染色性の変化

C4 菌の生理的食塩水浮游液を加熱前及び一定時間 60°C 加熱後、同一スライドガラス上に一滴宛塗抹し、乾燥後火焰固定し、0.1% フクシン水溶液で 5 分間染色し、水洗乾燥して鏡檢した。

加熱前の C4 菌はフクシンにより一様に濃く染る短桿菌で菌体内部構造は殆んど認められないが、15 分間 60°C 加熱するとフクシンに対する染色性は減じ、菌体内部に單在性顆粒を多くの菌に認め、少数の菌では啞鈴狀顆粒も認められる。併しこの様な顆粒を認めず唯單に染色性が乏しくなった菌も多く認められる。30 分経過したものでは菌の染色性は更に減じ所謂 ghost cell の觀を呈し菌の塊狀片又は破屑をみるにいたるが顆粒は残存している。この様な形態学的所見からこの場合の菌液の透明化は溶菌と同意義をもつことを知った。C4 菌は Feulgen

反應により凡ての菌体内に濃染性顆粒を認めるが、加熱により出現する顆粒とはその外觀が幾分異なるようである。この点は検討中である。

5. 酵素阻害剤乃至細胞毒の加熱溶菌に及ぼす影響

(i) 石炭酸、昇汞、シアンカリ、ホルマリンを夫々菌液の medium に加えた場合

C4 菌を 3% 石炭酸水溶液、0.1% 昇汞水、M/100 シアンカリ水溶液、3% ホルマリン水に夫々浮游し、60°C 水浴中で加熱した。第 1 表に示す如く 3% 石炭酸水、0.1% 昇汞水を medium とした場合は菌液の透明化はおこらず、却つて濁濁度をました。これは恐らく菌蛋白質の凝固によるのであろう。3% ホルマリン水、M/100 シアンカリ水溶液の場合は透明化が僅かにおこるに過ぎない。対照として蒸留水と生理的食塩水を medium にした場合、生理的食塩水の方が溶菌をおこし易いことが分つた。

第 1 表 酵素阻害剤の菌液透光度 (% T)
に及ぼす影響

加熱時間 (分)	阻 碍 剤 3% 石炭酸	3% ホルマリン	0.1% 昇汞	M/100 KCN	蒸留水	生理的食塩水
0	27.5	32.0	32.0	37.0	25.0	27.5
15	23.0	38.5	23.0	40.5	39.5	52.5
30	20.0	37.5	23.0	41.5	50.5	66.5

(ii) 石炭酸、ホルマリン、昇汞、エタノールで夫々処理した死菌及び 100°C 加熱死菌についての実験

C4 菌を 3% 石炭酸水、3% ホルマリン水、70% エタノール、0.1% 昇汞水の各々に浮游し 20 分間室温放置後、各菌液を 3000 r.p.m. で 20 分遠沈し、菌を生理的食塩水に浮游し、再び遠沈を 2 回繰返し、薬剤を洗去した後沈渣を生理的食塩水に再浮游し、各々 15 ml 宛試験管に分注した。又 C4 菌を予め沸騰している生理的食塩水に浮游し、沸騰水中にて 10 分間加熱した後遠沈し、沈渣を再び生理的食塩水に浮游し被檢菌液とした。処理した夫々の菌液について菌の生死を判定する爲、各菌液の一滴宛をブイヨンに接種し、用いた凡ての処理法に於て菌が死滅している事を確めた。ホルマリン、エタノール、昇汞水で処理した菌液では菌は既に死滅しているにも拘らず菌液の透明化は無処置のものと同程度におこることを知った。石炭酸処理の菌液でも幾分透明化がみられる。併し 100°C 加熱死菌に於ては却つて菌液濁濁度が増している。

此等の実験から C4 菌の加熱による溶菌が酵素阻害剤

乃至細胞毒により抑制され、その抑制は菌の死滅後一定時間内にその薬剤を除去する時は、加熱による溶菌が尙おこり得ることを知つた。

6. 諸濃度のホルムアルデヒドの加熱による溶菌現象に及ぼす影響

(i) 諸濃度のホルムアルデヒド水溶液を medium とした場合

C4 菌を蒸留水で洗滌後、再び蒸留水に浮游し菌原液とする。局方ホルマリンよりホルムアルデヒド水溶液をつくり、菌原液添加後ホルムアルデヒド濃度が各管で 0.5, 0.1, 0.05, 0.01 % になる様調製する。この諸濃度のホルムアルデヒド溶液に菌原液を加え、60°C 加熱し第 2 表左欄の如き成績を得た。ホルムアルデヒド濃度が 0.01 % 以下では溶菌は阻止されないが、0.05 % 以上の高濃度になると阻止され、0.5 % では菌液濁濁度は却つて増加した。

(ii) ホルムアルデヒド処理菌についての実験

C4 菌を 0.1, 0.5 % のホルムアルデヒド水溶液に各々浮游し、37°C 17 時間放置後遠沈し、沈渣を生理的食塩水で 2 回洗滌後、再び生理的食塩水に浮游し、60°C 加熱を行い、菌液透光度の変化を調べ、第 2 表右欄に示す成績を得た。即ち、0.1 % ホルムアルデヒドで処理した菌では 60°C 加熱により可成の透明化がみられたが、0.5 % 溶液で処理した菌では全く溶菌がおこらなかつた。

Dubos⁶⁾ は肺炎球菌の自己溶菌が高濃度 (0.2~0.5 %) のホルムアルデヒドで完全に阻止され、且つこの様な高濃度のホルムアルデヒドで処理した菌を生理的溶液で洗滌後、再び生理的溶液に浮游した場合は自己溶菌を再びおこし得ることを観察し、これはホルムアルデヒドの存在下で不活性にとどまつているが、それが除去されると活性を恢復する菌体内の酸素系によると述べている。C4 菌の 60°C 加熱溶菌に於ても同様な現象を見ることが出来た。

第 2 表 ホルムアルデヒドの菌液透光度 (% T) に及ぼす影響

實 験 濃度 (%)	(i) medium 中の濃度					(ii) 菌處理に 用いた場合	
加熱 時間 (分)	0.5	0.1	0.05	0.01	0	0.5	0.1
0	35.0	34.0	33.0	34.0	35.5	59.5	34.5
15	30.5	39.0	40.5	45.5	48.0	59.5	45.0
30	29.0	43.0	47.0	52.5	55.0	59.5	46.0

7. 石炭酸の加熱溶菌に及ぼす影響

諸濃度の石炭酸が C4 菌加熱溶菌現象に及ぼす影響を知る爲、ホルムアルデヒドの場合と同様な方法で実験を行い、次の様な成績を収めた。

(i) 0.01 % ~ 0.1 % 石炭酸水溶液を medium とした菌液の溶菌は石炭酸を含まない対照と同様な溶菌をおこすが、0.5 % 溶液では少し阻止され、1 % 溶液では溶菌を全く阻止する。

(ii) 0.1 % 石炭酸水で 37°C 17 時間処理した菌を石炭酸除去後、生理的食塩水に浮游する時は溶菌は行われるが、1 % 溶液で処理した菌では溶菌は阻止された。

8. トルオール処理死菌における加熱時の態度

Dubos³⁾ は肺炎球菌の生理的食塩水浮游液に過剰のトルオールを加え、37°C 24 時間放置すると自己溶菌がおこり、グラム陰性の菌破屑からなる溶菌液を得、これを用いて自己融解酵素の或る程度の精製を行つた。C4 菌に於ては、このようなトルオール処理で溶菌はおこらなかつた。

C4 菌を生理的食塩水に浮游し過剰のトルオールを加え、37°C 18 時間放置後トルオールを除き、菌液を遠沈後再び生理的食塩水に浮游し、60°C 水浴中で加熱した。菌液の透明化は僅かに見られる程度で、0.1 % フクシン水溶液で染色すると、やゝ膨化した濃染性の短桿菌を認める。

9. アセトン処理乾燥菌に於てみられる溶菌現象

Dubos⁴⁾ は肺炎球菌をアセトンで処理した乾燥菌に於て、“flash lysis”がおこるのを見た。C4 菌においても類似の現象がみられた。

C4 菌の生理的食塩水浮游液に 8~10 倍量のアセトンを加え、氷室に 1 時間放置後遠沈し、沈渣に冷アセトンを加えて脱水した後、菌塊をデシケーター中で真空乾燥し、乾燥菌を得た。この処理で菌は完全に死滅していた。

(i) アセトン処理乾燥菌を生理的食塩水に浮游し、試験管に 15 ml 宛 2 本分注し、1 本は 37°C 孵卵器に、他は 60°C 水浴中に放置して、所定の時間に透光度の変化を調べた。この場合当初の菌液透光度は 16 % T であつたが、60°C 加熱で 10 分後には 43 % T になり、30 分後には 54 % T になつた。37°C 孵卵器に入れた菌液でも 30 分後には 24.5 % になり、150 分後には 55.0 % T になつた。かゝる急速な溶菌は恐らくアセトン処理により菌は死滅するが、耐熱性の自己融解酵素は活性を保ち、予め菌が死滅している爲、酵素が直ちに作用し始める爲と考えられる。又この実験でアセトン処理菌が 37°C の如

き比較的低温でも溶菌することを知つたので、諸温度に於ける乾燥菌の溶菌について実験を行つた。

(ii) 諸温度のアセトン処理菌の溶菌に及ぼす影響

常温での自己溶菌を避ける爲、アセトン処理乾燥菌を予め氷水に保つた生理的食塩水に浮遊し、小試験管に各々3 ml 宛分注し、各管を2本宛40°C、50°C、60°C、70°C、80°C、90°C、100°Cの水浴に入れ、又37°C 孵卵器及び室温(17°C)に各2本宛放置し、15分後及び30分後に各管を各水浴中から取り出し、直ちに氷水に入れ冷却した後、手早く透光度の変化を読み第3図に示す様な成績を得た。

この場合当初の菌液透光度は30% Tで、図に於て明かな様にアセトン処理乾燥菌を生理的食塩水に浮遊した場合は、その溶菌の至適温度は60°C 附近にみられる。生菌の場合、50°C 以下の低温では溶菌は短時間では殆んどおこらないが、アセトン処理では菌は死滅するが溶

第3図 諸温度のアセトン処理乾燥菌の溶菌に及ぼす影響 (初發菌液透光度 30% T)

菌に關する酵素系が障碍を受けない爲か30°C~40°Cに於ても溶菌が可成り速かに行われる。70°C以上の高温に於ては、早期に可成りの溶菌がみられるが、15分加熱以後時間が経過してもそれ以上溶菌がすすまない。これは加熱が氷水の温度に保たれた菌液について行われる爲、所定の高温に達する迄に若干時間を経過し、其の間に溶菌が行われると考えられる。他方この酵素系が70°C以上の高温に於ても活性を或る程度維持する爲であろう。肺炎球菌の自己融解酵素は60°C 10分加熱でこわれるが、C4菌は耐熱性の酵素系をもつようである。

考 察

多様な酵素反應が興つて行われる autolysis の機序を窺うことは中々困難なことである。Dubos⁵⁾は生菌体内では休止状態にあつた種々の酵素が菌の死後活動を始め、これらの酵素反應の結果として自己溶菌がおこり、肺炎球菌に於てみられる様に細胞の形態学的成分を犯す特定の酸素を特に自己融解酵素と呼ぶ場合があると述べている。

私は *Aerobacter* 属の C4 菌の生理的食塩水浮游液を60°C 加熱すると菌液が著しく透明化する現象に着目し、それが酵素系によるものか否かを知る爲実験を行い、次に述べる様な理由でこの現象が單なる熱作用による細胞膜の破裂から招来されたものではなく、耐熱性自己融解酵素系によるものと考えた。即ち、この溶菌が酵素阻害剤で阻止され、至適 pH を5.8~6.8に持ち、又アセトン処理菌に於ては肺炎球菌で見られた様な急速な溶菌が37°C の如き比較的低温でもおこり、且つそれがリボヌクレアーゼの至適温度60°C~65°C⁷⁾に相似した至適温度をもつ。白血球、臍抽出物及び他の多くの組織抽出物は肺炎球菌の加熱死菌をグラム陽性から陰性にするが、これに與る酵素は耐熱性で、核酸を水解するが他方結晶リボヌクレアーゼも同様な性質をもっている^{8) 9) 10) 11)}。C4菌の溶菌液について肺炎球菌に対する効果は検討中であるが、これら組織抽出物にふくまれる耐熱性酵素とC4菌の耐熱性酵素との類似性が考えられる。

フクシン染色によりC4菌の加熱溶菌に際して現われる顆粒と Feulgen 顆粒の關聯は詳かでないが、DNAに富む核がリボヌクレアーゼ類似の性質を有する酵素により崩壊され難い爲に核部分が残存するのではないかと想像されるけれども、この点の究明は今後に残されている。

結 論

Aerobacter 属一菌株 (C4 菌) の生理的食塩水浮游液を60°C 加熱すると菌液は著明に透明化してくる。光電管比色計を用い、菌液の透光度を測定することにより、60°C に於て菌液の透明化は最も迅速に行われ、その至適 pH は5.8~6.8で、酵素阻害剤により抑制される。菌液の透明化がすすむと共に、菌はフクシンに対する染色性が乏しくなり、ghost cell 化してゆくと共に、多くの菌では濃染性顆粒が出現する。

アセトン処理乾燥菌の生理的食塩水浮游液は60°C 加熱により急速な溶菌をおこすが、他方30°C~40°Cに於ても可成り速かに溶菌する。併し、その至適温度は矢張り60°C 附近にあることを知つた。

以上の如き実験成績から, C4 菌の加熱による菌液の透明化は耐熱性酵素系による自己溶菌に起因すると思う。

(終りに臨み御指導御校閲をいただいた戸田教授に深謝し, 助言の勞をとられた武谷助教授に感謝致します。)

文 献

- 1) Avery, O. T. & Cullen, G. E.: J. Exp. Med., 38, 199-206, 1923.
- 2) Goebel, W. F. & Avery, O. T.: J. Exp. Med., 49, 267-286, 1926.
- 3) Dubos, R. J.: J. Exp. Med., 65, 873-883, 1937.
- 4) Dubos, R. J.: J. Exp. Med., 66, 101-112, 1937.
- 5) Dubos, R. J.: The Bacterial cell. p. 92-p. 99, 1949.
- 6) Dubos, R. J.: J. Exp. Med., 67, 389-398, 1938.
- 7) Kunitz, M.: J. Gen. Physiol., 24, 15, 1940.
- 8) Bartholomew, J. M. & Umbreit, W. W.: J. Bact., 47, 415, 1944.
- 9) Dubos, R. J.: Science, 85, 548-550, 1937.
- 10) Dubos, R. J. & MacLeod, C. M.: J. Exp. Med., 67, 791-797, 1938.
- 11) Dubos, R. J. & Thompson, R. H. S.: J. Biol. Chem., 124, 501-510, 1938.