加熱による細菌の損傷

澤井 淳^{*1}・五十嵐英夫^{*2}・清水 賢^{*1}

(^{*1}東京農工大学工学部, ^{*2}東京都立衛生研究所微生物部)

Heat-Induced Injury in Bacteria

Jun SAWAI^{*1}, Hideo IGARASHI^{*2} and Masaru SHIMIZU^{*1}

(^{*1}Faculty of Technology, Tokyo University of Agriculture and Technology:
2-24-16 Nakamachi, Koganei, Tokyo 184, Japan)

(^{*2}Department of Microbiology, Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health:
3-24-1 Hyakunincho, Shinjuku-ku, Tokyo 169, Japan)

はじめに

微生物を殺菌・除菌する技術のうちで最も重要な位置を占めているのが、加熱殺菌である。食品等の殺菌工程における殺菌条件は、存在する微生物の耐熱性によって決定される。より信頼性の高い殺菌条件の設定のため、耐熱性の変動要因の研究がなされてきた。微生物の耐熱性は種々の諸条件（加熱前歴、水分など）によって変動し、このような研究の方向は、さらに微生物の加熱による損傷および死滅機構の把握といったことにもつながる。これまで数多くの研究者によって、加熱ストレスの細菌に及ぼす影響が報告されており、もちろん現在でも多方面から研究が行われている。しかし、細菌は熱によってどのような障害および損傷を受けるのか、またそれをどのように修復し回復するのか、加熱致死の一次的要因は何か、といったことには今だ明確な解答が得られていない。本稿では、細菌の熱損傷に関するこれまでの知見をまとめ、概説するとともに、著者らの研究の一部を紹介する。

損傷細菌

それでは、損傷細菌の定義とはどのようなものであろうか。微生物を増殖可能な上限温度以上の温度にさらすと、増殖が停止し死滅が起こる。加熱処理された細菌は、ある種の薬剤に対する感受性が高まったり、栄養要求性が厳しくなったりすることは、古くから知られていた。特に増殖可能な上限温度からそれほど高くない温度では、多かれ少なかれ細菌は損傷を受けており、生きていく環境が不適当な条件では生育しないか、あるいは死滅するような不安定な状態に陥る²⁷⁾。したがって、損傷細菌の一つの定義としては、「非選択培地には発育するが、

選択培地では発育しない細菌」ということである¹³⁾。

また、損傷を受けた細菌は、損傷が回復したのちに増殖を開始することが報告されている。したがって、この増殖の遅れ時間を濁度法等で測定することによっても、損傷細菌を定義することが可能である⁴⁸⁾。

これまで、細菌が熱損傷を受ける部位として、多くの報告があり大別すると、①タンパク質（酵素）、②細胞壁および細胞膜、③DNA、④RNA およびリボソームの4種に分類できる⁴⁶⁾。以下、それぞれの部位において、加熱によりどのような損傷が引き起こされるのかについて述べる。

酵素の変性、失活

酵素は、様々な生体反応の担い手であり、酵素を含めた蛋白質の種類の総数は、細菌において約3,000種と言われている。細胞内の種々の酵素活性の熱安定性を調べる研究は古くから行われてきた。ROSENBERG らは、以下のような報告を行っている。細菌の熱死滅が細胞内の蛋白質の熱失活と同様に一次反応速度式に従い、さらに反応速度の絶対温度依存性を示すアレニウスプロットから求められる活性化エネルギーの値が高いことの理由から、細胞内の特定の酵素蛋白質の変性・失活が細胞の生存性を決定づけているとしている³³⁾。

はたして、細菌中のどの酵素の失活が死滅を支配しているのだろうか。RON らは、最小栄養培地で増殖した大腸菌において、温度上昇に伴う増殖速度の低下は、メチオニン合成系の最初の酵素であるホモセリントランスサクシニラーゼの失活に起因すると報告した。この酵素は、他の酵素と比較して熱感受性が高かった。しかし、44 および 47℃ で加熱後の細菌を培養するための培地にメチオニンを添加しても、その影響は認められなかった。このことから、死滅は別の機構によるものと推察されている^{31, 32)}。

酸化ストレスに対する防御酵素であるカタラーゼや

*1 ㊧184 東京都小金井市中町 3-24-16

*2 ㊧169 東京都新宿区百人町 3-24-1

スーパーオキシドジスムターゼなどの種々の酵素の熱感受性を調べてみると、酵素によって多少の相違は確かに認められたが、菌株や菌種によってその結果は異なり、細菌の熱感受性とこれらの酵素活性との相関は認められていない^{3,5)}。

次の細胞膜の項においても述べるが、酵素の存在場所、存在状態といった側面から、細胞膜リン脂質の化学的性状が異なれば、膜に結合している酵素の熱安定性も変化するのではないかという考え方を基にして研究が行なわれた。膜脂質はそれぞれある温度で相転移を起こすが、膜に結合している ATP 分解酵素 (ATPase) のアレニウスプロットにおける変曲点は、相転移温度の近くにあることが明らかにされた。膜結合蛋白質の熱安定性は、膜脂質の性状によって大きく左右される場合のあることが報告された。しかしながら、膜結合 NADH オキシターゼやフォスファターゼについては、調べた温度範囲内では、活性と膜脂質の性状との相関は認められなかった⁵⁵⁾。少なくとも現状では、どの酵素が加熱による致死の標的となっているかについてはわかっていない。

細胞膜および細胞壁の損傷

細菌の細胞を外側から考えた場合、加熱によって細胞表層に何らかの変化が引き起こされるのだろうか。加熱された細菌から K^+ 、 Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 等の無機イオン、アミノ酸、260 nm 吸収物質などが放出、遊離してくることが知られており^{34,50)}、細菌の細胞膜の損傷が原因と考えられると報告されている。

加熱による形態変化に関する研究も行なわれている。グラム陰性菌の細胞壁は、細胞質膜 (内膜)、ペプチドグリカン層、外膜の 3 層からなり、内膜とペプチドグリカンの間はペリプラズムと呼ばれる。グラム陽性菌は外膜を持たないが、厚いペプチドグリカン層を持っている。de PETRIS は、75~100°C で加熱した *E. coli* の外膜に水泡様構造 (bleb) が形成されることを示した⁶⁾。KATSUI らは、bleb は分裂中の細胞の隔壁や極部分に多く形成され、加熱を続けると膜胞 (vesicle) となって遊離することを報告した。さらにこの膜胞は、疎水性物質に対する透過阻止作用を示すリポ多糖や、親水性低分子物質の透

過孔であることをポーリンなどの外膜成分から形成されていることを示した²⁰⁾。また、加熱中、ペリプラズム酵素は遊出するが、細胞質酵素は漏洩しないことを明らかにした⁴⁵⁾。

細菌細胞はその膜機能を正常に働かすために、環境温度に応じて膜の流動性を一定に保つ調節機構を有している。脂質は温度に依存してゲル-液晶相転移を起こすが、細胞膜は様々な種類の脂質を含むので、ある温度幅をもって協同的に転移を起こし、またゲル状態と液晶状態の混在した相分離も起こすことがある^{42,50)}。*E. coli* の各種脂肪酸要求株を用いた実験などの結果、細胞膜脂質が液晶状態を保持している限り、膜と結合している酵素は活性を維持し、物質の膜透過機能および呼吸機能を発揮することが明らかにされた⁵⁵⁾。GRAU は、50°C で加熱した *E. coli* の死滅と膜機能について調べているが、生育不能となった細菌においても、膜機能は健全に保たれていることを報告した⁹⁾。細胞膜に注目した研究は多いが、結論的には細菌の細胞膜が加熱作用点の一次作用点であるという直接的な証拠はないものと考えられている¹⁾。

細菌の細胞膜の損傷は、適当な培地で培養することにより修復される。少なくとも回復直後の再増殖時の細菌は、無傷の細菌とは全く同じ表層構造ではないようである⁴⁹⁾。

DNA の損傷と修復

1950 年代にはいり、熱が突然変異誘発作用を持ち、加熱により DNA が不安定な状態になることが、*E. coli* や *B. subtilis* の突然変異株を用いた実験において見出された。この突然変異の頻度の上昇は、加熱により DNA の脱プリン化 (アデニン、グアニン) と関連していると考えられている^{11,57)}。また、BRIDGES らは、*E. coli* を 52°C で加熱 (mild heating) すると、細胞内の DNA が放射線照射の場合と同様に、一本鎖切断が引き起こされ低分子化することを初めて報告した²⁾。また Woodcock らは、*E. coli* において 52°C、15 分間の加熱により DNA の二本鎖切断も起こることを報告している⁵⁴⁾。

加熱による DNA 鎖切断の機作については、現在二つ

図1 エンドデオキシリボヌクレアーゼによる加熱された細菌の DNA 鎖切断。

の機序が考えられている。一つは DNA 分解酵素の作用によるものである (図 1)。in vitro において、native な DNA は、100°C、10 分間の加熱でも一本鎖切断は起こらない⁵¹⁾。このことから加熱において、直接的または物理的に一本鎖切断が起こるとは考えにくく、細胞内の条件が加熱による DNA の切断を左右していると考えられる。前述したように、加熱により DNA に脱プリン部位が生じることが知られており、このような DNA の modification 部位に作用する酵素であるエンドデオキシリボヌクレアーゼが単離されている。LJUNGQUIST は、脱プリン部位と脱ピリジン部位において、特異的に DNA 鎖を切断するエンドデオキシリボヌクレアーゼ (endonuclease IV) を *E. coli* より単離した²¹⁾。この酵素は EDTA の存在下で十分に活性を保持し、さらに熱にはかなり安定であり、65°C の加熱でも失活せず、活性を保持している。このような高温においても活性を保持するエンドデオキシリボヌクレアーゼは、他にも単離されている^{4, 22, 37)}。したがって、脱プリン・脱ピリジンエンドヌクレアーゼ欠損株 (xthA) では DNA 鎖の切断が少ない⁵³⁾。

もう一つは DNA 鎖切断の機序としては、酸化防止機構の障害の結果引き起こされるものである。加熱された細胞の培地にカタラーゼやピルピン酸などの活性酸素捕獲剤を添加すると、著しく生菌数が増加することが報告されている^{25, 30)}。また、*E. coli* の DNA 修復機能欠損株を加熱した際の DNA 鎖切断は、培地にカタラーゼを添加することにより激減することが明らかになっている²⁴⁾。

活性酸素による核酸の損傷は、現在多角的に検討されており、活性酸素による細菌の核酸の損傷および DNA 鎖切断が報告されている²⁸⁾。また、GOMEZ は、加熱によって引き起こされる DNA 鎖の切断は、好気条件よりも嫌気条件の方が少ないことを明らかにした⁸⁾。このようなことから、酸化ストレスもまた DNA 切断の機序と考えられている。

DNA の損傷は加熱後の細菌を適当な条件下で培養することによって修復される。PELLON と GOMEZ は、加熱による損傷の修復には、アミノ酸を添加してもその影響は認められないことを報告しており、熱損傷からの回復には蛋白質合成は直接作用していないことを示唆してい

る²⁹⁾。

RNA とリボソームの損傷

リボソームは細胞内における蛋白質合成の場であり、40~60% の RNA と 60~40% の蛋白質から成る RNA・蛋白質複合体である。沈降係数は 70 S であり、30 S と 50 S のサブユニットから成り立っている。リボソーム粒子の間の会合は、存在する Mg^{2+} イオン濃度に依存している。

SOGIN ら⁴³⁾は、*S. aureus* を 55°C で 15 分間加熱すると、7.5% NaCl を含んだ寒天培地で増殖が不可能になるが、一定時間後に回復する。この回復プロセスには蛋白質合成は含まれず、核酸合成が活発に起こることを示している。さらに、このような熱処理による核酸の損傷部位は RNA と rRNA であった。加熱により沈降係数 70 S であるリボソームが 30 S と 50 S のサブユニットに分離し、rRNA の場合、加熱により 260 nm の吸収物質が消滅することを明らかにした。TOMLINS ら⁴⁴⁾は、*S. typhimurium* を用いて、さらに詳細な下記のような結果を報告している。加熱により分解した 50 S リボソームサブユニットは、さらに 47 S に沈降係数を持つ粒子に分解した。30 S のサブユニットは、完全に消滅し、小さい沈降係数を持つ粒子に分解した (図 2)。また rRNA については、16 S RNA が 30 分間の加熱で消滅し、23 S RNA は少し減少した。GRAY ら¹⁰⁾は、リボソームの分解は細胞内 Mg^{2+} が漏洩して、その濃度が低下することによりリボソーム粒子が不安定になること、rRNA の分解は DNA 同様リボヌクレアーゼの活性化がその要因であると報告している。

加熱処理した細菌を適当な条件で培養することにより、リボソームおよび rRNA は修復される。その修復段階においてはリボソームサブユニットの再生が律速のようであり、蛋白質合成は含まれないことは注目される⁷⁾。

しかしながら、rRNA の分解は細菌をほかのストレス、あるいは飢餓条件にさらしたときにも起こることが知られている¹⁹⁾。したがってリボソームおよび rRNA の分解は、細菌にとっては致死的なものではなく、損傷というよりもむしろヌクレオチドの蓄積や、エネルギー源として利用されるなどの都合性があるのではないかと考えられている²⁶⁾。

図 2 リボソーム粒子の加熱による分解。

加熱による損傷機序について

上述したように、これまで加熱による損傷について多くの研究がなされている。また近年、熱ショック応答の研究が盛んに行われている⁵⁶⁾。細菌に熱ショック（温度のシフトアップ）を与えると、熱ショック蛋白質（HSP）と呼ばれる一群の蛋白質が一過的に合成される。この熱ショック応答は細菌から高等動物細胞に至るまで普遍的に存在する現象である。HSPは高温ストレスにおける細胞防御のグローバルコントロールとして、耐熱性の上昇、損傷の修復あるいは蛋白質の折り畳みや会合を助けるシャペロン分子など様々な役割を果たすことが報告されている⁵⁰⁾。それだけでなく、熱ショック応答の研究から解明された遺伝子発現の機構に関する研究成果は決して少なくない。しかしながら、各部位における個々の損傷および熱ショック応答は把握されつつあるものの、加熱による損傷・死滅の全容は、今だ明らかになっていない。さらに、細菌の損傷について検討する場合、簡単に損傷部位を検出するような評価方法は確立していない。

著者らは、主に遠赤外線による殺菌について研究を行っている¹⁴⁻¹⁷⁾。研究を進めていく上で、遠赤外線照射殺菌の殺菌機序を把握する必要性が生じてきた。遠赤外線は加熱効果を有する電磁波であり、加熱殺菌とは密接な関連がある。そこで、加熱を含めストレスによる細菌の損傷部位を簡単に評価する方法を検討した。

これまで、加熱することにより、細菌の抗生剤および各種阻害剤に対する感受性がより高まることが知られている^{23, 47)}。そこで著者らは、「加熱などのストレスによって生じた損傷細菌は、その損傷部位の近傍に作用機序を有する抗生剤に対して非損傷細菌よりも感受性が高まる」という仮説を立てた。つまり、各種抗生剤を含んだ寒天培地（選別培地）を用いて、ストレスによって生じた損傷細菌の感受性の変化を比較することにより、損傷部位の簡便な検索を試みた。以下の抗生剤を損傷部位の選別剤として用いた。

- ① クロラムフェニコール (CP): 蛋白質合成阻害
- ② リファンピシン (RFP): RNA 合成阻害
- ③ ナリジスル酸 (NA): DNA 合成阻害
- ④ ペニシリン G (PCG): 細胞壁合成阻害

寒天培地中の選別剤の濃度は、ストレスを受けていない供試細菌 (*E. coli*) のコロニー形成数に全く影響を及ぼさない範囲とした。寒天培地中の選別剤の濃度は図3より決定した。図3の縦軸は、非選別培地に発育したコロニー数と選別培地に発育したコロニー数の比 (N_i/N_{i0}) であり、横軸は寒天培地中の PCG 濃度である。PCG 濃度が $14.8 \mu\text{g/ml}$ よりも高くなると N_i/N_{i0} は急激に減少した。そこで、寒天培地中の PCG の最高濃度を $14.8 \mu\text{g/ml}$ とし、損傷部位検索に関する検討を行った。ストレスを受けた細菌を、この最大濃度の選別剤を含む選別培地で培養することにより、極めて軽度の損傷をも検出

図3 コロニー形成数に及ぼす寒天培地中の選別剤（ペニシリン G）濃度の影響。

図4 実験操作手順。

が可能であると考えた。他の抗生剤についても同様な方法で使用濃度を決定した。

以上のように決定した抗生剤を含む選別培地を用いた本評価法の妥当性については、紫外線照射殺菌により検討した。紫外線照射の殺菌機構はよく把握されており、その作用部位は核酸 (DNA, RNA) である。そこで、紫外線照射した *E. coli* を本評価方法により選別培地で培養し、感受性の変化を調べたところ、NA および CP に対する感受性が高まった。これは、DNA およびリボソーム中の RNA に損傷が引き起こされていると考えられ、これまでの報告されている損傷部位と一致した。また、その他のストレスとして凍結融解、酸処理^{35, 36)}、アルカリ処理、また抗菌性セラミックス³⁸⁻⁴⁰⁾などについても本評価方法により同様な検討を行った。そして、ストレスにより選別剤に対する感受性の変化は異なっていた。以上より、本法によりストレスによる細菌の損傷部位の簡便な検索ができるものと考えた。

そこで、*E. coli* の熱損傷について検討した。図4には、実験操作の手順を示した。加熱条件は図5(a)のとおりであり、その条件下で *E. coli* は図5(b)のような死滅

図5 細菌サスペンションの温度変化(a)と加熱による殺菌効果(b).

曲線を示した。約 57°C 付近から、*E. coli* の死滅が始まり、RFP, CP, PCG に対する感受性が高まった。特に RFP に対する感受性の変化が最も大きくなった。図 6 には、加熱開始 8 分後の *E. coli* の選別剤に対する感受性の変化を示した。横軸 C/C_{MAX} は、選別剤最高濃度に対する供した寒天培地中の選別剤濃度の比である。加熱温度の上昇に伴い、生存率は約 1/10 に減少 ($C/C_{MAX}=0$) した。RFP に対する感受性の上昇につづいて、次に CP に対する感受性が著しく上昇し、*E. coli* は死滅した。一方、PCG および NA に対する感受性の変化は全く認められなかった。この結果は、加熱により細菌の RNA ポリメラーゼの RNA 合成およびリボソームにおける蛋白質合成に何らかの障害が起こっていることを示唆して

図6 加熱された *E. coli* の選別剤に対する感受性の変化 (加熱 8 分後).

いる⁴¹⁾。RNA ポリメラーゼは、熱ショック蛋白質の合成に極めて重要な役割を果たしている。また、熱ショックによりリボヌクレアーゼが生成されること¹²⁾、さらにリボソーム自身が熱変化を感知するセンサーとして働いている可能性のあることが報告されている⁵²⁾。以上のようなことを総合すると、図 6 に示されるように加熱された *E. coli* の 4 種類の選別剤に対する感受性の変化は興味深いものがあると考えている。

また、本方法による細菌の損傷の評価は、スパイラルプレーティング法、自動コロニーカウンターなどと合わせ、より多種類の選別剤を使用することにより、さらにきめ細かく多くのストレスに対応でき、細菌の損傷部位の検索が可能であると言える。

おわりに

γ 線や紫外線の殺菌機構、特に DNA の損傷・修復に関しては、今まで多くの研究があり、著しい放射線科学の発展をもたらした。しかしながら、実際的な立場からはより重要であるはずの熱処理すなわち加熱が、細菌に対してどのような影響を与えるのかについては、解明に程遠いというのが現状である。紙面の制限もあり、本稿ではほとんど触れることができず割愛したが、熱ストレス応答および熱ショック蛋白質の研究は、癌の温度療法という観点からも注目されており¹⁸⁾、加熱による細菌の損傷および死滅機構の研究は、生物学における最も基本的であり、なおかつ応用的な側面を合わせ持った研究

テーマの一つであるといえよう。今後のこの研究分野の発展が期待される。

文 献

- 1) Allwood, M. C. and Russell, A. D.: Mechanisms of thermal injury in nonsporulating bacteria. *Adv. Appl. Microbiol.*, **12**, 89-119 (1970).
- 2) Bridges, B. A., Ashwood-Smith, M. J. and Munson, R. J.: Correlation of bacterial sensitivities to ionizing radiation and mild heating. *J. Gen. Microbiol.*, **58**, 115-124 (1969).
- 3) Buckner, E. R. and Martin, S. E.: Superoxide dismutase activity in thermally stressed *Staphylococcus aureus*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **41**, 449-451 (1981).
- 4) Bueke, Jr., W. F. and Spizzen, J.: Isolation, characterization, and activation of the magnesium-dependent endodeoxyribonuclease from *Bacillus subtilis*. *Biochemistry*, **16**, 403-410 (1977).
- 5) Dallmeyer, A. W. and Martin, S. E.: Catalase and superoxide dismutase activities after heat injury of *Listeria monocytogenes*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **54**, 581-582 (1988).
- 6) de Petris, S.: Ultrastructure of the cell wall of *Escherichia coli* and chemical nature of its constituent layers. *J. Ultrastruct. Res.*, **19**, 45-83 (1967).
- 7) Flowers, R. S. and Martin, S. E.: Ribosome assembly during recovery of heatinduced *Staphylococcus aureus* cells. *J. Bacteriol.*, **141**, 645-651 (1980).
- 8) Gomez, R. F. and Shinsky, A. J.: Effect of aeration on mineral medium recovery of heated *Salmonella typhimurium*. *J. Bacteriol.*, **122**, 106-109 (1975).
- 9) Grau, F. H.: Significance of the inactivation of transport in thermal death of *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **36**, 230-236 (1978).
- 10) Gray, R. J. H., Witter, L. D. and Ordal, Z. J.: Characterization of mild thermal stress in *Pseudomonas fluorescens* and its repair. *Appl. Microbiol.*, **26**, 78-85 (1973).
- 11) Greer, S. and Zamenhof, S.: Studies on depurination of DNA by heat. *J. Mol. Biol.*, **4**, 123-141 (1962).
- 12) Harder, B. S.: Heat shock induction of ribonucleases in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol. Lett.*, **17**, 23-26 (1983).
- 13) 春田三佐夫: 食品検査ニュース, 第25号, (1988).
- 14) 橋本 篤, 清水 賢, 五十嵐英夫: 生理的リン酸緩衝溶液中に浮遊する細菌の殺菌に及ぼす遠赤外線の影響. 化学工学論文集, **17**, 627-633 (1991).
- 15) Hashimoto, A., Sawai J., Igarashi, H. and Shimizu, M.: Effect of far-infrared irradiation on pasteurization of bacteria suspended in liquid medium below lethal temperature. *J. Chem. Eng. Japan*, **25**, 275-281 (1992).
- 16) Hashimoto, A., Igarashi, H. and Shimizu, M.: Far-infrared irradiation effect on pasteurization of bacteria on or within wet-solid medium. *J. Chem. Eng. Japan*, **25**, 666-671 (1992).
- 17) Hashimoto, A., Sawai, J., Igarashi, H. and Shimizu, M.: Irradiation power effect on pasteurization below lethal temperature. *J. Chem. Eng. Japan*, **26**, 331-333 (1993).
- 18) 畑山 巧: 温熱療法の細胞生物学的基礎と温熱耐性の分子機構. 最新医学, **49**, 76-84 (1994).
- 19) Kaplan, R. and Apirion, D.: Decay of ribosomal ribonucleic acid in *Escherichia coli* cells starved for various nutrients. *J. Biol. Chem.*, **250**, 3174-3178 (1975).
- 20) Katsui, M., Tsuchido, T., Hirayama, R., Fujikawa, S., Takano, M. and Shibasaki, I.: Heat-induced blebbing and vesiculation of the outer membrane of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, **151**, 1523-1531 (1982).
- 21) Ljugquist, S.: A new endonuclease from *Escherichia coli* acting at apurinic sites in DNA. *J. Biol. Chem.*, **252**, 2808-2814 (1977).
- 22) MacCarthy, C. and Nester, E. W.: Heat-activated endonuclease in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.*, **97**, 1426-1430 (1969).
- 23) Mackey, B. M.: Changes in antibiotic sensitivity and cell surface hydrophobicity in *Escherichia coli* injured by heating, freezing, drying or gamma radiation. *FEMS. Microbiol. Lett.*, **20**, 395-399 (1983).
- 24) Mackey, B. M. and Seymour, D. A.: The effect of catalase on recovery of heat-injured DNA-repair mutants of *Escherichia coli*. *J. Gen. Microbiol.*, **133**, 1601-1610 (1987).
- 25) Martin, S. E., Flowers, R. S. and Ordal, Z. J.: Catalase: Its effect on microbiol enumeration, *Appl. Environ. Microbiol.*, **32**, 731-734 (1976).
- 26) 丸山博巳: 細菌リボソームの *in vivo* 分解と異常亜粒子, 蛋白質 核酸 酵素, **17**, 13-20, 92-104 (1972).
- 27) 森地敏樹: 各種理学的処理で生ずる非致死の損傷菌の特徴とその検出法, 防菌防黴, **17**, 541-550 (1989).
- 28) 長野哲雄, 広部雅昭, 活性酸素による核酸の損傷, 蛋白質 核酸 酵素, **31**, 3094-3101 (1988).
- 29) Pellon, J. R. and Gomez, F.: Repair of thermal damage to *Escherichia coli* nucleoid. *J. Bacteriol.*, **145**, 1456-1458 (1981).
- 30) Rayman, M. K., Aris, B. and Derea, B. E.: The effect of compounds which degrade hydrogen peroxide on the enumeration of heat-stressed cells of *Salmonella semftenberg*. *Can. J. Microbiol.*, **24**, 883-885 (1978).
- 31) Ron, E. Z. and Davis, B. D.: Growth rate of *Escherichia coli* at elevated temperature: Limitation by methionine. *J. Bacteriol.*, **107**, 391-396 (1971).
- 32) Ron, E. Z. and Shani, M.: Growth rate of *Escherichia coli* at elevated temperature: Reversible inhibition of homoserine trans-succinylase. *J. Bacteriol.*, **107**, 397-400 (1971).
- 33) Rosenberg, B., Kemeny, G., Switzer, R. C. and Hamilton, T. C.: Quantitative evidence for protein denaturation as the cause of thermal death. *Nature*, **232**, 471-473 (1971).
- 34) Russell, A. D. and Harries, D.: Some aspects of thermal injury in *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **15**, 407-410 (1969).
- 35) 相楽好治, 澤井 淳, 五十嵐英夫, 橋本 篤, 清水 賢, ストレスにより生じた損傷細菌の評価方法, 化学工学会 第27回秋季大会講演要旨集, 0111 (1994).
- 36) 相楽好治, 澤井 淳, 橋本 篤, 清水 賢, 五十嵐英夫:

- ストレスにより生じる損傷細菌についての検討, 日本細菌学雑誌, **49**, 203 (1994)
- 37) Sako, Y., Uchida, A. and Kadota, H.: Isolation and characterization of a magnesium-dependent apurinic sites specific endodeoxyribonuclease from *Bacillus subtilis*. Agric. Biol. Chem., **44**, 567-574 (1980).
 - 38) 澤井 淳, 澤木 崇, 五十嵐英夫, 橋本 篤, 清水 賢: セラミックス (MgO) 粉末スラリーにより引き起こされる大腸菌の損傷, 化学工学会第 27 回秋季大会講演要旨集, M122 (1994)
 - 39) Sawai, J., Igarashi, H., Hashimoto, A., Kokugan, T. and Shimizu, M.: Evaluation of growth inhibitory effect of ceramics powder slurry on bacteria. J. Chem. Eng. Japan, **28**, 288-293 (1995).
 - 40) Sawai, J., Saito, I., Kanou, F., Igarashi, H., Hashimoto, A., Kokugan, T. and Shimizu, M.: Mutagenicity test of ceramics powders which have growth inhibitory effect on bacteria. J. Chem. Eng. Japan, **28**, 352-354 (1995).
 - 41) Sawai, J., Sagara, K., Igarashi, H., Hashimoto, A., Kokugan, T. and Shimizu, M.: Injury of *Escherichia coli* in physiological phosphate-buffered saline induced by far-infrared irradiation. J. Chem. Eng. Japan, **28**, 294-299 (1995).
 - 42) Sinenskey, M.: Homeoviscous adaption a homeostatic process that regulates the viscosity of the membrane lipids in *Escherichia coli*. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, **71**, 522-525 (1974).
 - 43) Sogin, S. J. and Ordal, Z. J.: Regeneration of ribosomes and ribosomal ribonucleic acid during repair of thermal injury to *Staphylococcus aureus*. J. Bacteriol., **94**, 1082-1087 (1967).
 - 44) Tomlins, R. I. and Ordal, Z. J.: Precursor ribosomal ribonucleic acid and ribosome accumulation *in vivo* during the recovery of *salmonella typhimurium* from thermal injury. J. Bacteriol., **107**, 134-142 (1971).
 - 45) Tsuchido, T., Katsui, N., Tarauchi, A., Takano, M. and Shibasaki, I.: Destruction of the outer membrane permeability barrier of *Escherichia coli* by heat treatment, Appl. Environ. Microbiol., **50**, 298-303 (1985).
 - 46) 土戸哲明. 細菌細胞の熱障害, 化学と生物, **26**, 211-213 (1988).
 - 47) Tsuchido, T. and Takano, M.: Sensitization by heat treatment of *Escherichia coli* K-12 cells to hydrophobic antibacterial components., Antimicrob. Agents Chemother., **32**, 1680-1683 (1988).
 - 48) Tsuchido, T., Koike, T. and Takano, M.: A modified assesment of growth inhibition from growth-delay time in a cell population exposed to an environmental stress., J. Ferment. Technol., **67**, 132-134 (1989).
 - 49) Tsuchido, T., Aoki, I. and Takano, M.: Interaction of fluorescent dye 1-N-Phenyl-naphthylamine with *Escherichia coli* cells during heat stress and recovery from heat stress. J. Gen. Microbiol., **135**, 1941-1947 (1989).
 - 50) 土戸哲明; 微生物細胞における高温ストレス. 防菌防黴, **18**, 75-87 (1990).
 - 51) 内田有恒, 門田 元: 加熱による細菌の DNA の損傷とその修復. 微生物の生態 8. 微生物生態研究会編, p. 15-32, 学会出版センター, 東京 (1980).
 - 52) VanBogelen, R. A. and Neidhardt, F. C.: Ribosomes as sensors of heat and cold shock in *Escherichia coli*. Proc. Nat. Acad. Sci. USA., **87**, 5589-5593 (1990).
 - 53) Williams-Hill, D. M. and Gredz, N.: Role of AP endonuclease in DNA breakage and cell inactivation of *Escherichia coli* Subjected to mild heating. Mut. Res., **107**, 13-21 (1983).
 - 54) Woodcock, E. and Grigg, G. C.: Repair of thermally induced DNA breakage in *Escherichia coli*. Nature New Biol., **237**, 76-79 (1972).
 - 55) 柳田友道: 微生物科学 2. p. 475-476, 学会出版センター, 東京 (1985.)
 - 56) Yura, T., Nagai, H. and Mori, H.: Regulation of the heat-shock response in bacteria. Annu. Rev. Microbiol., **47**, 321-350 (1993).
 - 57) Zamenhof, S. and Greer, S.: Heat as an agent producing high frequency of mutations and unstable genes in *Escherichia coli*. Nature, **182**, 611-613 (1958).