

# 高 圧 の 細 菌 に 及 ぼ す 影 響 に 就 いて

## 第一篇 細菌の生活に及ぼす高圧の影響

指導 村 上 栄 教授

指導 林 香 苗 教授

岡山大学医学部細菌学教室

市 橋 大

〔昭和28年12月24日受稿〕

### 第一章 緒 言

生物は凡て一定範囲の気圧の下にその生活を維持している。高等動物では僅かな気圧の変化によつて組織に重大な傷害を蒙り、一定範囲を超えると直ちに死に瀕する。併し下等動植物は気圧の変化には相当の抵抗を有するものであつて、B. Fischer によれば大西洋の海底五千米の泥土中に尚棲息する細菌が発見されている。之は略5000気圧の圧力に耐えている事を意味する。実験的に生活体の高圧に対する抵抗を研究した文献は古くは主として独逸、仏蘭西、最近は米国に於て見られる。微生物の領域では古くは Melsens (仏1870) Certes (仏1889), Roger (仏1894), B. Fischer (独1894), E. Büchner 及び H. Büchner (独1897) Schaeffer 及び Freudenreich (独1892), Chlopin, Tamman (独1903), Krause (独1902), Sabrazés 及び Bazin (仏1893) 等が細菌、酵母、菌類等の高圧に対する抵抗に就いて究めた業跡を報告している。之等の報告は加圧の方法及び実験結果に於て多様に亘り一致していない。

1918年米国の Larson, Hartzell 及び Diehl 等は特殊のニッケルクローム鋼を以て作つた tube の中に菌浮游液を入れ、之にポンプによる液圧を加へてする所謂 hydrostatic pressure を以て比較的一定した成績を出している。更に新しい研究としては米国の Bridgmann とその門下に依る生理学的研究があり、又 Johnson, Zobell, Fraser, Foster 等による

海棲微生物特に発光菌に関する一連の綿密なる研究業績が報告されている。翻つて本邦の微生物学界を展望するに此種の研究は殆ど未だ手を染められず、僅かに酵母に関する安田の報告があるに過ぎない。之は主として実験方法上特殊の装置を必要とし、その作製に精巧なる技術と莫大の費用を要する為、一般の研究室では整備し難い理由によると考へられる。岡山大学では生理学教室林香苗教授が夙に高圧に関する研究に力を注がれ、多年研鑽を重ねて心筋及び骨格筋、血球、其の他植物、酵母、蛙卵等を用ひて、生理学領域に於て多数の研究業績を発表して居られる。私は偶々林教授の御厚意により教授御考案になる特殊実験用高圧装置を使用させて戴く便宜を得たので恩師村上教授並びに林教授御指導の下に細菌生理研究の一端として高圧の細菌に及ぼす影響に関する研究を試みる事が出来た。初め細菌の酵素作用に関する研究を主目的としたが、実験の結果は予期に反して細菌が高圧に対し敏感に反応するのを認めたので、一般生活現象並びに形態及び表面構造に及ぼす変化に関しても再検討の必要を生じたので之等に就いて一連の実験的研究を行ひ若干の知見を得、茲に一括して発表し批判を乞ふ次第である。

尚本研究は一に終始一貫高圧装置の操作等に関し絶えず熱心な御協力と適切な御助言を戴いた生理学教室安田浩士学士に負ふ所大であり茲に厚く感謝申上げる次第である。

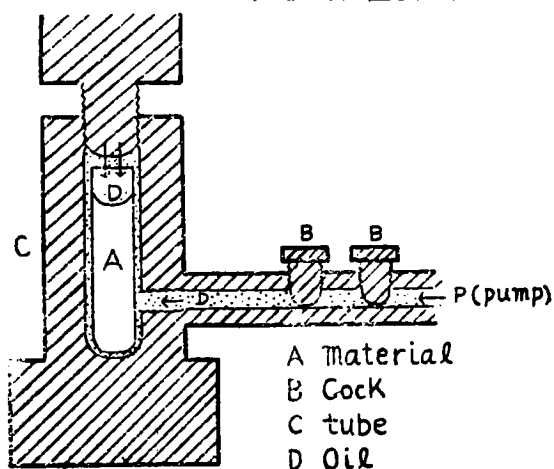
## 第二章 全般的實驗方法

1. 供試菌. 主としてチフス菌 57 S 型, 及び黄色葡萄状球菌 寺島株を用いた. 外にチフス 57 R, 58 S, パラチフス A, パラチフス B, 大腸菌, 赤痢菌, 肺炎桿菌, 肺炎双球菌, 黄色葡萄状球菌 F, D, A 株, 馬鈴薯菌等合計 10 種 14 株を用いた.

2. 培養. 特別の場合を除き普通寒天平板培養基に数代継代培養したものより移植して, 37°C 18 時間培養を行ふ.

3. 菌液の調製. 菌集落を白金耳を以て寒天を湿じない様に注意深くかき取り生理的食塩水に浮游させ, 10,000 r. p. m., 10 分間遠心沈澱により二回洗滌した後菌量を秤り, 再び 1c.c. 中 4mg 菌重量の割合に生理的食塩水其の他必要な medium に均等に浮游させる. 操作は無菌的に為す.

第 1 図 高压実験用装置模型図



4. 特殊高压実験用装置. 模型図(第 1 図)を参照されたい. 先づ特製の小試験管に入れた菌浮游液 (A) の上に無菌的モビール油を重層し, 油を充填せる筒 (C) の中に納め, 固く蓋を閉める. 次にコック (B) を締めてから手動式油圧 pump (P) により油を通して圧を加へる. 圧力計によつて望む圧迄高まつた所で止め, 一定時間加圧を続ける. 圧を除き去る場合にはコックを徐々にゆるめて排油し, 圧を常圧迄下降せしめて試験管を取り出す. 本装置を以て加へる圧は所謂 hydrostatic pressure である.

5. 除圧後の処置. 滅菌せる棉花を用ひ, 上層及び管壁の油を拭ひ去り, 駒込ビペットで必要量を菌液の中層より取り出し, 適宜稀釈して用ひる. 以後文中除圧後とは, 一定時間加圧後, 圧を除き本項の処置を為した事を指す. 又加圧菌とは特別の場合を除き斯る処置を了つた菌を云ふ.

6. 対照. 初めに作つた供試菌液より被検菌液と同時に他の試験管に分け, 同じ油を重層し同じ室温に於て, 加圧時間に相当する間放置した後油を除去して同濃度の対照菌液を得る.

7. 可検圧力. 本装置による可検圧力の限度は  $2000\text{kg}/\text{cm}^2$  である. 私の実験に於ては性能, 耐久力等を考慮して特別の場合を除き  $1600\text{kg}/\text{cm}^2$  以下, 時間は 30 分以内に留めた. 之は略 1600 気圧に相当する.

## 第三章 發育並に増殖に及ぼす影響

細菌の發育並に増殖に対し高压が如何なる影響を与えるかといふ問題に就いては在来の研究者の大部分は主として此の点に関して研究した結果を報告しているのであるが, 其等は尚精細を尽していない憾みがある. 従つて私は先づ平板培養基上の發育, 及び液体培養基, 嫌気性培養等に於ける發育増殖の状態を観察し更に集落計算法並に比濁法を併用して出来る限り精細に主題の全貌を明らかにせんと試みた.

1. 平板培養並に液体培養に於ける發育状況.

實驗方法 : 加圧及び対照菌液より 1 白金耳づゝを普通寒天平板培養基, 肉汁ブイヨン及び合成培地に移植し 37°C 24 時間乃至 72 時間培養後その發育状況を觀察した. 使用菌株はチフス菌及び黄色葡萄球菌. チフス菌の合成培地は Fildes, Gladstone & Knight の培地を用いた.

實驗成績 : 平板培養基上の發育はチフス菌では  $800\text{kg}/\text{cm}^2$  迄は加圧菌と対照菌の間に全く差異を認めないが  $1600\text{kg}/\text{cm}^2$  30 分間の加圧では個々の集落形成が遅れる. 即ち対照

では約8時間で肉眼的に集落形成を認めるのに比べ、加圧菌では約16時間以上を要した。集落の数も可成り少ない。然し集落の性状は対照と変わらず特に Rough 型変異を起す事実は認め難い。他方葡萄球菌では  $1600\text{kg/cm}^2$  30分の加圧によつても集落形成上何等の異常を見出さない。

液体培養基では肉汁ブイヨンの場合  $1600\text{kg/cm}^2$  30分の加圧でも24時間後にはチフス菌は充分発育混濁を来し対照と区別出来ないが、併し移植後時間を追つて観察すると加圧菌は可成り増殖が遅れるのを認めた。之は比濁法による実験の項で後に述べる。合成培地を用いた場合、之は更に著明となり、対照菌の発育混濁が24時間乃至36時間で認められるに対し加圧菌は48時間以上を要する。

## 2. 嫌気性培養

所謂通性嫌気性菌であるチフス菌に嫌気性培養を行ひ発生する集落の変化の有無を検討するために辻式の嫌気瓶を用ひて Schoetensack の方法によつて無酸素状態となし嫌気性培養を行つたが好気性の場合に比較して加圧菌の発育が更に遅れ、又は集落の性状に差異を生ずるといふ傾向は認める事が出来なかつた。

## 3. 集落数計算法

実験方法：加圧及び対照菌液を無菌的操作の下に生理的食塩水で10倍稀釈法により原液1cc. 中1mgのものを  $10^5 \sim 10^8$  倍迄稀釈しその各0.5cc. をペトリー皿に入れ、之に予め溶融し  $45^\circ\text{C}$  に保つた普通寒天を注加混和した後  $37^\circ\text{C}$  の孵卵器に入れ48時間後に形成された集落を数へる。同一菌液より各四枚の平板を作り平均を取つたが誤差範囲は大凡15%内外である。

実験成績：第一表に表示した様にチフス菌では  $1200\text{kg/cm}^2$  5分の加圧より著明に集落数が減少し始める。圧の高い程減少度は大で加へられた圧の高さと時間に略比例する事が考へられる。葡萄球菌では殆ど影響を見な

第1表 集落数計算

圧 ( $\text{kg/cm}^2$ )	時間 (分)	集 落 数
対 照		2 4 8 0
4 0 0	3 0'	2 5 6 4
対 照		2 6 4 0
8 0 0	3 0'	2 4 2 0
対 照		2 7 2 0
1 2 0 0	1'	1 7 0 4
1 6 0 0	1'	8 9 6
対 照		2 2 6 0
1 2 0 0	5'	7 6 0
1 6 0 0	5'	3 2 0
対 照		2 6 2 0
1 2 0 0	3 0'	1 6 8
1 6 0 0	3 0'	2 8

菌 株 チフス菌 S. 57S.

稀釈度 1mg/cc を原液としその  $10^6$  倍稀釈液 0.5cc

圧 ( $\text{kg/cm}^2$ )	時間 (分)	集 落 数
対 照		6 7 0
1 2 0 0	3 0'	7 0 6
対 照		7 3 2
1 6 0 0	3 0'	6 8 2

菌 株 黄色葡萄球菌 寺島株

稀釈度 1mg/cc を原液としその  $10^7$  倍稀釈液 0.5cc

第2表 加圧後の菌の増殖

圧 ( $\text{kg/cm}^2$ )	時間 (分)	加圧後 $37^\circ\text{C}$ 保温時間				
		0	2	4	6	24
対 照		2568	2760	$\infty$	$\infty$	$\infty$
1200	5'	920	864	2400	$\infty$	$\infty$
1600	5'	372	296	272	2640	$\infty$
対 照		2920	3448	$\infty$	$\infty$	$\infty$
1200	30'	152	144	176	1856	$\infty$
1600	30'	36	28	24	68	$\infty$

菌 株 チフス S. 57S.

稀釈度 1mg/cc を原液としその  $10^6$  倍 0.5cc

稀釈液 肉汁ブイヨン

$\infty$  コロニー数 5000 以上.

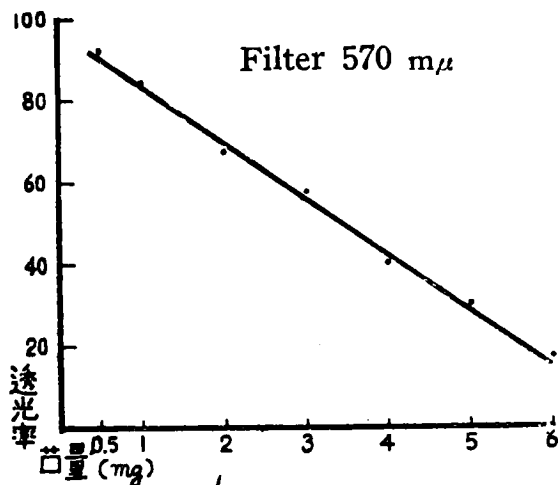
い。

次に除圧直後の菌をブイヨンに以て稀釈し  $37^\circ\text{C}$  の孵卵器に保ちつゝ、2時間毎に夫々0.5cc. を取り出して平板法による集落計算を行つた結果第2表に示す様な成績を得た。之に由ると液体培養基に移した場合加圧菌は一定時間迄は菌数の増加を示さないが、それ以後になると急激な増加を示している。例へば  $1600\text{kg/cm}^2$  5分間の加圧で4時間後迄はむしろ減少を示したのが6時間後には10倍近い増加を示している。之に就いては後に説明を加へる事としたい。

## 4. 比濁法による増殖曲線に就いて.

実験方法：加圧菌液及び対照菌液より夫々 0.2c.c. を取り比濁管に移して全量 10c.c. のブイヨンに 0.2mg の菌を含む様にして 37°C の孵卵器に入れ、以後 30 分毎に比濁計によつて濁濁度を測定した。第 2 図はチフス菌濁濁度基準曲線である。

第 2 図 チフス菌濁濁度基準曲線



尚 0.2mg の菌量は基礎実験により比濁計で測定し得る最小量である。比濁計は東京光電の単一式分光光度計 4 型を本学眼科教室筒井、長田両氏が比濁用に改良したものでその構造、性能、取扱法に関しては両氏の精細な報告がある。茲に本器の借用を快諾された眼科教室並に両氏に深甚なる謝意を表するものである。尚比濁管の透過度の誤差は予め計測して目盛から差引き訂正した。

## 実験成績：

## 1. 圧力の高低

所謂 resting cell の状態にあるチフス菌に対し加圧時間を一定にし、圧力の高低による増殖力の差を比較すると、800kg/cm<sup>2</sup> 以上の圧を加へた場合その増殖曲線は対照に比して著明な変化を生ずる。即ち lag phase の延長を認める。之は圧の高くなると共に著明となり 1600kg/cm<sup>2</sup> では 7～8 時間の延長を認める。(第 3 図参照.)

## 2. 加圧時間

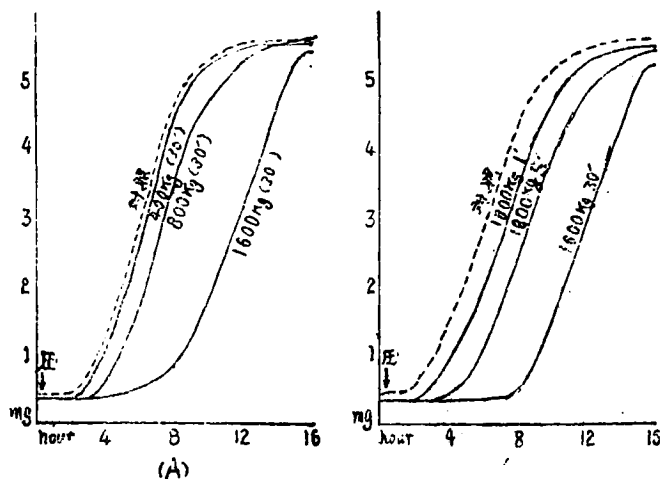
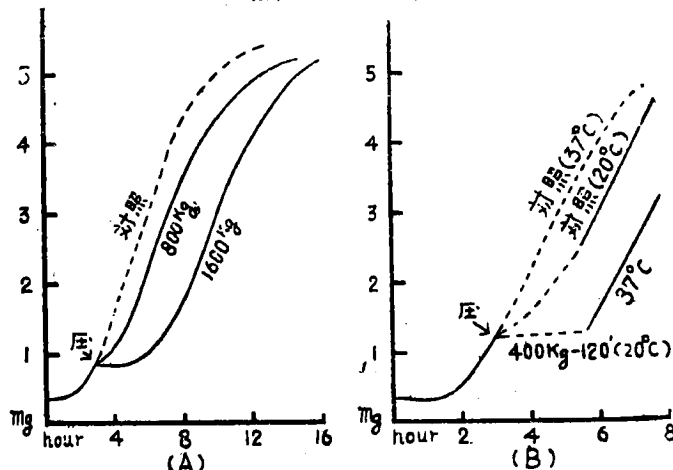
加圧時間の差による相違を観察すると第 3 図右に示す通り長時間に亘る程 lag phase の延長は著明となる。之は圧の高い場合は特に明瞭で、800kg/cm<sup>2</sup> では 15 分迄は影響を認めず、30 分で始めて出現するが 1600kg/cm<sup>2</sup> になると 1 分、5 分、30 分で夫々著明な差を生ずる (第 3 図右)

## 3. 幼若菌と成熟菌の比較.

ブイヨン培養 3 時間目のチフス幼若菌即ち log phase に入つた菌 (第 4 図左) と培養 18 時間の成熟菌とを比較すると、前者は後者より大なる影響を蒙り 800kg/cm<sup>2</sup> の圧で僅か 5 分の加圧により著明に増殖が遅延する。

## 4. 菌浮游液の種類.

圧を加へる際の菌浮游液の種類によつても第 5 図に示す如く、相当の差を認める事が出

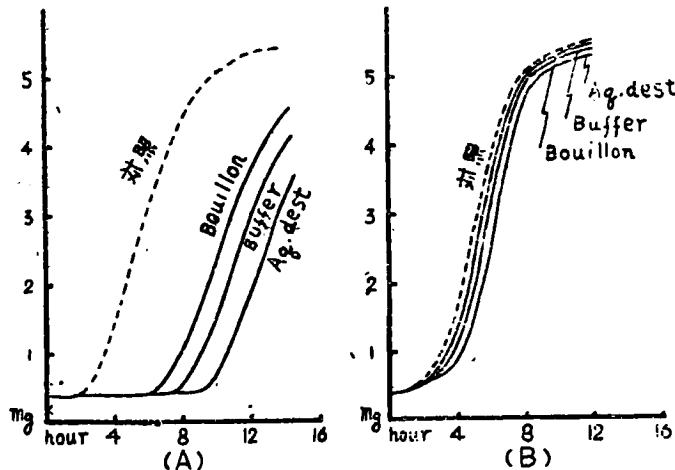
第 3 図 チフス菌増殖曲線に及ぼす高压の影響(1)  
A. 圧力の高低 B. 加圧時間第 4 図 チフス菌増殖曲線に及ぼす高压の影響(2)  
対数増殖期に及ぼす影響  
A. 加圧 5' B. 加圧 120'

来る。即ち Bouillon が影響最小で Buffer 食塩水之に次ぎ蒸溜水最も大である。之は加压の際の菌の medium の条件、例へば浸透圧、pH 等によつて相当の制約を受けると考へられるが此の点は第二篇に於て詳述する。

#### 5. チフス菌と葡萄球菌の比較.

葡萄球菌寺島株によつて比濁法による実験を行ひチフス菌との比較を試みたが、いずれの場合も葡萄球菌では  $1600\text{kg}/\text{cm}^2$  30分の圧によつても増殖曲線に於て lag phase の延長を認める事は出来ない。(第5図右参照.)

第5図 増殖曲線に及ぼす高圧の影響 (3)  
菌浮游液の種類 ( $1600\text{kg}-30'$ )  
A. チフス菌 B. 葡萄球菌



#### 5. 加压中の菌の分裂増殖.

加压中に菌の分裂増殖が行はれるか否かといふ問題に就いては長時間の加压により前後の菌数を比較する事により察知する事が出来るが、私の場合実験装置の性能上高い圧を長時間使用出来ない為、己むなく比較的低い圧で観察した。

実験方法：ブイヨン培養3時間で盛に分裂増殖しつつあるのを顕微鏡下に確かめたチフス菌液をそのまま二つに分け、温度その他加压以外の条件を等しくして対照菌と加压菌の増殖度を比濁により判定する。

実験成績： $400\text{kg}/\text{cm}^2$ の圧を2時間加へた後に濁度を測ると加压前より殆ど増加していない。圧を除くと急速に増殖し濁度は増加する。之に対して対照菌は著明な増加を

示している。第4図右はブイヨン培養3時間目の log phase の初めにブイヨン中に於て加压した結果を示すものである。然し更に長時間即ち16時間引続き加压する場合には僅かではあるが濁度は増加している。此の場合も圧を除くと急速に増加を示す。此の二つの実験結果は  $400\text{kg}/\text{cm}^2$ の圧の下ではチフス菌は分裂増殖を停止するが圧が除かれると直ちに増殖力を恢復し、亦加压が長時間に及ぶ時には除々に或は一部の菌が増殖能力を恢復(馴化)する事を示すものと解される。

#### 6. 小 括.

細菌の發育並に増殖に及ぼす高圧の影響を追求し次の如き成果を得た。

(1) 平板培養に於てチフス菌は  $1600\text{kg}/\text{cm}^2$ の加压により集落形成が遅れるが集落の性状には変化は認められない。

(2) 平板法による集落数計算では、チフス菌は高圧の程度と加压時間に略比例して集落数を減ずる。著明な減少の認められるのは  $1200\text{kg}/\text{cm}^2$  5分以上である。

(3) 比濁法によればチフス菌の増殖曲線に対して  $800\text{kg}/\text{cm}^2$  30分以上の加压は lag phase を延長させる。それは圧の高さ及び加压時間に比例する外加圧の際の菌浮游液の性質によつても制約を受ける。

(4) 対数増殖期(log phase)にある菌は静止期(lag phase)にある菌に比して明らかに加压による傷害が大である。

(5) 加压により影響を蒙つた菌でも一定時間後に増殖力を恢復する場合がある。

(6) 加压中の分裂増殖は  $400\text{kg}/\text{cm}^2$ の下では初め(2時間)は停止するが馴化の傾向が見られ16時間で多少の増殖が認められる。

(7) 葡萄状球菌は  $1600\text{kg}/\text{cm}^2$  30分の加压によつても菌の發育増殖には殆ど影響を蒙らない。

### 第四章 運動性に及ぼす影響

顕微鏡下に観察し得る細菌の運動には固有

運動と分子運動があり茲で問題とする運動性とは細菌の鞭毛によつて為される固有運動である。高压を加へた場合細菌の固有運動は如何に変化するか、若し停止するとすればそれは菌の死を意味するものか等の問題を検討した結果少々興味ある知見を加へ得た。

## 一 實驗方法

1. 供試菌、チフス57S型菌
2. 觀察方法、除圧直後の菌及び対照菌液より懸滴標本を作り光学的顕微鏡下に觀察する。觀察の際の温度は略 25°C に一定す。
3. 懸滴標本、菌液より1白金耳をとりそのまゝブイヨンに移し又は必要に応じて1%乃至10%のゼラチン加ブイヨンに移して定法により標本作製した。

## 二 實驗成績

### 1. 除圧直後の菌固有運動

400kg/cm<sup>2</sup>乃至1600kg/cm<sup>2</sup>の圧を加へた直後の菌固有運動の様相は第3表に示す通りである。表中+符号は活潑なる運動を有する菌数を、又〔 〕符号は不活潑な又は変則的運動、例へば緩慢捻転性、跛行性等を示す。400kg/cm<sup>2</sup>では全く変化を認めず、800kg/cm<sup>2</sup>30分で運動菌は少数となり、1200kg/cm<sup>2</sup>30分で全く運動は停止する。この現象は高压になる程短時間で著明に現はれる。即ち運動停

第3表 菌固有運動に及ぼす高压の影響(1)

圧・kg/cm <sup>2</sup>	時間	固 有 運 動	
対 照		+++	視野の大多数に活潑
400	30'	+++	対照と略同様
800	30'	+	少数 活潑
1200	1'	+++	対照と略同様
1200	5'	〔+〕	少数、緩慢、変則。
1200	30,	—	全視野に菌の運動を認めず、停止
1600	1'	〔±〕	一視野に2〜3ヶ、極めて緩慢。
1600	5'	—	停 止
1600	30'	—	停 止

止又は変則的且不活潑なる運動を示す菌の増加は圧力の強さと加圧時間に略比例する。

2. 除圧後一定時間経過後の菌固有運動、除圧直後に運動を停止している菌は果して全部死んだのであろうか、それとも一時的に運動麻痺に陥り、中には一定時間後に恢復するものもあるのではなからうかといふ想定の下に除圧後ブイヨンに菌を移し 37°C に保ちつゝ1時間毎に標本を作り検鏡した所第4表の如き成績を得た。即ち 800kg/cm<sup>2</sup> 30分の加

第4表 菌固有運動に及ぼす高压の影響(2)

圧 kg/cm <sup>2</sup>	時間	直後	除圧後 37°C 保温(時間)			
			1.	2.	3.	5.
400	30'	+++	+++ (x)	+++ (xxx)	+++ (xxx)	+++ (xxx)
800	30'	+	+++	+++ (xx)	+++ (xxx)	+++ (xxx)
1200	1'	+++	+++ (x)	+++ (xxx)	+++ (xxx)	+++ (xxx)
1200	5'	〔+〕	〔++〕	++	+++ (x)	+++ (xxx)
1200	30'	—	—	〔+〕	++	+++ (xx)
1600	1'	〔±〕	〔+〕	〔+〕	++	+++ (xx)
1600	5'	—	—	〔±〕	+	++ (x)
1600	30'	—	—	—	—	+

+ 活潑なる固有運動を有する菌数を示す。

〔 〕 運動の不活潑、緩慢、捻転、跛行状、休止等変則性運動を示す。

(x) 分裂型又は分裂前の長大となれる菌を示す。

圧で運動を示す菌が少数となつた例に於ては1時間後には対照と略同じ程度に運動活潑なる菌数を認めた。又 1600kg/cm<sup>2</sup> 5分及び30分の加圧で全視野に運動を有する菌を認め得ない例に於て、3時間乃至5時間後に運動を有する菌が出現し且次第に増加するのを認めた。之は運動の停止したものすべてが死菌であるとするのは誤りで、一時的の運動麻痺に陥っている菌をも含むといふ推論を成り立たせるものである。表中x符号は菌の形が長大

となり又は長軸の方向に分裂しつつある菌を示している。  
示すもので之は増殖の始まりつつある時期を

第 5 表 菌固有運動に及ぼす高圧の影響 (3)

圧 kg/cm <sup>2</sup>	時間	ゼ ラ チ ソ 濃 度							
		直 後				2 時 間 後			
		0	1 %	3 %	5 %	0	1 %	3 %	5 %
対 照		+++	+++	+++	—	+++	+++	+++	[+]
800	30'	+	+	+	—	+++	+++	+++	—
1200	5'	[+]	[+]	[+]	—	++	++	[++]	—
1200	30'	—	—	—	—	[+]	[+]	[±]	—
1600	5'	—	—	—	—	[±]	[±]	—	—
1600	30'	—	—	—	—	—	—	—	—

### 3. 運動障碍.

運動障碍の様相を明瞭に浮き出させる目的の下にブイヨンに種々の濃度のゼラチンを混じった半流動培地に加圧菌を移しその運動性を観察して見た。第5表に示す様にゼラチン濃度の稀薄な場合は殆ど差異を認めないが、3%以上の濃度に於ては加圧菌の運動障碍を比較的明瞭に認め得た。即ち加圧菌は対照に比べ一般に緩慢且変則的運動を示す菌が増加している。

### 4. 加圧中の菌の運動性.

加圧中の菌の運動を直接に観察する方法がないので0.5%の半流動寒天を用ひて予め穿刺したものに400kg/cm<sup>2</sup>の圧を16時間加へた後にその涵濁を検した結果、対照は一樣の涵濁を示したが加圧菌では穿刺の線条に沿うて涵濁を見ると共にその周囲にも極めて薄い涵濁を認めた。即ち之により400kg/cm<sup>2</sup>の圧の下では極く少数の菌が運動性を失はないでいるか、或は環境に適応して運動性を恢復して来た事を推測させる。

800kg/cm<sup>2</sup> 30分の加圧から認められ1200kg/cm<sup>2</sup> 30分で全く停止する。1600kg/cm<sup>2</sup>では5分で全部停止する。

(2) 加圧により運動を停止した菌でも1時間乃至数時間後に再び運動性を恢復する事がある。

(3) ゼラチン加培地を用ひた実験により加圧菌の運動障碍の程度大なる事を確かめた。

(4) 加圧中の菌の運動は400kg/cm<sup>2</sup>の圧の下では大部分停止するが一部運動性を保持する菌が存する。

## 第五章 凝集原性に及ぼす影響

Johnson 等は蛋白質の変性を高圧の作用の一つに数へているが、それならば細菌蛋白体従つてそれを反応元とする免疫反応も高圧を加へることによつて或種の変化を蒙る可能性を考へる事が出する。斯る観点から私はチフス菌及びパラチフスA、パラチフスB菌を用ひてその凝集原性の変化の有無を検して見た。

## 三 小 括

チフス菌の固有運動に及ぼす高圧の影響を懸滴標本によつて観察した結果は次の如くである。

(1) 除圧直後では菌の固有運動の障碍は

## 一 実験方法

1. 菌液 : チフス57S, パラチフスA及B菌を平板培養により18時間培養せる菌を注意深くかき取り生理的食塩水に1mg/1ccの濃度に均等に浮遊せしむ。

2. 血清 : 定法により教室に於て作り保存した家兎免疫血清.

3. 術式 : 血清の倍数稀釈法を採り小試験管に血清と菌液各 0.5c.c. を入れ混和振盪後 37°C の孵卵器中に 2 時間, 更に室温に 22 時間於置し, 判読は 1 時間後, 2 時間後及び 24 時間後の 3 回行ふ.

## 二 實驗成績

1. チフス免疫血清に対するチフス菌の主凝集原性.

H 血清 (OH 血清) 及び O 血清を用ひて H 凝集反応と O 凝集反応を別々に観察した結果この 2 種の血清に対する凝集価は第 6 表に示

第 6 表 チフス免疫血清に対する凝集原性

血清	稀釈度		50	100	200	400	800	1600	3200	6400	12800	25600	K
	圧 (kg/cm <sup>2</sup> )	判定時											
O H 血清	対 照	1	卅	卅	卅	卅	+	+	±	±	—	—	—
		2	卅	卅	卅	卅	+	+	+	+	±	—	—
		24	卅	卅	卅	卅	+	+	+	+	±	—	—
	1600	1	卅	卅	+	+	+	+	—	—	—	—	—
		2	卅	卅	卅	卅	+	+	±	±	—	—	—
		24	卅	卅	卅	卅	+	+	+	+	—	—	—
	30'	1	卅	卅	+	+	+	+	—	—	—	—	—
		2	卅	卅	卅	卅	+	+	±	±	—	—	—
		24	卅	卅	卅	卅	+	+	+	+	—	—	—
O 血清	対 照	1	+	+	±	—	—	—	—	—	—	—	—
		2	卅	+	+	±	—	—	—	—	—	—	—
		24	卅	卅	卅	卅	+	—	—	—	—	—	—
	1600	1	+	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—
		2	卅	+	+	—	—	—	—	—	—	—	—
		24	卅	卅	卅	+	±	—	—	—	—	—	—
	30'	1	+	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—
		2	卅	+	+	—	—	—	—	—	—	—	—
		24	卅	卅	卅	+	±	—	—	—	—	—	—

第 7 表 パラチフス A 及 B 菌免疫血清に対する副凝集原性

血清	稀釈度		50	100	200	400	800	1600	3200	6400	K.
	圧 (kg/cm <sup>2</sup> )	判定時									
パラチフス A 血清	対 照	1	卅	+	+	—	—	—	—	—	—
		2	卅	卅	卅	+	±	—	—	—	—
		24	卅	卅	卅	卅	+	+	—	—	—
	1600	1	+	+	±	—	—	—	—	—	—
		2	卅	卅	+	+	—	—	—	—	—
		24	卅	卅	卅	+	+	±	—	—	—
	30'	1	+	+	±	—	—	—	—	—	—
		2	卅	卅	+	+	—	—	—	—	—
		24	卅	卅	卅	+	+	±	—	—	—
パラチフス B 血清	対 照	1	卅	+	+	±	—	—	—	—	—
		2	卅	卅	卅	+	+	—	—	—	—
		24	卅	卅	卅	卅	+	+	±	—	—
	1600	1	卅	+	+	—	—	—	—	—	—
		2	卅	卅	+	+	±	—	—	—	—
		24	卅	卅	卅	卅	+	+	—	—	—
	30'	1	卅	+	+	—	—	—	—	—	—
		2	卅	卅	+	+	±	—	—	—	—
		24	卅	卅	卅	卅	+	+	—	—	—

す通りであつた。2 種の反応は H 凝集が雲絮状で強く振れば壊れる事と 2 時間以内に終了する事。O 凝集が顆粒状で振つても壊れない事及び 2 時間より遅く出現する事で区別出

来る。H 凝集反応は対照が 2 時間迄に略終了するに対し 1600kg/cm<sup>2</sup> の加圧菌は 2 時間では不安定で終末価は 24 時間後の判定で対照の価と略等しくなる。O 凝集反応も同様に反応



の初期には不安定で多少遅れる傾向を認めるとはいへ、いづれも著明な差とは云ひ難い。

## 2. チフス菌の副凝集原性.

パラチフスA及びB菌の免疫血清(OH血清)に対するチフス菌の副凝集原性は第7表に掲げる通り前述のO凝集反応と類似した結果を示した。

## 3. パラチフスA及B菌の凝集原性.

パラチフスA及びB菌による主凝集反応並びに副凝集反応を観察した結果、チフス菌と同様の傾向を示し、著明な変化を認めなかつた。

# 三 小 括

以上の実験を要約すれば、チフス菌パラチフスA及B菌の主、副凝集原性に及ぼす高圧の影響は全く無しと云ふことは出来ないが比較的僅微且不安定であると云ひ得る。即ち私の実験に於て用ひた程度の高圧では細菌の凝集原性を変化せしめる迄には至らない。

## 第六章 細菌の各種抗生物質に対する抵抗性に及ぼす影響.

細菌の生活即ち発育増殖運動性等が高圧下に置かれる事によつて相当侵される事は前述した通りである。之に抗生物質を作用させた場合、菌の抵抗性は如何に変るであろうか。加圧によつて菌体に傷害を蒙り、細胞膜の変化により透過性又は薬剤の滲透性に影響を及ぼす事が予測される。之は亦各種抗生物質の

作用機作とも関連する所である。以上の見地よりペニシリン、ストレプトマイシン、オーレオマイシン、クロロマイセチンの各種抗生物質を選び加圧菌と対照に対する抗菌作用の相違を追求した。

## 一 実験方法

1. 供試抗生物質. 結晶ペニシリンG. Na塩(武田)塩酸ジヒドロストレプトマイシン(Beyer)オーレオマイシン(Lederle)クロロマイセチン(Parke, Davis), 以上の製剤を夫々秤量して重量単位を以て倍数稀釈によるブイヨン溶液を作つた。

2. 抗菌試験. チフス57S菌, 黄色葡萄球菌寺島株各18時間培養の菌を1mg/10ccの割に生理的食塩水に浮遊せしめ、その1白金耳を上記抗生物質の各ブイヨン溶液に入れ37°C, 24時間培養の後濁度を観察する。

## 二 実験成績

1. チフス菌. 第8表に掲げた様に800kg/cm<sup>2</sup>30分の加圧ではストレプトマイシン、オーレオマイシンは対照と変りないがペニシリン、クロロマイセチンでは加圧菌の抵抗は明らかに低下している。1600kg/cm<sup>2</sup>の圧になるとすべての場合に抵抗性を減ずるがクロロマイセチンは特に著明に減ずる。

2. 葡萄球菌. 加圧によつて各種抗生物質に対する抵抗性は対照に比較して殆ど減弱を認め難い。(第9表)。

第8表 各種抗生物質の作用に及ぼす高圧の影響(1)(使用菌チフスS57)

抗 生 剤	稀 釈 圧	1 万	2 万	4 万	8 万	16 万	32 万	64 万	128 万
Penicillin	対 照	—	—	—	—	—	+	+	++
	800 kg (30')	—	—	—	—	—	—	+	+
	1600 kg (30')	—	—	—	—	—	—	+	+
Streptomycin	対 照	—	+	++	++	++	+++	+++	+++
	800 kg (30')	—	+	++	++	++	+++	+++	+++
	1600 kg (30')	—	—	+	++	++	+++	+++	+++
Aureomycin	対 照	—	—	—	+	+	++	++	+++
	800 kg (30')	—	—	—	+	+	++	++	+++
	1600 kg (30')	—	—	—	—	+	++	++	+++
Chloromycetin	対 照	—	—	—	—	—	+	++	++
	800 kg (30')	—	—	—	—	—	—	+	+
	1600 kg (30')	—	—	—	—	—	—	—	+

第 9 表 各種抗生物質の作用に及ぼす高压の影響 (2) (葡萄球菌寺島株)

抗 生 剤	稀釈度	8 万	16 万	32 万	64 万	128 万	256 万	512 万	1024 万
	圧								
Penicillin	対 照	—	—	—	—	—	—	—	+
	1600 kg (30')	—	—	—	—	—	—	—	+
Streptomycin	対 照	—	—	±	+	++	++	+++	
	1600 kg (30')	—	—	—	+	++	++	+++	
Aureomycin	対 照	—	+	+	++	++	+++	+++	
	1600 kg (30')	—	±	+	++	++	+++	+++	
Chloromycetin	対 照	—	—	+	+	++	++	+++	
	1600 kg (30')	—	—	+	+	++	++	+++	

## 三 小 括

加圧菌と対照菌に対する各種抗生物質の作用を比較した結果チフス菌は  $800 \text{ kg/cm}^2$  の圧でペニシリン、クロロマイセチンに対する抵抗性を減ずるが、他のストレプトマイシン、オーレオマイシンの作用は変わらない。特にクロロマイセチンに対する抵抗性の減弱は著明である。一方葡萄球菌では著明な差異を認めない。

## 第七章 考 按

本篇に於ては細菌の発育増殖、並びに運動性等一般生活現象の外凝集原性及び各種抗生物質に対する抵抗性等に及ぼす高压の影響に関する実験的研究を行つた。夫々の成績に就いて考察を加へたい。

初めに実験方法に就いて二、三の点に論及するならば第一に加圧の方法である。私の実験では hydrostatic pressure を用ひた。之は Krause が鋼板を用ひて圧搾した方法、又は D'Arsonval, Sabrazés & Bazin, Schaeffer & Freudenreich 等によつて用ひられたガス圧による実験とは方法も目的も異なるものである。hydrostatic pressure であるから個々の菌には全く同じ圧力が加はつていてと考へて良い。

第二に使用した油に就いて。菌浮游液に重層する油が加圧によつて菌液に混入し乳濁状となりそれが殺菌作用を示すか否かといふ点は次の理由から否定し得る。油が分子状に菌液中に混入するとすれば除圧後にも油の微細な滴が菌液中に残る筈であるが之は顕微鏡的観察によつても比濁計によつても否定された。

従つて加圧の際には油水の界面を保つたまま菌液全体の容積が圧縮によつて小となると考へるべきで油による作用は考慮の外に置くことが出来る。

第三に加圧及び除圧の速度であるが Johnson, Claude, Zobell (1949) 等は 600 気圧の圧を徐々に加へ且除く場合と急速に行ふ場合とは成績に殆ど差がない事を指摘している。又 Chlopin, Tamman 等は  $3000 \text{ kg/cm}^2$  の圧を 1 回加へて影響の認められぬ場合に、6 回急速に上下する事により酵母の発育を阻害せしめたと称している。私の実験では之等の見解を参考にし、装置の破損を防ぐために 1 回の圧を常に同じ速度 (30 秒) で加へ且除いた。

亦加圧によつて被検液の温度の上昇が考へられるが之は次の理由により、無視して差支えない。即ち容積の変化が極めて微小なるため加圧による温度の上昇傾向は僅微にして且液性被検体の小量が金属性筒内にあり、万一温度の上昇が起つても直ちに筒に熱が伝播されて外温と等しくなる。更に外温に就いても Johnson 等によれば大差なれば重要な条件となり得る様であるが、私の実験では装置の関係から厳密な温度差による実験を試みることを得ず同程度の室温に於て対照を同じ条件に置き実験を為すことで満足せざるを得なかつたのは遺憾である。

次に文献的考察であるが Certes は 350 乃至 600 気圧の圧で、酵母、脾脱疽菌、腐敗菌等に傷害を与へずと報じ、Krause によれば結核菌も同様の結果を示した。Roger は  $1000 \text{ kg/cm}^2$  の圧を加へて大腸菌に何の作用も与へ得ず、 $3000 \text{ kg/cm}^2$  に至り初めて一部の菌

が増殖力を喪失するのを認めたが、葡萄球菌に対しては尚全く無害であつた。Chlopin 及び Tamman は  $3000\text{kg}/\text{cm}^2$  の圧は短時間では細菌、酵母、菌類に何等の作用をも示さず、長時間即ち 4~96 時間継続加圧する事によつて漸く細菌の運動を弱め増殖の遅延又は阻止を示し、醗酵作用及び毒力の減弱を来したと報じている。Larson 等は  $6000$  気圧 14 時間の加圧によつて芽胞を有しない菌はすべて死滅させるが枯草菌の芽胞は  $12000$  気圧を以てしても死滅させ得ないと発表している。最近に至り Johnson, Zobell 等は海棲菌による研究を行つて  $400$  乃至  $800$  気圧の下では高圧に対する抵抗を有する許りでなく菌株によつては却つて常圧の下よりも発育の促進する場合のある事を指摘している。

私の実験は最高  $1600\text{kg}/\text{cm}^2$  (= 気圧)迄で研究上制約を受けた事は否めないが本篇の成績の示す様に此の程度の圧でも菌種によつては相当の影響を蒙る事実を確かめ、私の研究目的に充分副ふことが出来たと信ずる。即ち私の実験によれば古い文献に見られるよりは可成り低い圧で細菌に対して相当の影響を与えるものである事を立証することが出来た。

細菌の発育増殖に就いてはチフス菌では  $1200\text{kg}/\text{cm}^2$  5 分の加圧により発育する集落の数が著明に減少し始める。且其れは圧の高さと加圧時間に略比例している。平板培養による集落数計算は誤差が大で Klein によると 33% Neiser が 14% Jennison & Wadsworth が 6.6% と見積つてゐるが、私の場合も平均 15% 前後の誤差を生じた。然し  $1200\text{kg}/\text{cm}^2$  の圧では誤差範囲を超えて明らかに増殖力を持つ菌の激減を認める。此の関係を比濁法により観察した結果、高圧の影響は所謂 lag phase の延長として現はれた。而して此の現象は圧の高さ並に時間に比例する外加圧時の菌浮游液の性状によつても異なる事を確かめた。又対数増殖期に入つた発育中の菌は特に傷害を蒙り易い様である。増殖曲線に現はれた見かけ上の lag phase の延長の実態は如何で

あろうか。其所で除圧後ブイヨンに移して  $37^\circ\text{C}$  に保ち時間毎に菌数の増減を平板培養による集落計算で検索した結果第 2 表に示した様に加圧菌は初め菌数を減少する傾向を示すが一定時間後に菌数が急増する現象を認める。之は加圧により菌の一部又は大部分は分裂能力を失ひ遂に死に至るが一部の菌は一旦麻痺の状態に陥り生活機能を停止するが一定時間を経過すると恢復して再び対照菌と同様に分裂増殖を行ふものと解してよいのであるまいか。固有運動に関する観察は之と略一致した成績を示し以上の推論を裏付けている。例へば  $1200\text{kg}/\text{cm}^2$  30 分の加圧後 1 時間迄は全視野に運動を示す菌を発見し得ないが 2 時間後には少数の変則的運動を示す菌を見出し更に 3 時間後には其等の外に活潑な正常固有運動を示す菌が出現し、5 時間後に分裂前の長大な菌や分裂中の菌を多数認めた事實は重要な所見である。之によつて加圧により運動を停止した菌の中には除圧後時間の経過と共に運動を恢復するものの有ることを証明した。以上の諸事実を総合して考へるならば増殖曲線に於ける見かけ上の lag phase の延長は生菌の減少といふ事の外に個々の菌の恢復の遅延をも含んでいると解する事が出来る。

葡萄球菌の発育及び増殖に対しては本実験に於て使用した程度の圧では何等の影響をも与へない。球菌が一般に圧に対して普通桿菌より抵抗性を有する事は文献によつても想像し得る所である。

次に凝集原性に関しての報告は私の検べた所では見当たらないのでその高圧との関係を検索して見たが、反応時間が多少遅れる程度で最終凝集価には変りはなく、特記すべき変化は認められない。抗元構造を破壊するには遙かに高い圧を必要とするであろう。Basset, Macheboeuf に由ると血清中のグロブリンがゲル化するのは  $13000$  気圧と云つてゐるが、一方ウイルスのワクチンが不活性化されるのは  $4500$  気圧であると報告されている。

最後に各種抗生物質に対する抵抗性の変化

に就いては従来全く報告されていない。私の実験に於て4種の抗生物質に対し、加圧菌の抵抗性が一様の減弱を示さない点は留意すべきである。特にチフス菌に卓効ありと云はれるクロロマイセチンに対する抵抗が減ずる点に興味がある。細胞膜の透過性に変化を生じたか、或は菌体表面構造に於て該物質の作用点に何等かの変化を来した事を推定し得るわけに之に就いては篇を改めて論及したい。

## 第八章 結 論

細菌の諸生活現象に及ぼす hydrostatic pressure の影響に就いて実験的研究を為し、次の結果を得た。

1. チフス菌は  $800\text{kg}/\text{cm}^2$  30 分の加圧により発育増殖に阻害を蒙り、それは圧の強さ

と加圧時間に略比例する事を集落計算及び比濁法によつて確認した。併し  $1600\text{kg}/\text{cm}^2$  30 分の加圧でも全く阻止される事はない。

2. チフス菌の固有運動は  $800\text{kg}/\text{cm}^2$  30 分で阻害され始め  $1200\text{kg}/\text{cm}^2$  30 分の加圧で全く停止するが一部の菌は除圧後時間の経過と共に運動を恢復する。恢復した菌の増殖機能は加圧前と変らない。

3. 凝集原性に対しては  $1600\text{kg}/\text{cm}^2$  程度の圧では大した意義を有しない。

4. 抗生物質のうち特にクロロマイセチンに対するチフス菌の抵抗性は加圧により著明に減弱する。

5. 葡萄状球菌では発育増殖其他の生活現象に於ては  $1600\text{kg}/\text{cm}^2$  程度の圧を加へても著明な変化を認め得ない。