The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	微生物の熱損傷機構と加熱殺菌における薬剤併用効果
Author(s)	土戸, 哲明
Citation	大阪大学, 1977, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/2031
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

微生物の熱損傷機構と
加熱殺菌における薬剤併用効果

土　戸　哲　明

はじめに

熱（温度）は，原始生命の誕生以来，すべての生物に対して，その生存や機能に測り知れないほど多くの影響を与えてきたことは周知の事実である。しかしながら，すべての生物は，他のあらゆる条件が都合よくても，ある一定温度以上ではその生命を保つことが不可能である。熱殺菌は，人間にとって有害な微生物を，そのような温度以上に加熱して死滅させる最も簡単かつ有効な殺菌手段で，古くから汎用されてきた。

しかし，現今の食糧産業においては，生産から製造，加工を経て販売に至るまで，食品の流通ルートが確立されてきており，食品の価値寿命の長期化が強く要望されるようになった。したがって，かりに加熱殺菌を施しても，その後の保存中には絶えず微生物による変敗の危険にさらされていることになる。そこで，食品包装技術の発達とともに，各種の防腐剤，殺菌剤などのいわゆる食品添加物が次々に開発され，積極的に食品に適用されるに至った。

ところが，従来から検討されていた人体に対する薬剤の安全性が，最近さらに問題視され，サリチル酸，ニトロフラン誘導体などの毒性，発ガン性が報告された。しかしながら，現在使用されている多くの食品添加物がすべて有害ではないことは勿論であるし，また一方では，低温流通の発達にもかかわらず，微生物汚染防止のために添加物の使用を全く廃止することは不可能に近い。そこで，いかに安

全な手段を用い，食品の保存効果を高めるかということが，食品貯蔵に携わる技術者や研究者にとって最大の急務となっている。

一方，微生物が熱によってなぜ死滅するかという問題は，熱殺菌研究の最も基本的な一命題であるだけでなく，細胞生理学や生物物理学においても，生命現象の根幹に触れる興味深いテーマの一つである。しかし，この極めて素朴な疑問に対する説明は様々で，現在のところその決定的要因は明らかでない。

本論文は，微生物細胞の熱損傷機構に関する検討を基礎に，熱殺菌における抗菌薬剤の併用効果について検討し，得られた成果を論述するものである。ここに省みるとき，なお解明すべき問題を多く残しており，今後ともその究明に努力する所存である。

1977年4月

著　者

目　次

序　論　1
第1章　微生物の熱損傷とその回復　7
第1節　緒言　7
第2節　実験材料および方法　9
第3節　実験結果　11
1.　*Candida utilis* の熱損傷とその回復　11
2.　*Escherichia coli* の熱損傷とその回復　16
第4節　考察　22
第5節　要約　24
第2章　*Escherichia coli* の熱死滅に対する昇温プロセスの効果　25
第1節　緒言　25
第2節　実験材料および方法　26
第3節　実験結果　30
1.　昇温プロセスの効果とその影響因子　30
2.　昇温プロセスの効果の要因　33
第4節　考察　41
第5節　要約　43
第3章　*Candida utilis* に対するソルビン酸の加熱併用効果　45
第1節　緒言　45
第2節　実験材料および方法　46
第3節　実験結果　49

1.　ソルビン酸の抗菌作用機構　49
2.　ソルビン酸の加熱併用効果の要因　52
第4節　考察　59
第5節　要約　62
第4章　*Esherichia coli* に対するタイロシンの加熱併用効果　64
第1節　緒言　64
第2節　実験材料および方法　64
第3節　実験結果　67
1.　熱損傷細胞の増殖に対するタイロシンの作用　67
2.　タイロシンの加熱併用効果の要因　70
第4節　考察　74
第5節　要約　76
第5章　細菌胞子に対する両性界面活性剤の加熱併用効果　78
第1節　緒言　78
第2節　実験材料および方法　79
第3節　実験結果　81
第4節　考察　86
第5節　要約　87
第6章　薬剤の加熱併用効果における細胞死滅の動力学　89
第1節　緒言　89
第2節　実験材料および方法　90

才3節　実験結果および考察　93
1.　熱死滅に対する薬剤作用の反応特性　93
2.　加熱併用効果を有する薬剤の類型化　101
才4節　要約　103
総括および結論　105
文　献　112

序　論

加熱殺菌は，汚染微生物に対する抑制手段の中核的なもので，その殺菌対象物中の水分の相対量により，湿熱と乾熱に区別される。微生物の熱死滅機構は，両者の間では異なるものと考えられており，[1] 実験方法の容易さおよび実用上から，とくに前者における研究が多い。そのアプローチとしては，種々の環境因子の変動に対する対応や，細胞の各代謝機能，高分子成分の構造の熱安定性の検討が主なものである。また，生物の温度適応の観点から，好熱性菌や低温性菌の好熱および熱感受性機構，さらに細菌胞子の耐熱機構に関する研究[2-10,24]も，間接的なアプローチと見ることができる。自然界に最も普遍的な中温性菌の栄養細胞を対象とした場合，比較的高温では細胞の構造や機能のほとんどが瞬間に変化するため，致死的な要因を究明することが困難である。しかし，多くの細胞が死には至らず，損傷を受けるような半致死的加熱条件下では，死滅機構の生理学的解析が可能であり，生化学的な実験技術の進歩にともなって本格的に検討されつつある。

通常，微生物細胞の生死の判定は，寒天培地上でのコロニー形成能（子孫をつくる能力）の有無によって行なわれ，その結果は all-or-none である。しかし，重要なことは，例えば紫外線照射による細胞障害の研究においてその精巧な DNA 修復機構が明らかにされてきたように，細胞は損傷部位を修復する能力を備えていることである。したがっ

て，細胞の致死要因解明のためには，加熱処理中の損傷だけでなく，処理後の回復の機構についても検討する必要がある。

細胞を加熱処理すると，その後の増殖が遅延したり，[11] 栄養要求性が厳しくなったり，[12,13] また種々の細胞機能に障害を受ける[14] ことは古くから知られていた。これらの損傷は凍結処理によってもおこり，Straka と Stokes[15] はこのような障害を「代謝障害」と呼び，種々の物理的処理を施した細胞に普遍的な現象とされている。[16,17] 加熱損傷とその修復についての最近の研究報告は，Allwood と Russell[14]，芝崎[7]の総説にまとめられているが，その要因として挙げられているものは，Table I-1に示したように，細胞膜透過性の変化，RNA およびリボソームの分解，DNA 鎖の切断，Mg^{++} の漏出，蛋白質変性が主なものである。このように，加熱によって細胞の構造や機能の多くに傷害が現われるが，どの反応が致命的なものかは依然不明である。しかし，微生物の熱死滅機構の解明なくしては，熱殺菌の体系化は困難であろう。

食品の殺菌および貯蔵方法には，加熱以外にも薬剤や放射線，除菌などによる処理があるが，安全性や品質低下，二次汚染などの点で各々得失がある。しかし，これらの処理を併用すれば，相互の欠点を補い合い，殺菌・貯蔵の点で相剰効果も期待することができる。近年，このような利点が注目されはじめ，併用処理に関する研究が一つの話題になってきている。[7]

Table I-1. Various mechanisms proposed for the thermal injury and death of microbial cells.

Mechanism	Microorganism	Reference
Membrane-permeability alteration	*Staphylococcus aureus*	18,20
	E. coli	19
RNA and ribosome degradation	*Aerobacter aerogenes*	21
	S. aureus	20,22,23,27,28,31
	E. coli	25,34
	Streptococcus faecalis	26
	Salmonella typhimurium	29,30
	Bacillus subtilis	32
	Pseudomonas aeruginosa	33
DNA strand break	*E. coli*	35,36
	Sal. typhimurium	37
Mg^{++} loss	*S. aureus*	38,39
Protein denaturation	various microbes	40

熱殺菌における薬剤併用処理（薬剤の加熱併用処理）は，比較的低温での加熱と，低濃度の薬剤を併用することにより，経済的で，しかも各々単独処理の場合よりもすぐれた殺菌・保存効果を得ようとするもので，Table I-2に主なものを示したように，すでに多くの薬剤が顕著な加熱併用効果を有することが知られている。しかしながら，これらの併用による相剰作用の機構についての知見はほとんどなく，わずかに，Michener[74]，O'Brienら[43,75]が抗生物質であるサブチリンとナイシンの加熱併用効果について報告しているのみであり，また，併用効果の系統的な研究も全く行なわれていない。

一般に，薬剤の作用は温度の上昇とともに増大するが，ある特定の温度以上では，微生物細胞の熱傷害がひきおこされるため，薬剤によってはその作用が飛躍的に高められることが推定できる。したがって，加熱併用効果の要因追求のためには，薬剤の抗菌作用機構についての理解とともに，細胞の加熱損傷機構についての知見が必須である。

以上のような観点から，著者は，微生物の加熱損傷とその回復の機構を検討し，その得られた知見を基礎に，熱殺菌における薬剤併用効果について調べ，その要因を明らかにするとともに，実用上の処理条件についても有益な示唆を得ることを目的として本研究を行なった。

第１章では，*Candida utilis* と *Escherichia coli* を対象に，半致死的条件での加熱による細胞の損傷とその回復の機構について調べ，他の微生物を用いた過去の研究例と比較し

Table I-2. Antimicrobial agents having combined effect with heating on the death or growth inhibition of microbes.

Chemical	Microorganism	Reference
1. Anibiotic		
Pimaricin	*Saccharomyces cerevisiae*	41
Subtilin	Bacterial spores	42,43
Nisin	Bacterial spores	42-44
Tyrothricin	*Bacillus stearothermophilus* spores	45
2. Inorganic substances		
NaClO	Bacterial spores	46
	Aspergillus niger spores	47
NaOH	*Asp. niger* spores	47
	Bacillus cereus spores	48
	B. subtilis spores	49
SO_2	*Byssochlamys fluva*	50
Polyphosphate	*Salmonella senftenberg*	51
3. Gaseous substances		
Ethylene oxide	Bacterial spores	52-54
	Sal. typhimurium	55
	Clostridium spores	42
Propylene oxide	Bacterial spores	52
β-Propiolactone	*Sal. typhimurium*	55
H_2O_2	Bacterial spores	42,56-58
4. Organic acids, aldehydes and alcohols		
Acetic acid	*Sal. typhimurium*	55,59
Lactic acid	*Sal. typhimurium*	55
Benzoic acid	*Sal. typhimurium*	55
Ascorbic acid	Clostridium spores	60
Sorbic acid	*Sal. typhimurium*	55
	various microbes	61
Formaldehyde	Bacterial spores	42,62
Glutaraldehyde	*B. subtilis* spores	63,64
Ethanol	Clostridium spores	65
	Yeasts	66
Phenol	*E. coli*	67
Chlorocresol	Bacillus spores	68
5. Surfactants		
Cetyltrimethyl-ammonium bromide	Clostridium spores	42
Benzalkonium chloride	Bacillus spores	68
Arquad T	*Bacillus megaterium* spores	69
6. Others		
Menab	*Bacillus coagulans* spores	70
Captan	*B. coagulans* spores	70
EDTA	Salmonellae	71
	B. coagulans spores	72
Phenylmercuric-nitrate	*B. subtilis* spores	73

た。

才2章では，一定温度での *E. coli* の熱死滅が，その温度に到達するまでの昇温プロセスに著しく影響を受ける事実を見出し，この現象の要因について検討した結果を示す。

才3~5章では，食品防腐剤あるいは環境殺菌剤としてすでに実用化，もしくは実用化が検討された3種類の抗菌薬剤をモデルとして，熱殺菌における薬剤併用効果を扱い，その相剰作用の特性と機構について調べた。才3章では，とくに酸性の食品で問題となる真菌の一種として *C utilis* に対する防腐剤，ソルビン酸の，才4章では，汚染指標菌として知られる *E. coli* に対し，抗生物質，タイロシンの，才5章では，耐熱性，耐薬剤性などの点で最も問題となる細菌胞子に対する両性界面活性剤の，各々の加熱併用効果について述べる。

最後に，才6章では，この併用効果の動力学的側面として，熱死滅反応に対する薬剤作用の反応特性について検討した結果を記述する。

第1章　微生物の加熱損傷とその回復

第1節　緒言

微生物細胞を比較的温和な条件で加熱すると，死滅には至らないが種々の細胞機能に障害を受けた加熱損傷菌が出現する。この障害の一つは酵素の不活性化である。Evison と Rose[76]は，最大増殖温度以上での低温菌の死滅は酵素の熱失活によることを示唆しており，また，細胞内の特定の酵素が熱変性するために増殖が停止する例[77,78]も報告されている。

Strange と Shon[21]は，*A. aerogenes*，*Serratia marcescens* の 47°C での加熱処理によって，RNA 分解と細胞内物質の漏洩がおこることを示した。Sogin と Ordal[23]は，*S. aureus* 細胞の加熱によるリボソームおよびリボソーマル RNA の分解を認め，これが損傷の一次的なものであると考えている。また，Iandolo と Ordal[22]は，同じ菌を用いて細胞膜透過性の変化を示し，Russell と Harries[19]も，細胞の一次的な損傷部位は細胞膜であると述べている。

Iandolo ら[79]は，*S. aureus* の 45°C での加熱により，細胞の食塩耐性が低下する事実を認め，Stiles と Witter[80]は，この耐性が加熱後，グルコースまたはガラクトース中で回復することを示し，蛋白合成および細胞壁合成の阻害剤はこの回復を阻害しないことを報告した。Iandolo と Ordal[22]は，この食塩耐性の回復には RNA 合成が関与することを示唆している。同様の現象が，*St. faecalis*[26]，

B. subtilis[32], *Sal. typhimurium*[29,81], *Ps. aeruginosa*[33] でも報告され，これらのうち，*Sal. typhimurium* については，RNA 合成のほかに蛋白合成と ATP 合成も回復に必要であることが認められている。*E. coli* については，Mukherjee と Bhattacharjee[82] が，B 株を 52°C で加熱後，リン酸緩衝液中におくとコロニー形成能が回復することを認めており，また最近，同じ株を用いて検討した Bhaumik と Bhattacharjee[34] は，RNA 分解が熱死滅の要因であると述べている。

一方，1969 年，Bridges ら[35,83] が，*E. coli* の各種変異株を用い，その 52°C での熱感受性と電離放射線感受性が相関関係にあることを示したことから，加熱による in vivo DNA 鎖切断と熱死滅の関連性が注目された。Woodcock と Grigg[36] は，この DNA 鎖の切断が endonuclease によること，ならびにこの切断がリン酸緩衝液中で修復されることを認めている。また Gomez ら[37,84] も，紫外線照射細胞で観察されている最少培地回復効果[85] を，50°C で加熱した *Sal. typhimurium* について見出し，DNA 鎖切断およびその修復がこの効果の要因であるとしている。

真菌の加熱損傷の研究は，細菌のそれに比較すると極めて少ない。Nash と Sinclair[86] は，低温性酵母，*Candida nivalis* の加熱損傷を調べ，アミノ酸，リン酸およびヌクレオチドーリン酸の漏洩を認めた。Baldy ら[87] は，54°C で加熱した *Penicillium expansum* の胞子の回復条件を検討し，23°C，通気下の水中で最適の回復が得られ，炭

素源や 2,4-ジニトロフェノールなどの存在はこれを妨げることを示している。

以上のように，加熱による細胞障害はその構造，機能の至る所にみられ，これらのほかにもこ，三の要因が提出されている（序論，Table I-1 ）が，現在のところ有力な説は，主に，Ordal一派の唱えるRNA 分解，それに細胞膜と DNAの傷害と言える。著者は，本研究の基礎として，まず微生物の熱損傷とその回復の概要を，今まで詳細な検討例のない，*C. utilis* と *E. coli* を用いて調べた。

第2節　実験材料および方法

<u>供試菌</u>　*C. utilis* OUT 6020 および *E. coli* K-12を用いた。

<u>培養と細胞懸濁液の調製</u>　細菌は対数期細胞を用い，nutrient broth （肉エキス 1 %，ポリペプトン 1 %，食塩 0.5 %，pH 7.0 ） 20 ml を含む 100 ml 容フラスコ中，37°C で 16 時間培養したのち，100 ml の同培地を含む 500 ml 容フラスコに 2.5 %植菌し，OD_{660} が 0.3 に達したとき集菌した。酵母は定常期細胞を用い，Czapek-Dox 培地（ショ糖 3 %，硝酸ナトリウム 0.3 %，リン酸第一カリウム 0.1 %，塩化カリウム 0.05 %，硫酸マグネシウム 0.05 %）にポリペプトン，酵母エキスをそれぞれ 0.25 %添加したもの（ pH 5.5 ）で 30°C ，20 時間培養した。集菌後，酵母の場合，生理食塩水，細菌の場合，脱イオン水で 2 回洗浄し，それぞれ脱イオン水に懸濁した。

加熱処理と加熱後の液体保持　加熱処理は，細菌の場合，所定温度に保温した脱イオン水 18 ml を含む 100 ml 容フラスコに，37°C で 5 分振とう保温した細胞懸濁液（約 10^9/ml）2 ml を加えて行なった。加熱処理後，細胞を含む試料 2 ml を，37°C に保温した脱イオン水 18 ml を含む 100 ml 容フラスコに加えた。この操作により，加熱処理後は常に 37°C になるようにした。酵母の加熱処理の場合には，pH 4.0 の 0.1 M リン酸溶液（リン酸－カリウムとリン酸を 80:1 の比で混合したもの）99 ml を含む 300 ml 容フラスコに，1 ml の細胞懸濁液を添加して行なった。回復をみる実験では，細菌の場合，加熱後上述のように希釈し 37°C に保温した細胞懸濁液の 2 ml を，同温度においた 18 ml の液体保持培地に添加したのち，振とう保温した。保持培地としては，0.02 M トリス－塩酸緩衝液（pH 7.2），または溶質をこれに溶解させたもの，0.02 M リン酸緩衝液（pH 7.2），あるいは栄養培地を同 pH に調製したものを用いた。酵母の場合には，pH 5.5 の 0.1 M リン酸緩衝液を使用し，同様に処理した。

生菌数測定　常法によった。培地は，上述の増殖培地に寒天 1.5 % 加えたものを用い，食塩耐性についての実験では，さらに培地中の食塩濃度を，細菌の場合 4 %，酵母の場合 7 % とした寒天培地も用いた。以下，食塩未添加培地を，細菌，酵母，それぞれ NA，CPYA，添加した培地を，NAS，CPYAS と略記する。

細胞内物質の漏洩と RNA 分解　約 10^9/ml の酵母細

胞を含む懸濁液を，加熱中，経時的に 5 ml ずつ遠心分離管に採取し，遠心分離（3,000 rpm，5分）によってその上澄液をとった。この液の 260 nm 吸光を測定後，オルシノール法[88] による RNA 様物質，アンスロン法[89] による全糖を定量した。また RNA 分解については，5 ml の加熱細胞懸濁液を 3,000 rpm，5 分遠心分離し，上澄液を採取したあと，Schmidt-Thannhauser-Schneider 法[99] に準じて熱過塩素酸で抽出される区分を分画し，その 260 nm 吸光の増加を測定した。

試薬　ナリジキシ酸（Sigma），クロラムフェニコール（三共），リファンピン（Calbiochem），2,4－ジニトロフェノール，シアン化カリウム（ともに和光純薬），ベンジルペニシリンナトリウム（武田薬品），ビタミン非含有カザミノ酸（Difco）を用い，その他のものは市販品を使用した。

第3節　実験結果

1. *C. utilis* の熱損傷とその回復

Fig. 1-1 は，0.1 M リン酸溶液（pH 4.0）における *C. utilis* 細胞の熱死滅曲線を示したものである。同条件での細胞内 260 nm 吸光物質の漏出経過を Fig.1-2 に示した。50°C での漏洩は，60 分までは 45°C と大差なく，その後急激に増加した。また 55°C での漏洩は，60°C でのそれよりも緩慢であるが，漏出量の点では 40 分で逆転し，55°C の方が多い結果を得た。このような加熱による

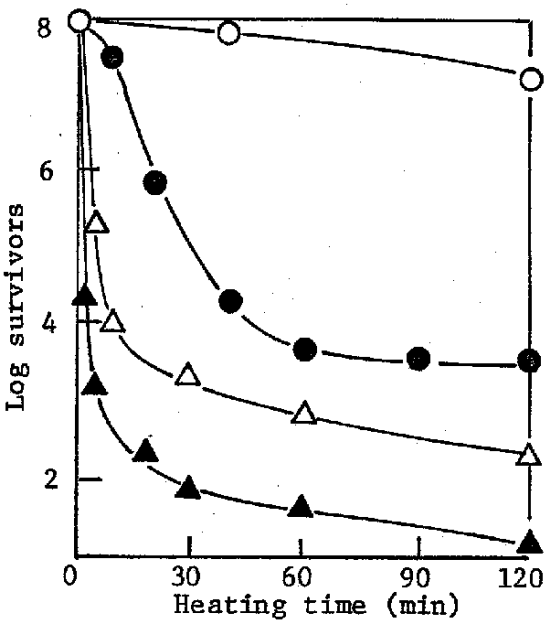

Fig. 1-1. Survivor curves of *C. utilis* cells heated in 0.1 M phosphate solution (pH 4.0). Symbols : ○, 45°C; ●, 50°C; △, 55°C; ▲, 60°C.

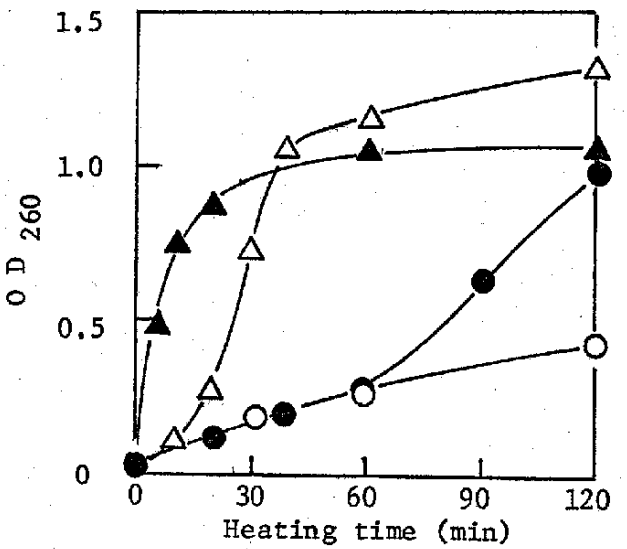

Fig. 1-2. Leakage of 260 nm-absorbing materials from *C. utilis* cells heated in 0.1 M phosphate solution (pH 4.0). Symbols : See Fig. 1-1.

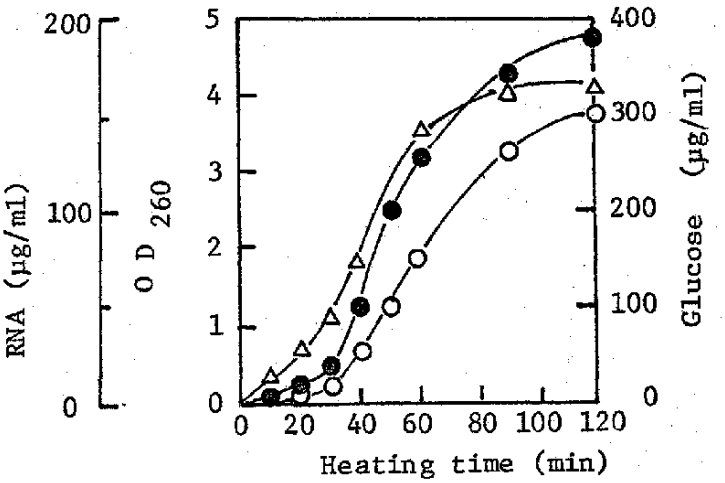

Fig. 1-3. Leakage of intracellular materials from *C. utilis* cells heated at 55°C in 0.1 M phosphate solution (pH 4.0). Symbols : ○, 260 nm-absorbing materials ; ●, orcinol-positive materials ; △, carbohydrates.

細胞内物質の漏出は，Fig. 1-3 に示したように，オルシノール反応陽性物質，全糖のほか，蛋白質，リン酸についても認め，これらの漏洩経過は 260 nm 吸光物質のそれに類似していた。

加熱による RNA 分解を検討し，結果を Fig. 1-4 に示した。50°C あるいは 60°C で加熱した *C. utilis* 細胞の熱酸可溶性区分の 260 nm 吸光は時間とともに低下し，その間の細胞外液の吸光はそれに併行して増加する傾向にあった。このことは，加熱によって細胞内の RNA が分解し，その分解産物の少なくとも一部は，細胞膜の損傷とともに細胞外へ漏出することを示すものと考えられる。

微生物の加熱損傷からの回復は，損傷菌の食塩感受性を例として研究されている場合が多い。本研究においても，

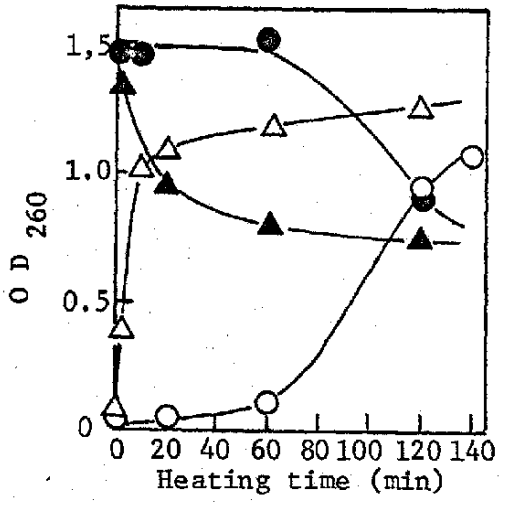

Fig. 1-4. Degradation of RNA in *C. utilis* cells heated in 0.1 M phosphate solution (pH 4,0). Symbols : ○, △, OD_{260} of leaked fraction from heated cells at 50°C or 60°C, respectively ; ●, ▲, OD_{260} of hot-PCA soluble fraction from heated cells at 50°C or 60°C, respectively.

C. utilis についてこの回復現象を認めた。すなわち，未加熱細胞は平板培地中の7％食塩の存否にかかわらず，ほぼ同数のコロニーを形成できるが，Fig. 1-5 に示すように，0.1 M リン酸溶液（pH 4.0 ）中，45°C での加熱によって，その後の平板培養時の培地に含まれる食塩（7％）に対して感受性を増し，食塩を含有しない寒天培地（CPYA ）上のコロニー数にはほとんど変化がないが，高濃度の食塩を含む培地（CPYAS ）上におけるコロニー数は著しく低下した（ Fig. 1-5a ）。このCPYA 上ではコロニーを形成できるが，CPYAS 上では形成できない一群の細胞集団は，加熱により何らかの損傷を受けたもので，これらの細胞は用いた実験条件下における加熱損傷菌として定義

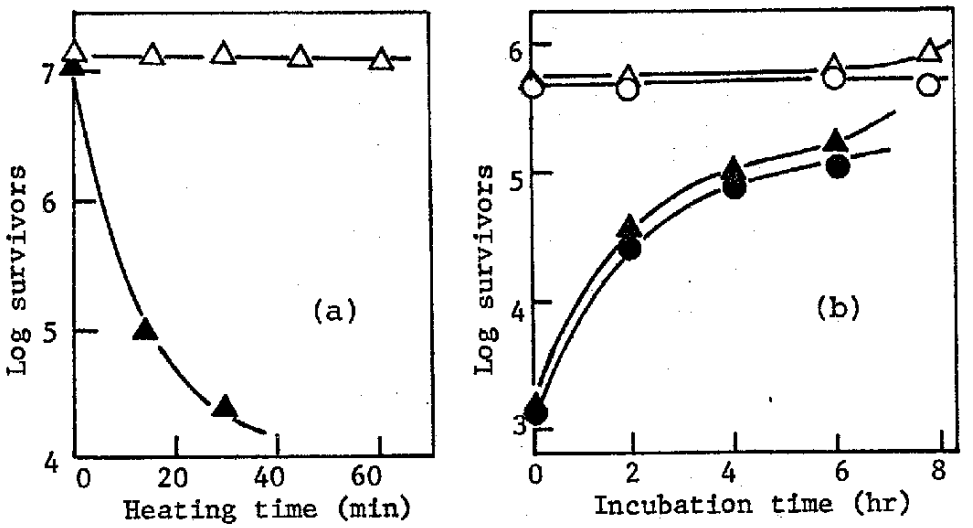

Fig. 1-5. Loss and its recovery of NaCl tolerance of *C. utilis* cells heated at 45°C in 0.1 M phosphate solution (pH 4.0). (a) Loss of NaCl tolerance. Cells were heated and plated on CPYA (△) and CPYA containing 7 % NaCl (▲). (b) Recovery of NaCl tolerance. Cells were heated at 45°C for 15 min, incubated at 30°C in 0.1 M phosphate buffer (pH 5.5)(○,●) or CPY broth (△,▲) and then plated on CPYA (○,△) and CPYA containing 7 % NaCl (●,▲).

できる。45°C，15 分の加熱処理により低下した食塩耐性は，その後，30°C のリン酸緩衝液（pH 5.5 ）中で保温することにより次第に回復した（ Fig. 1-5b ）。この食塩耐性の回復は0°C ではおこらないこと，同pH の CPY broth中でも，リン酸緩衝液の場合と同程度の回復をおこすことを認めた。

Fig. 1-6 は，食塩耐性の回復に対する酸化的リン酸化の脱共役剤として知られる 2,4- ジニトロフェノールの影響をみたもので，リン酸緩衝液中のこの薬剤の存在により，ほぼ完全に回復が抑制されることがわかった。薬剤は増殖の最少阻止濃度（ 5×10^{-4} M ）で使用した。加熱後，上

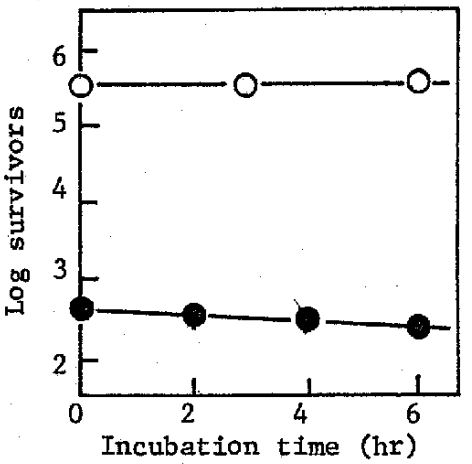

Fig. 1-6. Effect of 2,4-dinitrophenol on the recovery of NaCl tolerance by *C. utilis* cells heated at 45°C for 15 min in 0.1 M phosphate solution (pH 4.0). Heated cells were incubated in 0.1 M phosphate buffer (pH 5.5) containing 2, 4-dinitrophenol (5×10^{-4} M) and then plated on CPYA (○) and CPYA containing 7 % NaCl (●).

述のように液体保持した細胞を，使用濃度の1/100（生菌数測定の際の最少希釈倍率）の濃度を含むCPYASに平板培養しても，薬剤無添加の場合とほとんど同数のコロニーを示したことから，この阻害は薬剤のもちこみによるものではないと考えられる。

2. *E. coli* の加熱損傷とその回復

C. utilis で認められた加熱損傷細胞における食塩耐性の回復を，*E. coli* についても検討した。Fig. 1-7 は，脱イオン水中の *E. coli* 細胞を，52°C，5分加熱し，その食塩耐性の低下を，各食塩濃度について調べたもので，4 %の食塩濃度では，未加熱細胞の生菌数低下は極めて少ないが，加熱細胞のそれは約 99.95 % に達した。このときの食塩耐性低下の経時変化を Fig. 1-8 に示した。ここ

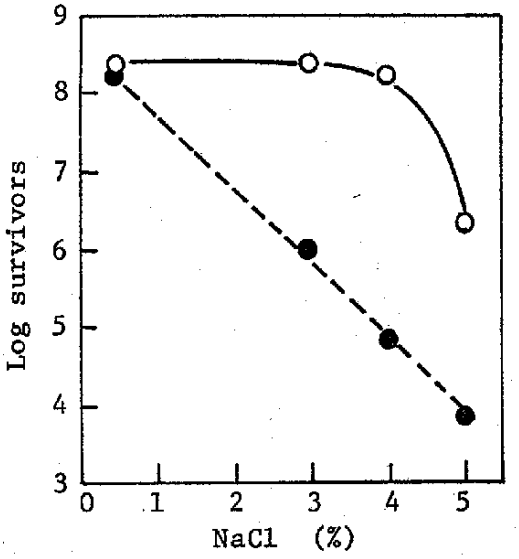

Fig. 1-7. Loss of NaCl tolerance of *E. coli* cells heated at 52°C for 5 min in deionized water. Cells were plated on nutrient agar containing various concentrations of NaCl. Symbols : ○, unheated; ●, heated.

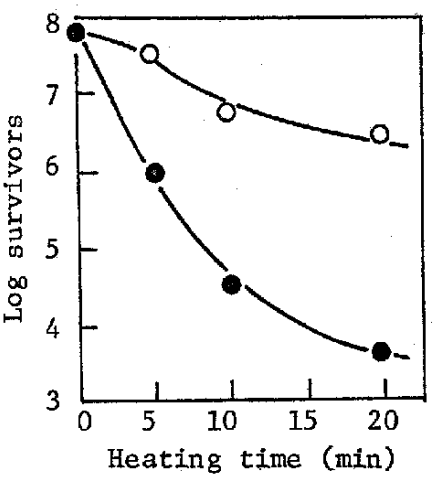

Fig. 1-8. Time course of loss of NaCl tolerance of *E. coli* cells heated at 52°C in deionized water. Symbols : ○, NA ; ●, NA containing 4 % NaCl (NAS).

では，52°C ，5 分の加熱により，通常の栄養寒天培地（NA）上ではコロニーを形成できるが，4％食塩を含む同培地（NAS ）上では形成できない細胞を加熱損傷菌とし，以下，その食塩耐性回復の機構について検討を行なった。

52°C ，5 分，加熱した *E. coli* を，脱イオン水，0.02 Mトリス塩酸緩衝液（pH 7.2 ），0.02 Mリン酸緩衝液

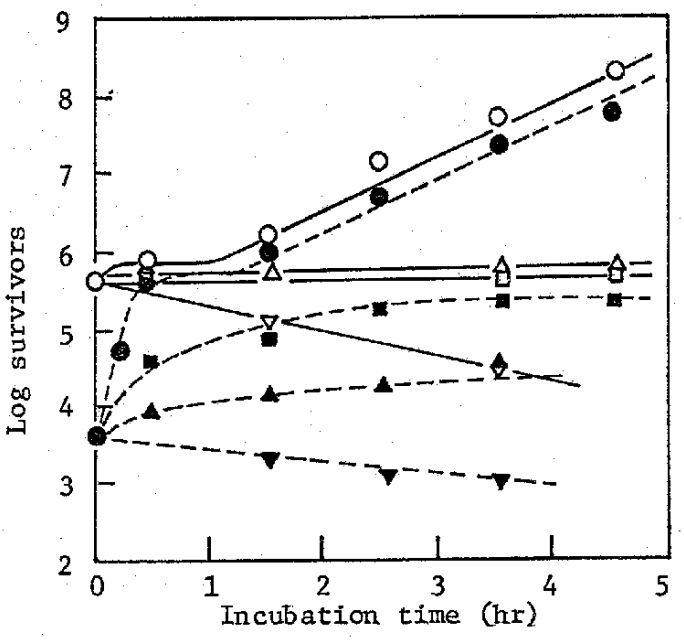

Fig. 1-9. Recovery of NaCl tolerance by heated cells of *E. coli* during post-heat treatment incubation at 37°C. Cells were heated at 52°C for 5 min in deionized water and incubated at 37°C in the following liquid holding media.

Holding medium	Plating medium	
	NA	NAS
Nutrient broth	○	●
Phosphate buffer(0.02 M, pH 7.2)	□	■
Tris-HCl buffer (0.02 M, pH 7.2)	△	▲
Deionized water	▽	▼

(pH 7.2) および nutrient broth 中に移し，37°C で液体保持した。その間の食塩耐性の経時変化を Fig. 1-9 に示す。図にみられるように，脱イオン水中では耐性の回復は認められず，トリス塩酸緩衝液中でもほとんどおこらない。しかし，高栄養条件の nutrient broth 中では著しい回復が認められ，約 30 分後にほとんど完了して 1 時間後には増殖を開始した。また，リン酸緩衝液中でも，緩慢で不完全ではあるが回復を観察し，この場合には，約 2.5 時間後に停止した。いずれも，回復期間中の NA におけるコロニー数はほとんど変化しないので，細胞増殖はおこっていないと考えられる。リン酸緩衝液における回復は，0.05 M のリン酸カリウム濃度で最大であり，pH 6.5～7.2，30°C の保持温度で最適であることを認めている。

Fig. 1-9 の結果は，食塩耐性の回復にリン酸が有効であることを示しているが，nutrient broth では回復が著しく早いことからリン酸以外の成分が回復を促進することが考えられ，これについて検討した。炭素源およびエネルギー源としての，グルコース，クエン酸，窒素源としての，カザミノ酸，塩化アンモニウム，アラニン，無機塩である塩化マグネシウム，塩化ナトリウムは，単独添加では全く効果がなかった。しかし，リン酸カリウム，グルコース，カザミノ酸の三者の組合せ効果の検討から，Table 1-1 に示したように，リン酸カリウムとカザミノ酸の組合せが顕著な回復効果を示し，その 0.5時間後の回復率は，リン酸単独の場合の約 3 倍に達した。この カザミノ酸の回復促

Table 1-1. Effect of nutrients on the recovery of NaCl tolerance by *E. coli* cells heated at 52°C for 5 min in deionized water.

Nutrient	Relative recovery*	
	0.5 hr	2.5 hr
KH_2PO_4	13	100
Glucose	0.7	0.8
Casamino acids	1.9	2.0
KH_2PO_4 + glucose	10	71
KH_2PO_4 + casamino acids	40	138
Glucose + casamino acids	1.5	5.2

KH_2PO_4, glucose and casamino acids were dissolved in 0.02 M Tris-HCl buffer (pH 7.2) at a final concentration of 0.02 M, 0.02 M and 0.1 %, respectively. * Survivors on NAS after 2.5 hr of incubation in KH_2PO_4 - Tris-HCl buffer were calculated as 100.

進効果は，塩化アンモニウムやアラニンでも代替可能であること，また 0.05 Mのリン酸カリウムと 1 %カザミノ酸の組合せによる 30 分後の回復率は 94 % で，これは同時に行なった nutrient broth の 66 % を越える値であったことを認めている。グルコースなどの炭素源のほか，硫酸マグネシウム，ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド，アデノシン三リン酸（ ATP ）を，単独あるいはリン酸－カザミノ酸系に添加しても，有意の回復促進効果は見出せなかった。

Fig. 1-10 は，食塩耐性の回復に対する代謝阻害剤の影響を示したものである。種々の阻害剤を，リン酸カリウム（ 0.05 M ）－カザミノ酸（ 0.5 % ）系に加え，30 分間保温し，NA と NAS に平板培養した。その結果，RNA 合成阻害剤であるリファンピン（ 20 μg/ml ），酸化的リン酸化の脱共役剤である 2,4－ジニトロフェノール（ 5 x

10^{-4} M ），呼吸系阻害剤のシアン化カリウム（10^{-3} M ）は，ほぼ完全に食塩耐性の回復を抑制したのに対し，DNA 合成阻害剤であるナリジキシ酸（ 25 μg/ml ），蛋白合成阻害剤のクロラムフェニコール（ 100 μg/ml ），細胞壁合成阻害剤のペニシリン（ 200 U/ml ）はほとんど阻害しなかった。これらの薬剤濃度は，いずれも増殖の最少阻止

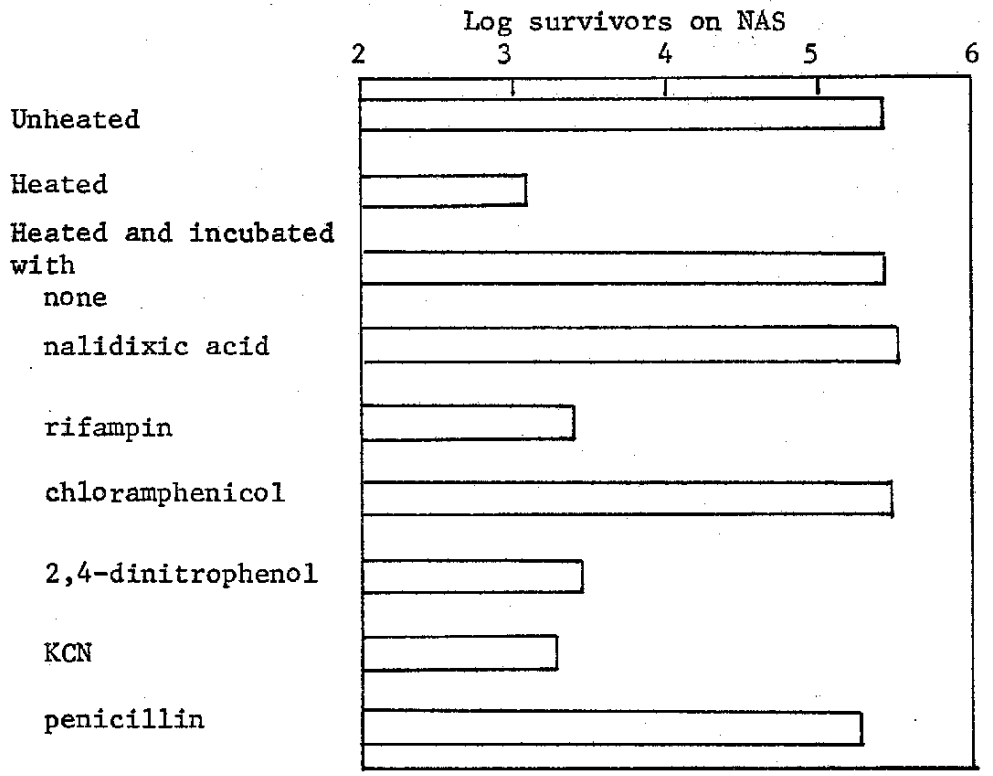

Fig. 1-10. Effect of metabolic inhibitors on the recovery of NaCl tolerance by *E. coli* cells heated at 52°C for 5 min in deionized water. Heated cells were incubated at 37°C for 30 min in 0.05 M phosphate buffer (pH 7.2) containing casamino acids (0.5 %) and inhibitor, nalidixic acid (25 μg/ml), rifampin (20 μg/ml), chloramphenicol (100 μg/ml), 2,4-dinitrophenol (5 x 10^{-4} M), KCN (10^{-3} M) or penicillin (200 U/ml) and plated on NA and NAS. The survivors on NA were not shown since they were only slightly affected by inhibitors.

濃度で使用したが，それぞれ，NA 上でのコロニー数には全くあるいはほとんど影響しないことを確認している。また，この阻害効果が寒天培地への薬剤のもちこみによることが考えられるが，既述の *C. utilis* の食塩耐性の回復に対するジニトロフェノールの作用についての実験（Fig. 1-6）と同様の方法で，この可能性を否定することができた。Fig. 1-10 の結果は，食塩耐性の回復には RNA 合成，ATP 合成が関与し，DNA 合成，蛋白合成，細胞壁合成は関与しないことを示唆している。

第4節 考察

C. utilis の熱死滅曲線（Fig. 1-1）は，加熱後期に非対数的死滅を示し，プラトーが生じた。この現象は，加熱に限らず種々の物理的処理を行なった微生物の多くに認められるもので，この要因については Stumbo [90] が詳しく論じている。著者[91] は別の一連の実験で，この有力な要因として，米虫ら[92] が細菌胞子について報告した加熱中の耐熱性変化を示唆した。加熱した細胞懸濁液の遠心分離後の上澄液は，260 nm に最大吸光をもつことを認め，この吸光は加熱時間とともに増加した（Fig. 1-2）。さらに，糖（Fig. 1-3）や蛋白質，リン酸の漏洩も認められること，加熱中，細胞懸濁液の OD_{660} はほとんど変化しないことを確認していることから，これらの漏洩は溶菌によるものではなく，細胞膜透過性の変化によるものと推察した。*C. utilis* について観察した細胞内物質の漏洩は，

50°Cで加熱した *E. coli* でもおこることを認めた。50°Cにおける *C. utilis* の RNA の低分子化（Fig. 1-4）は，細胞内物質の漏洩と同様，生菌数の低下と併行関係になかった。この RNA の分解は加熱の物理的な作用によるものではなく，細胞内の ribonuclease の活性化によるものと考えられており，[93,94] その詳細な機構については，分解に関与する ribonuclease の種類や局在性などについてさらに検討を要するところである。

C. utilis および *E. coli* を加熱処理すると，*S. aureus* [22] や *St. faecalis* [26]，*Sal. typhimurium* [29] について認められているように，食塩耐性が低下することがわかった（Fig. 1-5a，Fig. 1-7）。しかし，加熱後適当な条件で液体保持すると，低下した耐性が再び回復した（Fig. 1-5b，Fig. 1-9）。*E. coli* の食塩耐性の回復にはリン酸が有効であり，カザミノ酸はこれを著しく促進した（Table 1-1）。阻害剤を用いた実験から，*E. coli* の食塩耐性の回復には少なくとも RNA 合成と ATP 合成が関与するものと考えられ（Fig. 1-10），ATP 合成の関与については *C. utilis* でも示唆された（Fig. 1-6）。回復期間中の RNA 合成の関与については，*S. aureus*，*Sal. typhimurium* の加熱損傷に関する研究結果[22,29] と一致しているし，ATP 要求性については *Sal. typhimurium* でも報告されている。しかし，本研究ではその関与が否定的な蛋白合成については，*S. aureus* でも無関係と考えられているが，*Sal. typhimurium* ではその関与が報告されて

おり，この相違は菌種の差に基くものかも知れない。

第5節　要約

微生物の加熱損傷とその回復の機構について *C. utilis* と *E. coli* を用いて調べ，以下の結果を得た。

（1）*C. utilis* 細胞を 45°C ～ 60°C で加熱処理すると，生菌数の低下とともに，細胞内の各種物質が漏出することを認め，細胞膜透過性の損傷が示唆された。さらに，加熱によって RNA が低分子化することを明らかにした。

（2）また，*C. utilis* の半致死的条件での加熱（45°C，15 分）により，コロニー形成培地中の 7 %食塩に対する耐性が低下する事実を観察するとともに，この耐性は，加熱後リン酸緩衝液中，30°C で液体保持することにより，次第に回復することを認めた。

（3）*C. utilis* で認めた加熱による食塩耐性の低下は，52°C，5 分加熱処理した *E. coli* でも観察し，この耐性は，加熱後カザミノ酸を含むリン酸緩衝液（pH 7.2）中，37°C で保温することにより回復した。

（4）阻害剤を用いた実験から，*E. coli* の食塩耐性の回復には，RNA 合成および ATP 合成が関与し，DNA 合成，蛋白合成，細胞壁合成は関与しないことを示した。

第2章　ESCHERICHIA COLI の熱死滅に対する昇温プロセスの効果

第1節　緒言

微生物の熱死滅は，加熱中のみならず，加熱前，さらには加熱後においても様々な影響を受ける。[1,7,95-97] 例えば加熱前においては，培養温度，培養齢，生育培地など，加熱中では温度，時間はもちろん，水分活性，pH ，加熱培地成分など，加熱後は生菌数測定条件（コロニー形成培地，温度，pH など）が主なもので，これらについての報告はおびただしい。しかしながら，定温加熱処理に常に付随する非定温プロセス（加熱温度に到達するまでのプロセス）の影響についての研究はほとんど見当らない。

照井，[98] および米虫ら[92] は細菌胞子の非対数的な熱死滅曲線に着目し，これは加熱中の熱感性分子の感性が加熱歴によって変化するためと考えた。彼らは，この耐熱性変化のプロセスが，加熱前の比較的長時間の予備保温処理によってもおこることを示している。さらに，耐性変化のモデルをもとに熱死滅の速度論的解析を行なっているが，この感性分子の実体および熱耐性変化の機構については全く言及していない。

著者は，*E. coli* に対するマイクロ波の殺菌効果について検討中，一定温度での熱死滅が，急速加熱よりも緩慢加熱により著しく低下することを見出した。この事実は，実用面における熱殺菌プロセスの殺菌効率の点で注目すべき

示唆を与えるだけでなく，熱死滅機構究明への一つの手がかりとなりうるものと思われた。本章では，この *E. coli* の熱死滅に対する昇温プロセスの効果の要因を追求し，得られた成果を記述する。

第2節　実験材料および方法

供試菌　*E. coli*　K-12　を使用した。

培養および細胞懸濁液の調製　第1章に記述した方法に準じて通常，定常期細胞（16時間培養）を用い，一部の実験では対数期細胞（培養終了時の OD_{660} が0.2～0.3）も使用した。培地は既述の nutrient broth を主に用いたほか，M 9 最少培地（グルコース，0.2 %，硫酸マグネシウム，0.025 %，リン酸二ナトリウム，0.88 %，リン酸一カリウム，0.12 %，塩化アンモニウム，0.1 %，食塩，0.5 %）も用いた。集菌後の洗浄では，0.01 M 塩化マグネシウムを含む 0.05 M トリス塩酸緩衝液（pH 7.4）を使用し，2 回洗浄後，脱イオン水に懸濁した。集菌以降の操作は 0°Cで行ない，細胞懸濁液は 0°Cで約1時間放置した。

昇温，定温加熱および生菌数測定　0°C においた細胞懸濁液を 50°C に昇温する際，次の2つの方法のいずれかによって行なった。一つは希釈法で，50°C に予熱した適当量の脱イオン水を含む 100 ml 容フラスコに，全量 20 ml，所定の最終細胞濃度になるよう細胞懸濁液の一定量を加えた。この方法は，50°C に加熱する前に予備保温処

理する際にも用い，これらの希釈率は通常 1/20 （19 ml の脱イオン水に 1 ml の細胞懸濁液を添加）とした。他の一つの方法は非定温連続加熱法で，20 ml の細胞懸濁液を含む 100 ml 容フラスコを振とう恒温槽（タイヨーインキュベーター；大洋科学 M-1 N 型，アイラシェーカー；東京理化機械 SS8 型，あるいはモノマルシェーカー；大洋科学 NT 型）中でヒーターの容量を変化させることにより，連続的に昇温させるものである。この場合，50°C に到達すると同時にヒーター容量を調節し，定温加熱を開始した。0°C 以外の保温はすべて振とう下で行なった。昇温経過は，熱電対（英弘産業）で検出した温度を直流増幅器（三栄測器，6L5 型）に接続した記録計（東亜電波，EPR-22A ）で追跡した。この経過は非定温連続加熱法でほぼ直線であり，希釈法の場合も 50°C 近傍を除けば直線的であったことから，その勾配より昇温速度を算出した。希釈法では 49°C に達したときを加熱開始時間とした。生菌数の測定は才 1 章の方法に準じて行なった。

核酸の低分子分解　nutrient broth 中で生育した定常期細胞を予備保温あるいは加熱処理中，試料 3 ml をとり，Schmidt-Thannhauser-Schneider 法[99] によって RNA 区分を分画し，この区分の 260 nm 吸光を測定した。また，予め放射活性前駆体をとりこませた細胞を用いる次の方法も行なった。0.1 % カザミノ酸と 2′-デオキシアデノシン（250 μg/ml ），さらに 6 μCi/ml の ^{3}H-チミジン（19 Ci/mmole ）と 1 μCi/ml の ^{14}C-ウラシル（

18.4 Ci/mmole　　）を加えたM 9 培地中で対数期まで生育させ，洗浄細胞を加熱処理後，冷酸（トリクロル酢酸）可溶性区分の放射活性の増加を液体シンチレーションカウンター（ Beckman LS-250 ）で測定した。 1,4 ビス〔 2,5-フェニルオキサゾリル〕ベンゼン（ POPOP ），0.01 % と 2,5 - ジフェニルオキサゾール，0.6 % を溶解させたトルエン 10 ml を含むバイアルに，酸抽出試料0.2 ml とエタノール 3 ml を加え，放射活性の測定を行なった。

<u>DNA の一本鎖切断</u>　前項のように，6 μCi/ml の ^{3}H -チミジン（ 19 Ci/mmole ）で DNA を標識した対数期細胞（ ^{14}C -ウラシルは無添加）を調製した。この実験では，細胞濃度を予備保温時に約 10^{9}/ml ，50°C 加熱時に約 10^{8}/ml となる様にした。ショ糖密度勾配は Kato と Kondo の方法[100)]に準じて行なった。予めポリエチレンの遠心分離管（ 1.3 x 5.0 cm ，日立工機 5PE ）中に調製したアルカリショ糖密度勾配上に，0.05 M 食塩，0.005 M EDTA ，1 % ラウリル硫酸ナトリウムを含む 0.5 N水酸化ナトリウム溶液，0.1 ml をのせ，さらにその上に処理細胞を含む試料 0.1 ml をのせ，スウィングローター（ RPS - 40 - 259 ）を用いて 40,000 rpm ，45 分間，20°C で日立超遠心分離機 55P によって遠心分離した。分離後，遠心分離管の底に針で穴をあけ，液の表層から水圧をかけながら，4 滴ずつ円形沪紙（ Whatman ，No. 3 ，直径22 mm ）上に滴下して吸収させ，赤外線ランプで充分乾燥後，

5 % トリクロル酢酸（ 4°C ）で 2 回，さらにアセトン（4 °C）で 1 回洗浄した。再び乾燥後，既述のようにして放射活性を測定した。アルカリショ糖密度勾配は次のように調製した。それぞれ，0.1 N 水酸化ナトリウム，1 M 食塩，0.1 % EDTA ，0.1 % ラウリル硫酸ナトリウムを含む 5 %，20 % および 60 % のショ糖（ Sigma ）溶液（ pH 12.2 ）を調製し，まず遠心管に 60 % ショ糖溶液 0.2 ml を入れた。次いで，グラディエンター（ミツミ科学， SJ-1300 UD ）を用い，その上に 5～20 % のショ糖密度勾配（ 4.4 ml）を調製した。

<u>リポ多糖体の定量</u>　リポ多糖体を含む試料を酸加水分解後，含まれる 2-ケト-3-デオキシオクトン酸（KDO ）を，チオバルビツール酸を用いる Osborn らの方法[101] により，548 nm の波長で比色定量した。ここでは，加熱時の細胞濃度を約 10^{10}/ml とし，経時的に 3 ml を採取して 5,000 rpm，10分間遠心分離後，その上澄液を測定試料とした。

<u>ATP の定量</u>　細胞からの ATP の抽出は Fields と Luria[102] の方法に準じて行なった。予備保温あるいは加熱処理中，細胞試料 0.5 ml をとり，直ちに予め 100°C の湯浴中に保持した 4.5 ml の 0.1 M トリス塩酸緩衝液（ pH 7.4 ）を含む試験管に加え，10 分間加熱した。冷却後，5,000 rpm ，10 分遠心分離し，その上澄液を ATP 分析の試料とした。 ATP の細胞外への漏出を調べる実験では，ミリポアフィルター（ HAWP ，0.45 μ ）で試料の

3 ml を沪過し，沪液中の ATP を定量した。ATP の定量は液体シンチレーションカウンター（ Beckman LS-250）を用い，ルシフェリン－ルシフェラーゼ系による螢光の測定によった。[103] ホタルランタンエキス（FLE-50 ，Sigma）の調製粉末を脱イオン水に懸濁し，遠心分離（5,000rpm ，5 分）した上澄の酵素液 100 μl を，上述の試料 2 ml を含むバイアルに入れ，すばやく撹拌後，6 秒間螢光を測定した。測定条件は，Gain 10 ，Window 0 ～ 100 とした。

第3節 実験結果

1. 昇温プロセスの効果とその影響因子

脱イオン水中，50°C における *E. coli* の熱死滅は，定温加熱前の 0°C からの昇温プロセスによって影響を受け，希釈法（20 倍）による急速加熱の方が，非定温連続加熱法による緩慢加熱（昇温時間 50 分）の場合よりも生菌数低下が顕著であることを見出した（ Fig. 2-1 ）。この効果は，Table 2-1 に示したように，昇温速度にほぼ併行することがわかった。このような耐熱性の相違は，昇温速度を変化させるかわりに定温加熱前に非致死的温度で予備保温することによっても得られた。Fig. 2-2 に明らかなように，脱イオン水中，45°C 以下の各温度で 10 分間予備保温すると，その温度が高いほどその後の 50°C ，20 分の加熱による生菌数低下は少ない。これら熱死滅に対する昇温速度と予備保温温度の影響は本質的に同じ機構によるものと推察できるので，本研究においてはその実験の容易

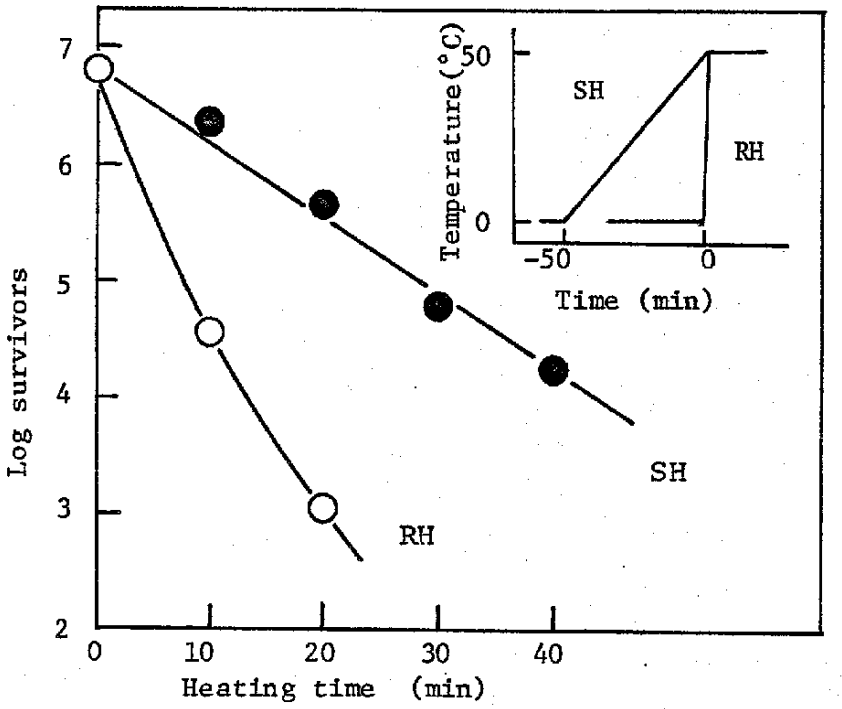

Fig. 2-1. Effect of temperature-elevating process on the thermal death of *E. coli* at 50°C in deionized water. Cells were heated rapidly by the dilution method (RH) or slowly by the non-isothermal bath method for 50 min (SH) from 0°C to 50°C. See Materials and Methods for these methods.

Table 2-1. Effect of temperature-elevation rate on the thermal death of *E. coli* at 50°C in deionized water.

Temperature-elevation rate (°C/min)	Thermal death rate (min^{-1})
1.0	0.240
2.1	0.284
5.0	0.349
27*	0.536
750*	0.793

* All samples were heated by the non-isothermal bath method except for these two for which the dilution method was used. Cell concentration during isothermal heating was 1.67×10^7 cells per ml of deionized water.

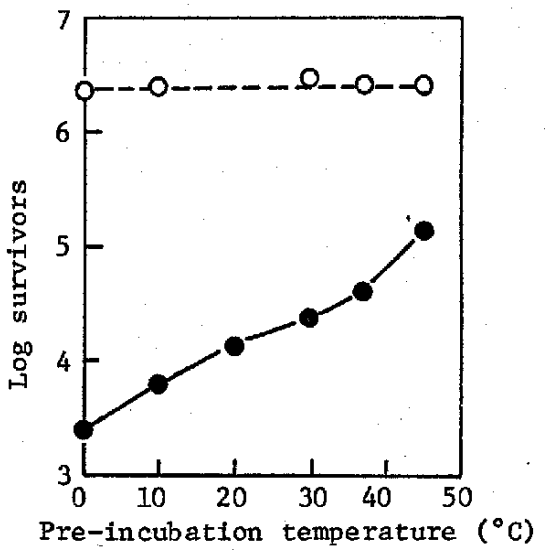

Fig. 2-2. Effect of pre-incubation temperature on the thermal death of *E. coli* in deionized water. Cells were pre-incubated at the indicated temperature for 10 min and heated at 50°C for 20 min. Symbols : ○, survivors of pre-incubated cells without subsequent isothermal heating ; ●, survivors of pre-incubated cells with isothermal heating. The final cell concentration was 4.3×10^6 cells per ml of deionized water.

さを考慮し，予備保温効果について検討を行なった。

Fig. 2-3 は 45°C における予備保温効果を示したもので，未処理（0°C においた）細胞の耐熱性はあまり変化しないが，45°C で予備保温した細胞では時間とともに耐熱性が上昇することを認めた。予備保温中の細胞懸濁液の pH はほぼ 5.5で一定であり，耐熱性の変動は pH の変化によるものではない。先の Table 2-1 および Fig. 2-3の結果から，この予備保温効果は加熱時の温度差（熱ショック）に基くものではなく，一種の生理学的な現象であると判断できる。

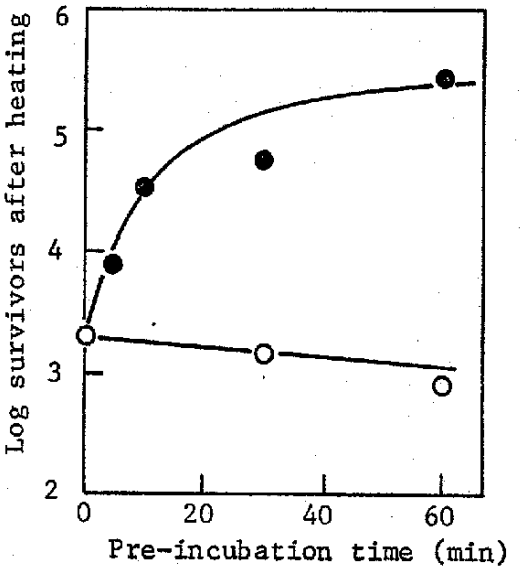

Fig. 2-3. Increase of thermal resistance of *E. coli* by prolonged pre-incubation at non-lethal temperatures. Cells were incubated at 0°C (○) or 45°C (●) and heated at 50°C for 20 min. Cell concentration during isothermal heating was 8.7 x 10^6 cells per ml of deionized water.

予備保温効果は，定常期細胞に限らず対数期細胞でも認められ，45°C 予備保温中に食塩，リン酸一カリウム，グルコース，グリセリン，ショ糖，カザミノ酸やペプトンを存在させても顕著な効果が認められた。また，M 9 最少培地で生育した細胞についても，nutrient broth 中で生育した細胞と同程度の効果を得ている。

2. 昇温プロセスの効果の要因

昇温プロセスにおける耐熱性上昇の機構について検討を行なった。まず，従来から細胞の主な加熱損傷部位として挙げられている RNA の低分子化，DNA 鎖切断および細膜透過性の変化について検討した。

まず RNA 分解について調べ，その結果を Fig. 2-4 に示した。 RNA は 45°C，30 分の予備保温処理により比較的少量（約 3 %）ではあるが低分子化をおこしており，これは図示したように，50°C での加熱によりさらに顕著となった。しかし，分解に対する予備保温の影響はなく，むしろこの処理によって多量分解する傾向にあった。 ^{14}C ーウラシルで RNA を標識した細胞を用い，加熱による酸可溶性区分への放射活性の増加をみた実験でも同じ結果を得た。 DNA の低分子化は ^{3}H ーチミジンを用いた実験より，予備保温，加熱期間中ともおこらないことを認めている。

次に，熱死滅の別の要因として提出されている DNA の一本鎖切断について調べた。^{3}H ーチミジンを含む最少培

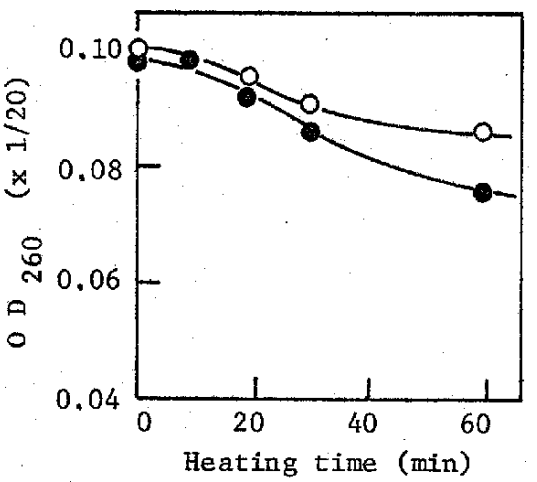

Fig. 2-4. Effect of pre-incubation on RNA degradation of *E. coli* cells heated at 50°C in deionized water. Symbols : ○, control (0°C) ; ●, pre-incubated at 45°C for 30 min.

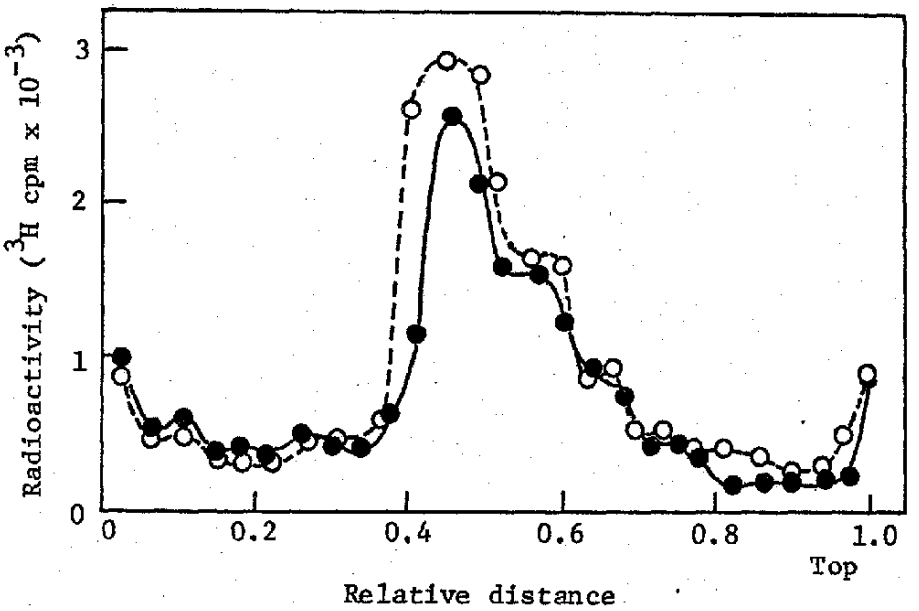

Fig. 2-5. Alkaline sucrose gradient sedimentation of DNA from *E. coli* cells heated at 50°C for 30 min in deionized water. Symbols : ○, unheated ; ●, heated without pre-incubation.

地で生育した *E. coli* の対数期細胞を用い，加熱処理後の DNA のアルカリショ糖密度勾配遠沈法による分画パターンを Fig. 2-5 に示した。図に示したように，99 % 以上の細胞がコロニー形成能を失う 50°C，30 分の加熱条件では，予備保温処理を行なわなかった細胞でさえ，DNA 鎖の切断を認めることができなかった。45°C，30 分の予備保温処理後，同条件で加熱した細胞の場合も，ほぼ同様の分画パターンを示し，少なくともこの実験で用いた方法では，予備保温による DNA 傷害の程度の相違はもちろん，傷害そのものについても検出することができなかった。

ところで，リポ多糖体はグラム陰性細菌の細胞外膜に存

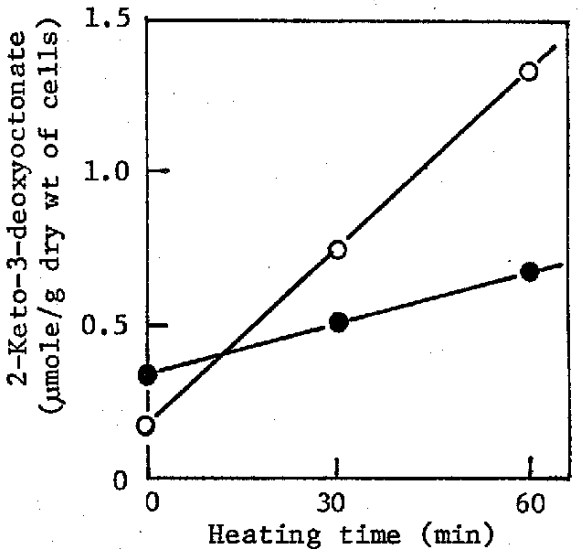

Fig. 2-6. Release of lipopolysaccharide from *E. coli* cells heated at 50°C in deionized water. Symbols : ○, control (0°C) ; ●, pre-incubated at 45°C for 30 min.

在し，物質の細胞膜透過性に重要な役割を演じていることが知られている。[104] そこで，予備保温による細胞膜の熱安定性変化の可能性を考え，その一つとしてリポ多糖体の漏出を調べた。 Fig. 2-6 は，*E. coli* の加熱処理によるリポ多糖体の漏洩経過を示したものであるが，その速度は，予備保温処理を行なわなかった細胞の方が，同処理を行った細胞よりも著しく大であることがわかった。この事実は，予備保温処理が細胞膜成分とリポ多糖体との相互作用に影響を及ぼすことを示唆している。

さらに，第1章で，*E. coli* の加熱損傷の回復には ATP 合成が関与することが示唆されたところから，細胞のエネルギーレベルの変化が耐熱性に影響する可能性も考えた。 Fig. 2-7 は， 45°C で予備保温中の *E. coli* の細胞内

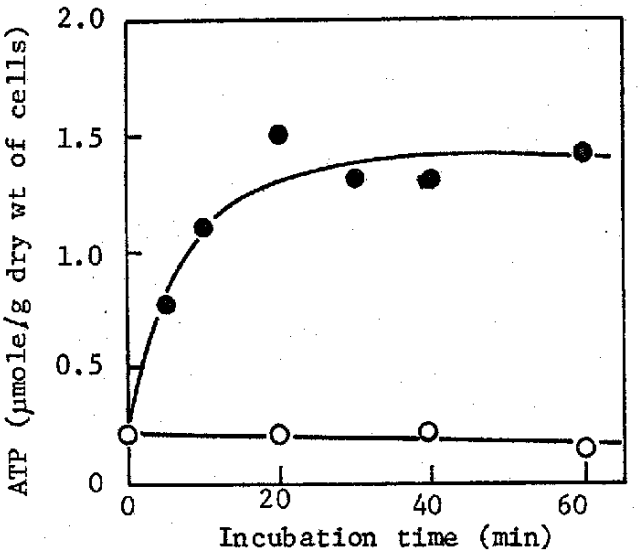

Fig. 2-7. Increase in intracellular ATP level of *E. coli* cells by pre-incubation at 45°C in deionized water. Symbols : ○, control (0°C) ; ●, pre-incubated at 45°C.

ATP レベルを調べたものである。その結果，興味深いことに ATP レベルは耐熱性の上昇（ Fig. 2-3 ）に併行して著しく上昇し，約 20 ～ 40 分で最大に達することが判明し

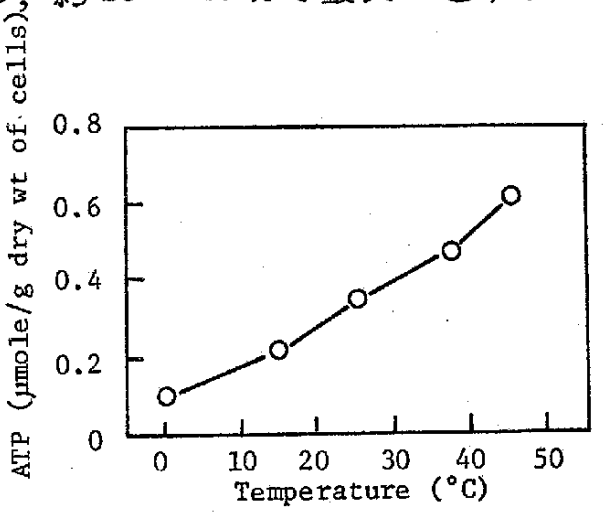

Fig. 2-9. Intracellular ATP level of *E. coli* cells after 30 min of incubation at various temperatures.

た。その値は実験により変動するが，通常，初発量の約 3～6倍であり，この間，細胞外への ATP の漏出はほとんど（1％以下）検出されなかった。この予備保温処理による ATP レベルの上昇は Fig. 2-8 に図示したように明らかにその温度に依存し，0°C～45°C の範囲内では高温ほど顕著であって，これは Fig. 2-2 に示した耐熱性の上昇の結果に対応する。Fig. 2-7で認められた細胞内 ATP レベルの上昇は，嫌気条件下あるいはシアン化カリウム（10^{-2} M）存在下の予備保温でも顕著であること，また エネルギー系阻害剤である 2,4－ジニトロフェノール（5 x 10^{-4} M）や塩化ナトリウム（10^{-2} M）は ATP レベルの上昇を抑制するとともに，耐熱性の上昇も阻害することを見出している。

以上の結果から，昇温プロセスの効果の要因の一つとし

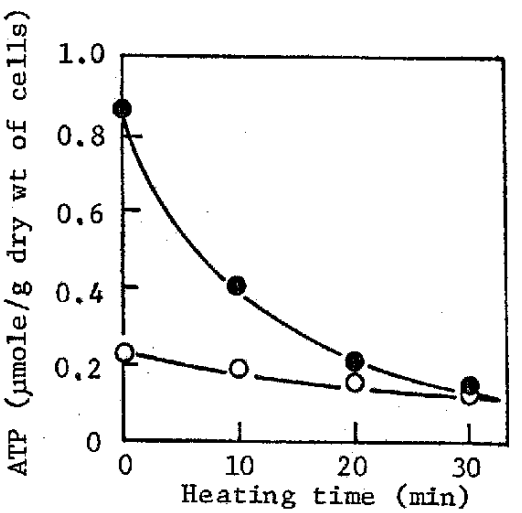

Fig. 2-9. Intracellular ATP level of *E. coli* cells heated at 50°C. Symbols : ○, control (0°C) ; ●, pre-incubated at 45°C for 20 min.

て細胞表層の変化および細胞内 ATP レベルの上昇が考えられる。そこでとくに後者に注目し，その挙動をさらに検討した。まず，予備保温処理による ATP レベルの上昇が加熱後の損傷修復能を高めることが推察されたので，加熱中の ATP レベルの変化を調べた。 Fig. 2-9に示したように，50°C での加熱によって細胞内 ATP レベルは低下することを認め，とくに 45°C で予備保温処理した細胞では初発量は多い（ Fig. 2-7 ）が急速に低下し，約20 分後には予備保温処理を行なわなかった細胞のそれと同レベルに達することが判明した。

さらに，加熱損傷細胞がその回復期に ATP を合成することを予測し，50°C ，20 分加熱後，30°C の 0.05 M リン酸緩衝液（ pH 7.0 ）中で細胞を振とう保温し，その

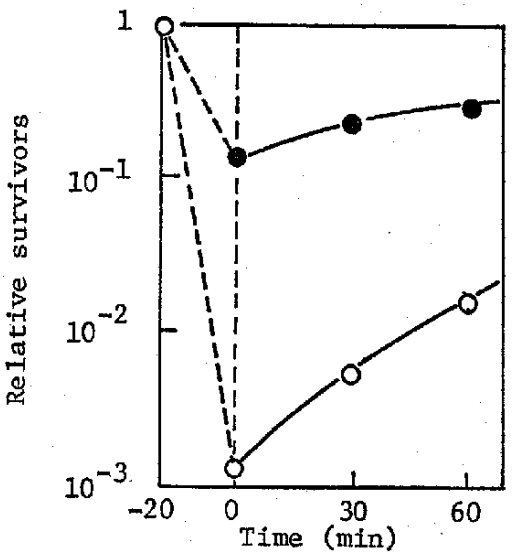

Fig. 2-10. Recovery of colony-forming ability of heated cells of *E. coli*. Cells were heated at 50°C for 20 min and incubated in 0.1 M phosphate buffer (pH 7.0) at 30°C. Symbols :○, control (0°C) ; ● , pre-incubated at 45°C for 20 min.

間のATP　含量の経時変化を追跡した。Fig. 2-10 に示したように，加熱後この保温によって細胞のコロニー形成能は，予備保温（45°C）処理細胞および未処理細胞とも次第に増加し，とくに前者の場合，加熱直後の 12 % から 1 時間後では 32 % に達した。このコロニー形成能の増加は，増殖最少阻止濃度のナリジキシ酸（25 μg/ml）によって阻害されないことを認めているので，増殖によるものではなく回復を示すものと考えられる。一方，その間のATP レベルは，Fig. 2-11 に明らかなように両細胞とも上昇し，初発量は加熱による低下（Fig. 2-9）のため同程度であるが，その速度は予備保温処理細胞の方が未処理細胞に比較し著しく大であった。

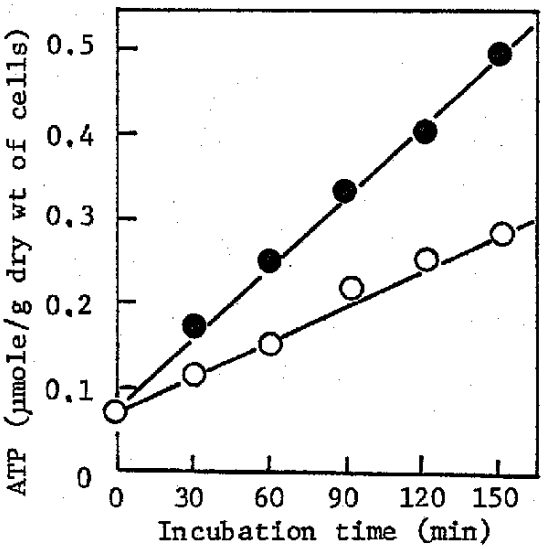

Fig. 2-11. Increase in intracellular ATP level of *E. coli* cells during post-heat treatment incubation at 30°C after after heating at 50°C for 20 min. Cells were heated and incubated as described in Fig. 2-10. Symbols : ○, control (0°C) ; ●, pre-incubated at 45°C for 20 min.

第4節　考察

50°C における *E. coli* の熱死滅は，加熱前の昇温プロセスにおける昇温速度（ Table 2-1 ）あるいは一定温度での予備保温処理（Fig. 2-2 ）に強く依存することを認めたが，これは微生物細胞の耐熱性にはその歴史性が影響を及ぼすことことを示す一つの例証で，熱死滅機構究明の点でも非常に興味深い現象である。このような昇温プロセスの効果は，*E. coli* 以外にも *S. aureus* および *C. utilis* でも認められた。一連の実験から，この効果が温度差のような物理的因子によるものではなく，細胞がこのプロセス中にみかけ上耐熱性を獲得したことによる生理学的な現象であることがわかった。予備保温効果が完全栄養欠乏条件下でも認められ，また増殖適温よりもさらに高温（ 45°C ）で顕著なことは注目すべき点である（ Fig. 2-2 ）。

予備保温処理による耐熱性の相違は，加熱中における RNA の酸可溶性区分への低分子化（ Fig. 2-4 ），および DNA の一本鎖切断（ Fig. 2-5 ）によって説明することができなかった。しかし，加熱中のリポ多糖体の溶出には予備保温の影響が認められた（ Fig. 2-6 ）ことから，昇温プロセス効果の要因の一つとして細胞表層の安定性変化が考えられる。さらに，45°C での予備保温処理中に細胞の ATP レベルが顕著に増大する事実を見出し（ Fig. 2-7 ），しかもその増加の経時変化や温度依存性が耐熱性のそれに併行することから，これも昇温プロセス効果の要因の一つと考えられた。

ATP は広く生体におけるエネルギー供給源として，細胞代謝の諸活性に必須の物質であることはよく知られている。しかも前章で述べたように，加熱損傷細胞の食塩耐性の回復には ATP 合成が必要なことが示唆されているところから，当然加熱損傷機構の研究においてもこの物質の挙動が注目されてしかるべきであるが，現在までその検討例は見当らない。 Strange ら[105]は，*A. aerogenes* の飢餓による死滅と ATP レベルの関係を調べ，飢餓処理の初期に一時的な ATP の増加を認め，しかもこの傾向は 20°C，37°C ，44°C の順に顕著であることを報告している。Fig. 2-8 に示した予備保温における ATP レベルの温度依存性の結果はこのことと一致している。この 45°C における ATP レベルの上昇は，Strange[105]らも推察しているように，予備保温中の RNA の分解に起因するものかも知れない。

予備保温処理によって上昇した細胞内の ATP レベルは，50°C での加熱処理により低下した（Fig. 2-9 ）。この間の細胞外への漏出は比較的少量（30 分後で初発の約 3 %）であること， ATP は 100°C，10 分の加熱でも極めて安定であることから，この ATP レベルの低下は酵素分解によるものと推察される。 Mg^{++}-ATPase は細胞膜の内側に結合し，酸化的リン酸化反応の共役因子として ATP 合成に関与するが，ミトコンドリアや細菌の膜系では加熱処理によって活性化することが知られており[106,107]，また加熱培地に Mg^{++} を添加すると，細胞内 ATP レベルの低下は著

しく促進されることを認めているところから，加熱中の ATP レベルの低下はこの酵素が関与しているのかも知れない。

予備保温処理細胞の ATP レベルは，50°C での加熱によって未処理細胞のそれよりも急速に低下したため，20 分後には両細胞のレベルは同程度になった（ Fig. 2-9 ）。この事実は，細胞のコロニー形成能と ATP レベルが直接相関性をもたないことを示している。加熱処理細胞を 30 °Cのリン酸緩衝液中で保温すると，コロニー形成能の回復とともにその ATP レベルは再び上昇し，その速度には予備保温処理による明らかな相違が認められた（ Fig. 2-10, Fig. 2-11 ）。この ATP レベルの上昇は，その合成と修復反応への利用との収支の結果と考えられるが，その上昇速度の差は，加熱による ATP 合成系の損傷程度に相違があったことを示唆するものと考えられる。

以上の結果から，昇温プロセスにおける耐熱性上昇の要因として，細胞表層の変化および ATP レベルの上昇が挙げられるが，詳細な機構については今後さらに検討を要する。

第5節　要約

脱イオン水中，50°C における *E. coli* の熱死滅は，加熱前の昇温プロセスにおける緩慢昇温あるいは 45°C 以下の一定温度での予備保温処理により著しく低下した。この効果の要因について調べ，以下の結果を得た。

（１） *E. coli* の熱死滅に対する予備保温処理の効果は温度差のような熱の物理的な作用によるものではなく，一種の生理学的な現象であることを明らかにした。

（２） 50°C での加熱中の RNA の低分子化および DNA の一本鎖切断には予備保温の効果が認められなかったが，細胞表層に存在するリポ多糖体の漏出に顕著な効果があり，45°C での予備保温処理細胞では未処理細胞に比較し，その漏洩速度が著大であることがわかった。

（３）予備保温処理中に細胞内の ATP レベルが上昇した。この上昇は 45°C以下の温度では高温ほど顕著であり，耐熱性の上昇に対応することを認めた。

（４）予備保温処理により上昇した細胞内 ATP レベルは 50°C での加熱期間中，急速に低下したが，この低下は酵素的分解によるものと考えられた。また加熱後 30°C のリン酸緩衝液中で保温すると，コロニー形成能の回復とともに ATP 合成がおこり，その速度は予備保温処理細胞の方が未処理細胞よりも大であった。

（５）得られた結果から，*E. coli* の熱死滅に対する昇温プロセスの効果の要因の一つとして，昇温プロセスにおける細胞表層の変化および ATP レベルの上昇が考えられた。

第3章　CANDIDA UTILIS に対する ソルビン酸の加熱併用効果

第1節　緒言

第1章および第2章で微生物の熱損傷機構について論じたが，その得られた知見をもとに抗菌薬剤の加熱併用効果について検討した。本章ではその最初のモデルとして，とくに真菌に対して比較的強い抗菌作用を有し，防腐剤として広く利用されているソルビン酸をとりあげ，酵母の *C. utilis* に対する加熱併用効果について検討した結果を述べる。

ソルビン酸は，1945 年，Gooding [108] によって食品防腐剤として優れた効果を有することが発見された薬剤で，現在では人体に対して最も安全といわれる（ラットで LD_{50} = 10.5 g/kg ）防腐剤である。その構造は Fig. 3-1 に示すような不飽和脂肪酸であり，熱に対し比較的安定で抗菌作用は酸性 pH で著しい。

ソルビン酸の抗菌作用機構については多くの報告があるが，未だ定説的なものはないのが現状である。Melnick ら [109] はカビによるソルビン酸の代謝的分解について調べ，その阻害作用が，脂肪酸代謝における中間代謝物の異常蓄積によって脱水素酵素が阻害されることによるという説を提出した。Whitaker [111] もチオール系酵素の阻害を報告しているが，York と Vaughn [112] は，*E. coli* ，*Ps. aeruginosa* および *S. cerevisiae* を対象とし，チオール系酵

素が阻害作用点としながらも，その阻害様式が 2,4-ジニトロフェノールに類似していることから酸化的リン酸化も阻害部位の一つであることを示唆した。このほか，エノラーゼとの拮抗阻害，[113] 酢酸との拮抗による Coenzyme A 結合 [114,115] などの説も提出されている。

熱死滅に対するソルビン酸の併用効果はすでに Robinson と Hills [61] によって示されており，また Lategan と Vaughn [55] によっても *Sal. typhimurium* を対象に顕著な効果が報告されている。芝崎と飯田 [116] も種々の酵母を対象に，この併用効果を認め，その影響因子について調べている。本研究では，ソルビン酸の加熱併用効果の要因を明らかにすることを目的として検討を行なった。

第2節　実験材料および方法

<u>供試菌</u>　*C. utilis* OUT 6020 を用いた。一部の実験では比較のため，*S. cerevisiae* OUT 7020，*E. coli* K-12，*B. subtilis* var. *niger* OUT 4380 も用いた。

<u>薬剤</u>　上野製薬のソルビン酸カリウムを使用した。さらに一部の実験では，2,4-ジニトロフェノール（和光純薬），ペンタクロロフェノール（半井化学），カルボニルシアナイド-m-クロロフェニルヒドラゾン（Sigma）を用い，その他の試薬は市販品を用いた。

<u>培養</u>　第1章に述べた方法によった。培地は Czapek-Dox培地にペプトンと酵母エキスをそれぞれ 0.25 % 添加したもの（CPY）を使用した。

加熱および薬剤処理　培養後，目的により次の二つの方法のいずれかによって加熱および薬剤処理を行なった。（1）死滅効果をみる場合。遠沈によって集菌し，生理食塩水で洗浄後，同溶液に懸濁した。予め沪過除菌し，所定濃度になるように調製したソルビン酸水溶液の 1 ml を，所定温度に加熱した 0.1 Mリン酸溶液（ pH 4.0 ）98 ml を含む 300 ml フラスコに加え，さらに先のように調製した細胞懸濁液 1 ml を添加し，一定時間毎に試料をとって以後の実験に供した。対照は，ソルビン酸を含まないリン酸溶液（ pH 4.0 ）99 ml に細胞懸濁液 1 ml を加えて加熱処理したもの，および 30°C のリン酸溶液にソルビン酸を添加したものである。（2）増殖および回復阻害を調べる場合。培養液の 2 ml を，20 ml の新しい液体培地を含む 100 ml 容フラスコに加えて培養を継続した。OD_{660} が 2 ～ 3 に達したとき，培養液にソルビン酸を添加（所定濃度になるよう高濃度の溶液を 0.1あるいは 0.2 ml 添加）し，直ちにフラスコを所定温度においた恒温槽中に移して加熱した。加熱終了後，30°C の恒温槽内にもどして培養を続け，その間経時的に試料を採取した。

生菌数の測定　第1章に述べた方法によった。

細胞内成分の漏洩　第1章に述べた方法に準じ，オルシノール反応陽性物質と予め細胞にとりこませた標識アミノ酸について調べた。後者の場合は，^{14}C －クロレラアミノ酸（ 30 μCi ）を含む CPY 培地中で 20 時間培養した細胞を用い，加熱処理中に漏出する放射活性を液体シン

チレーションカウンター（Nuclear-Chicago，6801型）を用いて測定した。

呼吸活性の測定　ワールブルグマノメーター（大洋科学，C-14 型）を用いて行なった。脱イオン水中で 30 °C，5 時間飢餓処理した細胞懸濁液 1 ml と基質溶液0.5 ml，0.1 Mリン酸緩衝液（pH 6.0）0.5 ml を容器の主室に，10 % KOH 溶液 0.25 ml を副室に，また側室にはソルビン酸あるいは他の薬剤の水溶液 0.25 ml を入れ，全量 2.5 ml として 30°C で振とう保温し，経時的に酸素の消費量を測定した。また嫌気条件で行なう場合は，容器の内部を窒素置換し炭酸ガスの発生量を経時的に測定した。この場合の反応液は，細胞懸濁液 1 ml，5 % グルコース溶液 0.5 ml，0.1 M リン酸緩衝液（pH 6.0）0.5 ml，ソルビン酸溶液 0.5 ml の全量 2.5 ml である。加熱処理細胞の呼吸回復をみる場合には，CPY 培地中で液体保持処理中の細胞懸濁液 2 ml をとって容器の主室に入れ，副室に KOH 溶液を 0.3 ml 入れた。

ATP の定量　第 2章に示した方法によった。

ソルビン酸の細胞内移行　^{3}H- 標識ソルビン酸を用いる方法によった。予め所定温度においた細胞懸濁液（約 10^{9}/ml）2 ml と 0.1 Mリン酸溶液（pH 4.0）5.6 ml を含む試験管に，非放射性ソルビン酸で 1 %溶液とした ^{3}H-ソルビン酸溶液の 0.4 ml（1.3 x 10^{6} cpm）を加えて零時間とし，以後経時的に 1 ml をとってミリポアフィルター（AAWP 02500，孔径 0.8 μ）によって沪過した。

さらに同じリン酸溶液 3 ml で 1 回洗浄後，フィルターを 100°C，10 分乾燥し，バイアルに入れて既述のように放射活性を測定した。^{3}H－ソルビン酸は才一化学薬品にて Wilzbaih 法により ^{3}H 置換し，水に溶解後濃縮乾固をくり返して不安定な ^{3}H を除去したものを用いた（比放射能 50 μCi/mg ）。このものは薄層クロマトグラフィー（キーゼルゲル，展開溶媒，n－ブタノール：酢酸：水，4：1：2 ）でほぼ単一のピーク（ Rf = 0.80 ）を与えた。

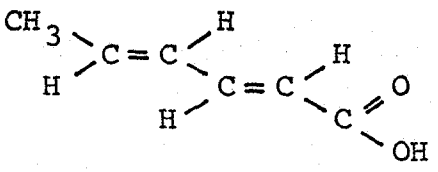

Fig. 3-1. Structure of sorbic acid

才3節 実験結果

1. ソルビン酸の抗菌作用機構

まず，ソルビン酸の抗菌作用機構に関する知見を得るため検討を行なった。 *C. utilis* の増殖に対するソルビン酸の阻害効果をみたところ，薬剤を培養開始時に添加した場合，0.3 % 以上の濃度でほぼ完全に増殖を抑制することがわかった。これを Fig. 3-2 に示した。この濃度では，*B. subtilis* var. *niger* ，*E. coli* ，*S. cerevisiae* の増殖も認められなかった。次に，*C. utilis* に対するソルビン酸の作用に及ぼす増殖培地中の炭素源の影響を調べたところ，

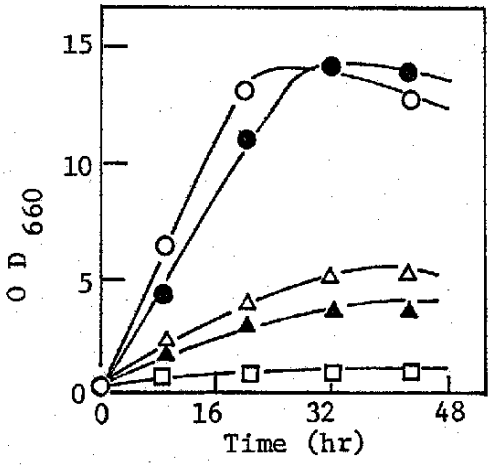

Fig. 3-2. Inhibition by sorbic acid of the growth of *C. utilis* in CPY broth. Symbols : ○, 0 %; ●, 0.01 %; △, 0.05 %; ▲, 0.1 %; □, 0.3 %.

Table 3-1 に明らかなように，0.03 % のソルビン酸濃

Table 3-1. Effect of carbon source on the growth inhibition of *C. utilis* by sorbic acid.

Carbon source*	Sorbic acid (%)	Inhibition (%)
Sucrose	0.03	10
	0.1	36
Glucose	0.03	12
	0.1	38
Acetate	0.03	5.4
	0.1	6.0
Citrate	0.03	66
	0.1	100
Succinate	0.03	67
	0.1	100

* 0.3 %, in Czapek-Dox medium minus sucrose
Generation times for each carbon source in the absence of sorbic acid were 91, 98, 120, 164 and 173 min, respectively.

度での増殖阻害率はショ糖，グルコース，酢酸の場合，それぞれ，10 %，12 %，5.4 %と比較的低いのに対し，コハク酸，クエン酸ではそれぞれ，67 %，66 % の高い値を示した。

またソルビン酸は，0.1 %の濃度で *C. utilis* の内生呼吸を著しく促進することを認め，このような作用は酸化的リン酸化における脱共役剤として知られる 2,4－ジニトロフェノールやペンタクロロフェノールについても認められた。この結果を Fig. 3-3 に示した。ソルビン酸の呼吸促進効果はグルコース酸化についても顕著であったことから，ソルビン酸の脱共役作用の可能性が考えられる。このような効果は *E. coli* についても認めている。さらにグルコー

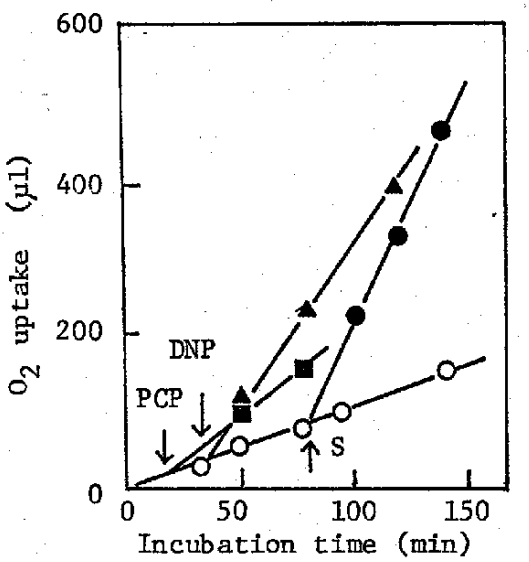

Fig. 3-3. Effect of sorbic acid on the endogenous respiration by *C. utilis* at 30°C.Symbols : ○, endogenous ; ●, sorbic acid (0.1 %) added ; ▲, 2,4-dinitrophenol (5 x 10^{-4} M) added ; ■, pentachlorophenol (10^{-5} M) added.

スの嫌気代謝に対する作用を調べたところ，*S. cerevisiae* の炭酸ガス発生の阻害率は 0.2 %のソルビン酸でも約 33 %であり，*C. utilis* に対しては0.1 %の濃度でほとんど阻害を示さなかった。

ソルビン酸の酸化的リン酸化に対する阻害作用が示唆されたので，好気条件下の ATP 合成に対する影響を調べた。Table 3-2 はコハク酸酸化時の ATP レベルを示したもので，ソルビン酸濃度の増加とともに細胞の ATP レベルの上昇が抑制され，0.1 % の濃度では初発量と同レベルであることがわかった。

Table 3-2. Effect of sorbic acid on the increase in ATP level of *C. utilis* cells by succinate oxidation.

Sorbic acid (%)	ATP* (μ mole/g dry wt of cells)
0	30
0.05	9.2
0.1	4.1
0.2	3.9

Cells were incubated with or without sorbic acid at 30°C for 20 min in 0.1 M phosphate solution (pH 4.0) containing sodium succinate at a concentration of 50 mM.
* Initial value was 4.1.

2. ソルビン酸の加熱併用効果の要因

Fig. 3-4 は，*C. utilis* に対する加熱とソルビン酸の併用効果を示したものである。50°C における熱死滅は，加熱培地の 0.1 Mリン酸溶液（ pH 4.0 ）中に含まれる 0.1 %のソルビン酸によって顕著に促進されることがわかっ

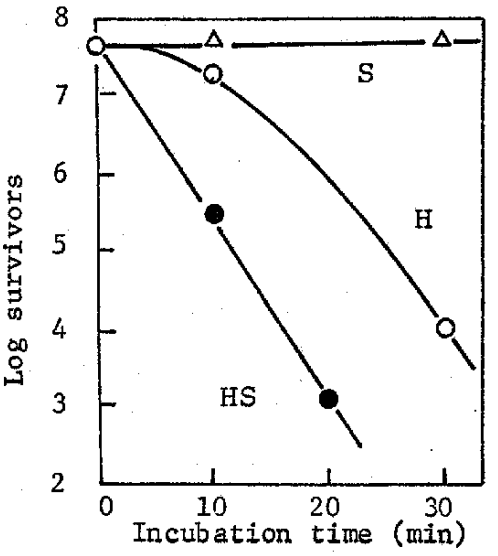

Fig. 3-4. Enhancing effect of sorbic acid on the thermal death of *C. utilis* at 50°C in 0.1 M phosphate solution at pH 4.0. Symbols : ○, heated (H) ; △, sorbic acid (0.1 %) added (S) ; ●, heated with sorbic acid (0.1 %) (HS).

た。このような併用効果は液体培地中での増殖遅延現象としても見出された。*C. utilis* の対数期細胞の培養液に，0.005 % の低濃度ソルビン酸を添加後直ちにほとんど死滅をおこさない 45°C，15 分の比較的温和な条件で加熱し，その後の増殖を追跡した。Fig. 3-5 に示したように，ソルビン酸単独処理細胞では若干の増殖速度の低下がみられ，加熱単独処理細胞についても約 2 時間の増殖遅れが認められるが，これらを併用処理した細胞では増殖の遅れが約 6 時間にも及んだ。しかしその増殖速度は，加熱単独処理細胞と同様に対照の未処理細胞のそれにほぼ等しいものであった。

Table 3-3 は，加熱処理細胞の増殖遅延に対するソル

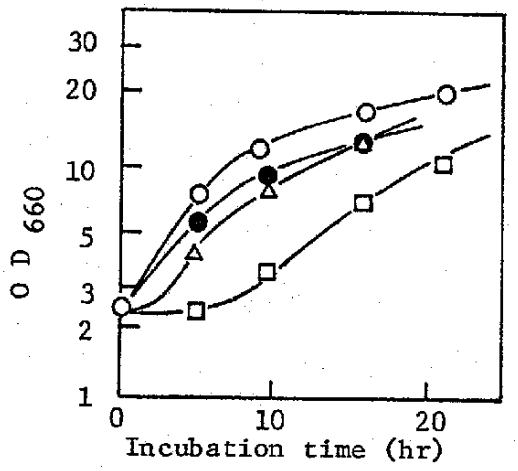

Fig. 3-5. Growth delay of *C. utilis* cells heated with or without sorbic acid in CPY broth. Cells were grown to logarithmic phase. Sorbic acid (0.005 %) was added to the culture and cells were heated at 45°C for 15 min and then incubated at 30°C. Symbols : ○, control ; ●, sorbic acid added ; △, heated without sorbic acid ; □, heated with sorbic acid.

Table 3-3. Effect of delayed addition of sorbic acid on growth delay of heated cells of *C. utilis*.

Addition time (min)	Growth delay* (hr)
0	4.0
20	2.8
60	1.6
120	0.9

Cells were grown to logarithmic phase in CPY broth, heated at 45°C for 15 min, and then incubated at 30°C. Sorbic acid (0.005 %) was added at the indicated time of incubation at 30°C after heating.
* Subtracted the delayed time (1.9 hr) of cells heated without sorbic acid.

ビン酸の添加時期の影響を示したもので，加熱後ソルビン酸の添加が遅れるほど増殖遅延時間は短縮されることが明

らかである。

ところで，*C. utilis* を CPY 培地中，30°C で初発接種菌数を 1 ml あたりそれぞれ 10^7，10^6，10^5，10^4 として培養した場合，一定濁度に到達する時間は接種菌数の1対数目盛の低下につき約 4.0 ～ 4.5 時間の一定時間ごとに増加することを認めた。そこで，この関係から得られる初発菌数と平板培養によるコロニー形成菌数を，50°C，10 分加熱処理した細胞について比較すると，後者の菌数は初発の 1/10 以内であるのに対し，液体培地での増殖遅延時間から求めた生菌数は 1/100 以下であることがわかった。この傾向はソルビン酸を併用処理した細胞では一層顕著であった。この結果から，加熱処理細胞の少なくとも一部は液体培地中で損傷の回復を行なうこと，そして加熱時に添加したソルビン酸は損傷の拡大あるいは回復の抑制をおこすことが推定できる。そこで次に，加熱時あるいは加熱後保温時のいずれか一方にのみソルビン酸を存在させて増殖の遅延に対する効果を調べ，その結果を Table 3-4 に示した。加熱時にのみ存在させる場合は室温での遠心分離によって細胞外液のソルビン酸を除いた。表に示したように，増殖の遅れ時間は加熱後保温存在の方が大であることから，ソルビン酸は細胞の熱損傷の拡大よりも主にその修復を阻害することが考えられた。

Fig. 3-6 は，0.1 % のソルビン酸存在下に 50°C で加熱した *C. utilis* 細胞からのオルシノール反応陽性物質の漏洩経過を示したもので，20 分後の漏出量は細胞内全量

Table 3-4. Effect of sorbic acid during heating or recovery period on the growth delay of heated cells of *C. utilis*.

Treatment I		Treatment II	Growth delay
Cells	Sorbic acid	Sorbic acid	(hr)
Unheated	-	-	7
	-	+	6
Unheated	+	-	11
	+	+	7
Heated	-	-	11
	-	+	28
Heated	+	-	19
	+	+	34

Cells were heated at 45°C for 15 min in 0.1 M phosphate solution (pH 4.0) with or without 0.005 % sorbic acid (Treatment I), centrifuged to remove extracellular sorbic acid, resuspended in fresh phosphate solution (pH 4.0) and then inoculated in CPY broth with or without 0.005 % sorbic acid (Treatment II). Symbols : -, absent ; +, present.

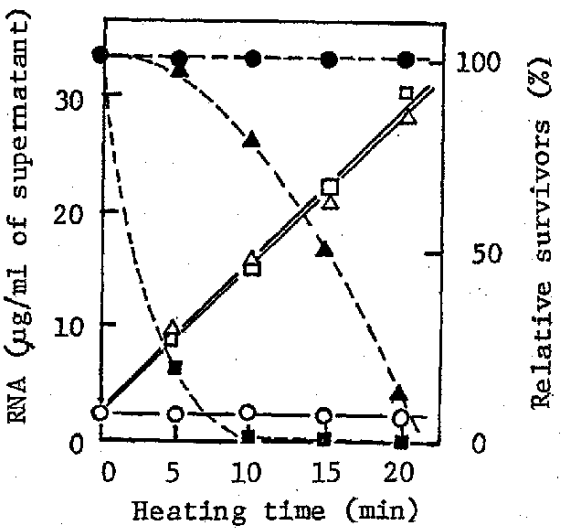

Fig. 3-6. Effect of sorbic acid on the leakage of intracellular orcinol-positive materials from *C. utilis* cells heated at 50°C. Cells were incubated at 30°C(circle) or heated with (square) or without (triangle) 0.1 % sorbic acid in 0.1 M phosphate solution (pH 4.0). Open symbols , RNA ; closed symbols , relative survivors.

の約 5 %である。図に明らかなように，ソルビン酸は加熱による細胞内オルシノール反応陽性物質の漏洩をほとんど促進しないことがわかった。同様の結果が，予め細胞にとりこませた ^{14}C-標識アミノ酸の 55°C での漏洩についても得られ，0.1 % のソルビン酸は全く促進効果を示さなかった。さらに 55°C での細胞内 RNA の低分子化も，同濃度のソルビン酸によって増大しないことを認めている。

ソルビン酸の抗菌作用は薬剤分子の細胞内移行に起因するので，その加熱併用効果が加熱処理中の薬剤の細胞内移行の増大による可能性が考えられる。そこで，^{3}H-標識のソルビン酸を用いてこの点を検討し，Fig. 3-7 に結果を示した。30°C，20 分間，^{3}H ーソルビン酸存在下に保

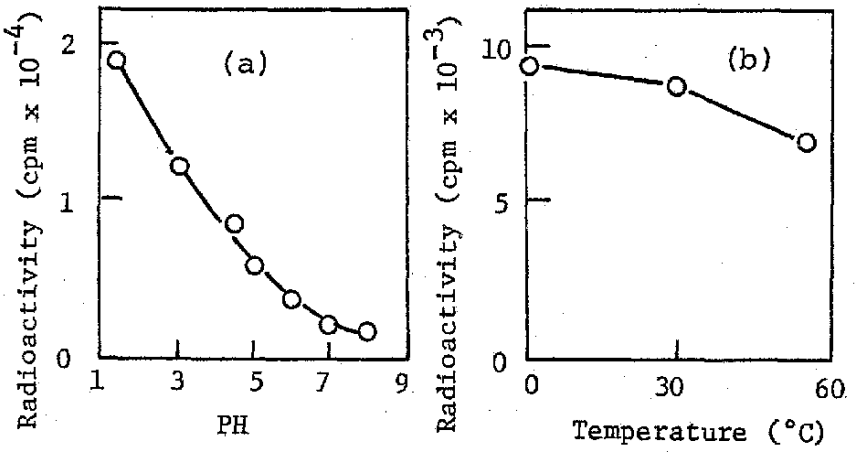

Fig. 3-7. Uptake of ^{3}H-sorbic acid by *C. utilis* cells. (a) PH dependence of the uptake after 20 min of incubation at 30°C in 0.1 M KCl-HCl buffer (pH1-3) or 0.1 M phosphate buffer (pH 4-8). (b) Effect of temperature on the uptake after 0.5 min of incubation in 0.1 M phosphate solution (pH 4.0).

温後の細胞区分の放射活性は pH の低下につれて増大した。さらにその温度依存性をみたところ，移行量は加熱によって増加せず，55°C では 30°C よりも逆に若干低下した。この結果から，加熱による薬剤分子の細胞内移行の促進は考えにくい。

前項においてソルビン酸の脱共役剤としての作用が示唆されたので，次に細胞の損傷修復機能に対する効果を調べた。Table 3-5 は，細胞の ATP レベルに及ぼすソルビン酸および脱共役剤の影響を調べた結果で，加熱単独処理でも ATP 含量は低下するが，ソルビン酸はこの低下をさらに促進した。このような効果は脱共役剤である 2,4-ジニトロフェノール，カルボニルシアナイド-m-クロロフェニルヒドラゾンについても明らかであった。さらに表に

Table 3-5. Effect of sorbic acid and uncouplers on the viability and the ATP level of heated cells of *C. utilis*.

Treatment	Chemical agent	Viability (%)	ATP (%)
None	None	100	100
Heated at 50°C for 10 min	None	22	13
	Sorbic acid, 0.001 %	12	11
	Sorbic acid, 0.005 %	5.1	7.9
	Sorbic acid, 0.01 %	0.72	6.5
	Sorbic acid, 0.05 %	0.17	2.1
Heated at 45°C for 15 min	None	68	72
	Sorbic acid, 0.05 %	0.22	2.8
	2,4-Dinitrophenol, 2 x 10^{-4}M	0.0033	0.26
	Carbonylcyanide-m-chlorophenylhydrazone, 1 x 10^{-6}M	25	36

Cells were heated at 50°C for 10 min or 45°C for 15 min with or without chemical agent in 0.1 M phosphate solution (pH 4.0). ATP content of unheated cells was 2.5 μ mole/g dry wt of cells.

認められるように，ソルビン酸の熱死滅促進作用は脱共役剤でもみられ，この作用は ATP レベルの低下促進作用と対応することがわかった。また，45°C ，15 分加熱処理後，30°C の CPY 培地中で保温したときの細胞の呼吸活性の回復は，Fig. 3-8 に示したように，加熱単独処理細胞では約 1 時間以降次第に顕著となったが，ソルビン酸（0.005 %）併用処理細胞では約 5.5 時間の間活性の上昇はほとんど認められなかった。

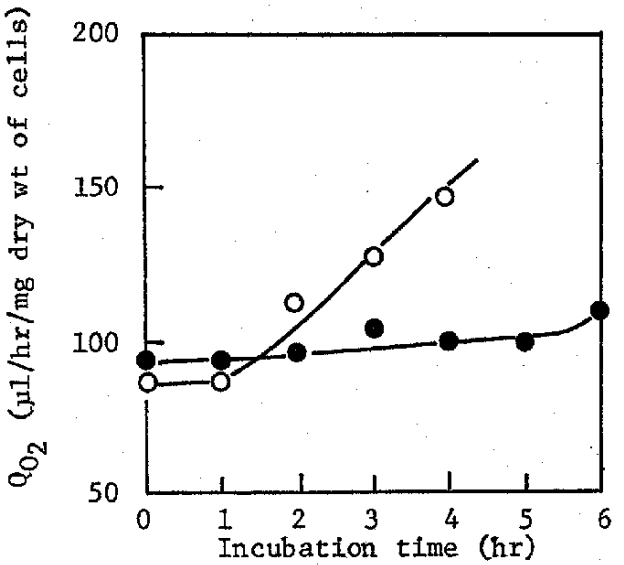

Fig. 3-8. Effect of sorbic acid on the oxygen uptake of heated cells of *C. utilis* during post-heat treatment incubation in CPY broth. Cells were heated at 45°C for 15 min in CPY broth with (●) or without (○) 0.005 % sorbic acid and incubated at 30°C in the same medium. The value of Q_{O_2} for unheated cells was 229 µl per hr per mg dry wt of cells.

才4節 考察

ソルビン酸はほとんど殺菌作用を示さないが，広範囲の

微生物に静菌作用を有することが知られている。種々の炭素源を基質として培養した *C. utilis* に対するソルビン酸の増殖阻害作用を調べた結果（ Table 3-1 ）から，シュ糖，グルコース，酢酸中では抗菌力は弱いがトリカルボン酸回路の有機酸では高い阻害率を示すことがわかった。Azukas ら[113]は，ソルビン酸の阻害部位として解糖系のエノラーゼを挙げ，Harada ら[115]は，ソルビン酸が酢酸と拮抗して Coenzyme A と結合し，ソルビル - Coenzyme A を形成するものと考えているが，本研究で得られた結果は呼吸系に直接連関した基質の場合に顕著な阻害が認められる点で，York と Vaughn[112] が指摘した酸化的リン酸化系の機能障害を示唆する一証左と思われる。

C. utilis の好気条件下での内生呼吸およびグルコース酸化が，脱共役剤である 2,4 - ジニトロフェノールやペンタクロロフェノールと同様，ソルビン酸によって著しく促進される事実（ Fig. 3-3 ）は，ソルビン酸の脱共役作用を示唆するものである。なお，ソルビン酸分子の完全代謝は認められなかった。ソルビン酸はコハク酸酸化時の ATP 合成を抑制した（ Table 3-2 ）。さらに，非栄養条件下で 30°C，30 分間放置した細胞の ATP レベルも，0.1 % のソルビン酸により 22 % 低下することも認めている。これらの結果は，脱共役剤の作用の一つであるエネルギー変換系の Mg^{++}-ATPase の活性化[117]によるものと推察される。

ソルビン酸存在下に *C. utilis* 細胞を加熱すると，コロ

ニーカウントによる生菌数の低下の増大（Fig- 3-4 ）および加熱後栄養培地中での振とう保温における増殖の遅延促進（Fig. 3-5 ）がおこった。このようなソルビン酸の加熱併用効果は，*Ps. aeruginosa* ，*Ser. marcescens* ，*A. aerogenes* ，*E. coli* などの細菌についても観察している。加熱時および回復時のソルビン酸存在による増殖遅延時間の比較検討結果（Table 3-4 ）およびソルビン酸が加熱中の細胞内物質の漏洩（Fig. 3-6 ）や RNA の低分子化を促進しないことから，ソルビン酸は加熱中の損傷拡大よりも主に回復機能の抑制をもたらすものと推定された。

脱共役剤に類似したソルビン酸の作用は 50°C においても現われ，加熱による細胞内 ATP レベルの低下をさらに増大させた（Table 3-5 ）。また，加熱中に若干検出されるコハク酸酸化活性も，0.1 % のソルビン酸により約2倍に促進されることも認めている。才 2章で *E. coli* について認めた加熱による ATP レベルの低下は *C. utilis* でもみられたが，ソルビン酸によるその促進は Mg^{++}-ATPase の活性化がさらに高められた結果かも知れない。この作用は，脱共役剤である 2,4 ー ジニトロフェノールおよびカルボニルシアナイドー m ークロロフェニルヒドラゾンについても観察するとともに，これらの薬剤の熱死滅促進効果と ATP レベル低下の促進効果は併行関係にあること（Table 3-5 ），また，加熱後 30°C の液体培地中での保温による呼吸活性の回復は，ソルビン酸併用処理細胞では加熱単独処理細胞よりも著しく遅れること（Fig. 3-8 ），

そして脱共役剤の直接の作用は化学浸透説[118]によれば，そのプロトン伝導体としての作用による膜の高エネルギー状態の消滅にある[106,117]とされていることから，ソルビン酸の加熱併用効果の主な要因は，エネルギー変換機能の傷害に起因する細胞の回復抑制にあるものと考えられる。

ソルビン酸の細胞内への移行は極めて早く，0°C でもおこり，移行量は細胞懸濁液の pH によって異なることから，単純拡散によって細胞内へ移行するものと考えられる。培地の pH の低下は移行量の増加をもたらすが，これは薬剤の非解離分子のみが細胞内へ移行するためであろう。[119] pH 4.0 での細胞内移行は 55°C での加熱によっても促進されなかったことから，ソルビン酸の加熱併用効果は次章に述べるタイロシンの加熱併用効果と異なり，加熱による細胞内移行量の増加によるものではない。

第5節　要約

薬剤の加熱併用効果の第1のモデルとして，酸性食品で問題となる酵母，*C. utilis* を対象に，食品防腐剤であるソルビン酸の効果を検討し，以下の結果を得た。

（1）まず，ソルビン酸の抗菌作用機構を調べ，酵母細胞の内生呼吸および基質酸化の促進，また ATP 合成の抑制を認めたことから，酸化的リン酸化がソルビン酸の一次的作用部位と考え，その脱共役作用を示唆した。

（2）50°C における *C. utilis* の生菌数低下および処理細胞の液体培地における増殖遅延について，ソルビン酸

の顕著な加熱併用効果を観察した。

（３）ソルビン酸は，加熱中の細胞内物質の漏洩やRNAの分解を促進しないが，加熱による細胞内 ATP レベルの低下を促進した。また，加熱処理細胞の呼吸活性の回復はソルビン酸併用により著しく遅れることがわかった。

（４）ソルビン酸の細胞内移行は加熱により増大しないことを明らかにした。

（５）得られた結果から，ソルビン酸の加熱併用効果の主要因は，エネルギー変換系の傷害に基く加熱損傷細胞の回復抑制にあると推察した。

第4章　ESCHERICHIA COLI に対する タイロシンの加熱併用効果

第1節　緒言

タイロシンは *Streptomyces fradiae* の生産するマクロライド系抗生物質で，その理化学的および生物学的性状については芝崎の総説[120]がある。Bacillus，Clostridium などのグラム陽性細菌に対しては強力な抗菌作用を有しているが，*E. coli* などのグラム陰性細菌に対する作用は極めて弱いことが知られている。この物質の毒性は極めて低く，LD_{50} は 5400 mg/kg（ヒナ，経口）であるところから，我国，カナダ，スウェーデンなどで食品防腐剤としての利用が検討されてきたが実用化には至らなかった。その作用機構については，Mao ら[121]，Suzuki ら[122]，Kageyama ら[123]によって調べられ，リボソームとの結合によってそのメッセンジャー RNA およびアミノアシル転移 RNA との複合体形成を阻害することが明らかにされている。

本章では，本来タイロシンに耐性なグラム陰性菌であり，汚染指標菌として知られる *E. coli* を対象に，薬剤の加熱併用効果の第2のモデルとしてこの抗生物質をとりあげた。

第2節　実験材料および方法

<u>供試菌</u>　*E. coli* K-12 を用いた。また一部の実験では比較のため，*B. subtilis* PCI219，*C. utilis* OUT 6020 も用いた。

薬剤　タイロシンは乳酸塩として Eli & Lilly 社のものを使用した。一部の実験では比較のため，エリスロマイシン（Sigma），クロラムフェニコール（三共），硫酸ジヒドロストレプトマイシン，テトラサイクリン（以上武田薬品）も用いた。このほか，エチレンジアミン4酢酸ナトリウム（EDTA，半井化学）を用い，その他の試薬は市販品を使用した。

培養　*E. coli* を nutrient broth（ポリペプトン 1 %，肉エキス 0.5 %，酵母エキス 0.5 %，塩化ナトリウム 0.5 %，pH 7.0）あるいは Sinskey と Silverman[124] の最少培地（クエン酸ナトリウム 0.5 %，硫酸アンモニウム 0.5 %，硫酸マグネシウム 0.1 %，リン酸第一カリウム 0.2 %，塩化ナトリウム 0.1 %，グリセリン 0.2 %，pH 7.0）の 20 ml を含む 100 ml 容フラスコに一白金耳接種し，37°C でそれぞれ，16 時間および 40 時間振とう培養した。この培養液を必要量の新しい培地に 7.5 %植菌し，これを，殺菌した 100 ml 容フラスコに 20 ml ずつ分注後，一斉に培養を開始した（初発 OD_{660} は約 0.05 で，各フラスコ内の培養液の濁度差は ± 0.002 以内であった）。一部の実験では，ペプトン－グルコース－酵母エキス培地（それぞれ，1，1，0.5 %，pH 7.0）も用いた。また酵母の培養は前章に述べた方法に準じた。

加熱および薬剤処理　上述の培養によって細胞が初期対数増殖期（OD_{660} で 0.10 ～ 0.15）に達したとき，薬剤を添加し，直ちに加熱した。薬剤はその水溶液を所定

濃度になるよう少量（通常 0.1 ml ）加えた。また加熱は，培養液のまま，フラスコを所定温度の振とう恒温槽中に移して行なった。加熱条件は主として 52°C ，5 分とした。加熱後直ちにフラスコを 37°C の振とう恒温槽内にもどし，そのまま培養を続け，経時的に試料をとった。増殖は OD 660 で追跡した。

EDTA 処理　Leive の方法[125]に準じた。対数期細胞を 5,000 rpm, 10 分間遠心分離して集菌し，菌体を 0.1 M トリス塩酸緩衝液（ pH 7.2 ）で 1 回洗浄後，2 つの区分（それぞれ 10 ml）にわけた。その各々を，一方は EDTA（最終濃度 2×10^{-4} M ）を溶解させた同緩衝液 10 ml を含む 100 ml 容フラスコに，他方はこれを含まない緩衝液 10 ml を入れた同容量のフラスコに加え，室温で 2 分間振とうした。そして，この 2 ml を nutrient broth 18 ml を含む 100 ml 容フラスコに加えて EDTA 処理を停止させた後，37°C で培養した。この条件での EDTA 処理は細胞の死滅をおこさなかった。

^{3}H-標識タイロシンの細胞内移行　nutrient broth（ 20 ml ）中で対数増殖期（ OD_{660} で約 0.3）にある細胞を含む 2 本のフラスコに，^{3}H ー タイロシン溶液 0.2 ml（ 3×10^{5} cpm ）と非放射性タイロシン 0.2 ml を，最終濃度 10 ug/ml になるように加え，それぞれ 37°C および 52°C で振とう保温した。経時的に 3 ml をとり，ミリポアフィルター（ HAWP ，孔径 0.45 μ ，直径 25 mm）で沪過後，非放射性タイロシン（ 10 μg/ml ）を含む 0°C に

冷却した 0.05 M トリス塩酸緩衝液（ pH 7.2 ）1 ml で 1 回洗浄した。沪紙は100°C ，10 分乾燥後，才 3 章に記述した方法により，液体シンチレーションカウンター （ Beckman LS-250 ）で放射活性を測定した。^{3}H－タイロシンは，タイロシン乳酸塩のアルカリ水溶液をクロロホルムで抽出後，5 回水洗を繰返して乳酸を除去し，前章に述べた ^{3}H ソルビン酸調製法と同様にして ^{3}H 置換し，部分精製したもの（比放射活性 約 0.3 mCi/mg ）を用いた。

才 3 節 実験結果

1. 熱損傷細胞の増殖に対するタイロシンの作用

ソルビン酸は酵母の熱死滅を促進した（才 3 章）が，タイロシンについてこの作用を検討したところ，1 mg/ml の濃度でも 50°C における *E. coli* の死滅をほとんど促進せず，加熱併用殺菌効果は認められなかった。

しかし，この抗生物質は加熱処理細胞の増殖を，未加熱細胞のそれにはほとんど影響しない濃度で顕著に阻害することを見出した。 Fig. 4-1 はペプトン－グルコース－酵母エキス培地中で対数増殖期にある *E. coli* 細胞を，各濃度のタイロシン存在下に 52°C ，5 分加熱処理し，その後の 37°C での増殖経過を示したものである。加熱単独処理細胞は約 1 時間の増殖遅延後，未処理細胞の増殖速度にほぼ等しい速度で増殖した。タイロシンは未加熱細胞の増殖に対しては添加後 30 ～ 40 分の作用発現遅れの後，その濃度の増加にともなって増殖速度を低下させた。一方，加熱

処理細胞の増殖に対しては，加熱による増殖遅延時間にはほとんど影響を及ぼさないが，その後の増殖速度を顕著に低下させることがわかった。 Fig. 4-1の結果から増殖速度定数を算出し，Table 4-1 に表わした。比較的低濃度

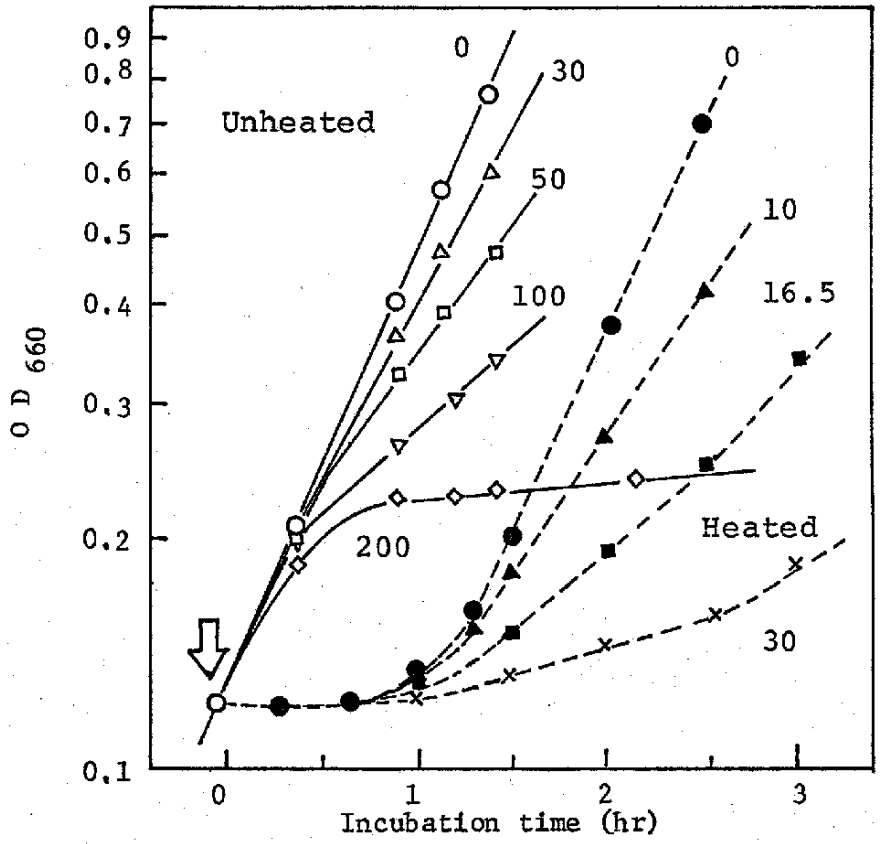

Fig. 4-1. Effect of tylosin on the growth of heated cells of *E. coli* in peptone-glucose-yeast extract medium. The arrow indicates the time of addition of tylosin and/or heat treatment (52°C, 5 min). Open symbols, unheated cells; closed symbols, heated cells. Number in the figure indicate the concentration of tylosin (μg/ml).

である 10 μg/ml のタイロシンは未加熱細胞の増殖に対し

ては 6.1%の阻害しか示さないが，加熱処理細胞の増殖に対しては 32 % の阻害率を示すことから，この実験条件では加熱によってタイロシンの作用は約 5.2倍に増加したこ

Table 4-1. Apparent first order rate constants and the percent inhibition of growth of *E. coli* cells unheated or heated in the presence of tylosin.

Treatment	Tylosin (μg/ml)	Growth rate constant (hr^{-1})	Inhibition** (%)
Unheated	0	1.24	0
	10	1.17	6.1
	20	1.11	13
	30	0.957	23
	50	0.699	44
	100	0.488	61
	200	0.094	92
Heated*	0	1.19	0
	2	1.14	3.7
	6.5	0.930	22
	10	0.805	32
	16.5	0.467	61
	20	0.391	68
	30	0.186	85

Growth rate constants were calculated from Fig. 4-1.
* At 52°C for 5 min
**{(Growth rate constant without tylosin - Growth rate constant with tylosin) / Growth rate constant without tylosin}x 100

とになる。ペプトン－グルコース－酵母エキス培地で認められた加熱併用効果は，nutrient broth や最少培地（実験方法の項に示したもの）でも顕著であった。

E. coli に対して認められたタイロシンの加熱併用効果は，グラム陽性細菌である *B. subtilis* PCI219 および酵母，*C. utilis* では極めて弱いものであった。既述のよう

に，タイロシンは蛋白合成阻害剤であるので，作用部位がこれと同じ抗生物質についてその加熱併用効果を調べた。用いた抗生物質のうち，クロラムフェニコールとテトラサイクリンは全く効果がなく，ストレプトマイシンでもほとんど無効であった。しかし，同じマクロライド系抗生物質であるエリスロマイシンでは，タイロシンと同程度の顕著な増殖阻害の増大を観察した。

タイロシンの加熱併用効果は当然，加熱条件によって影響を受ける。加熱時間の延長および加熱温度の上昇は，その後の増殖の遅延を延長させるとともに，タイロシンの増殖阻害率をも顕著に増加させることを認めた。

2. タイロシンの加熱併用効果の要因

E. coli に対するタイロシンの加熱併用効果の要因について検討を行なった。最少培地中で対数増殖期にある細胞を 52°C，5 分加熱処理し，その後 37°C で振とう保温中，それぞれ異なる時点でタイロシンを添加した。その結果，Fig. 4-2 に明らかなように，その増殖阻害率は加熱後薬剤添加が遅れるほど低下の傾向にあり，増殖開始後ではほとんど効果がないことを認めた。

ところで，未処理細胞に対するタイロシンの作用は可逆的で，阻害下にある培養液を同組成の新しい培地で希釈すると，その後の増殖速度は希釈率に応じて上昇することがわかった。このような現象は，クロラムフェニコール，[127] フルオロウラシル，[128] リンコマイシン[129]でも報告されており，薬剤分子と細胞内の薬剤結合分子（受容体）との結合が，

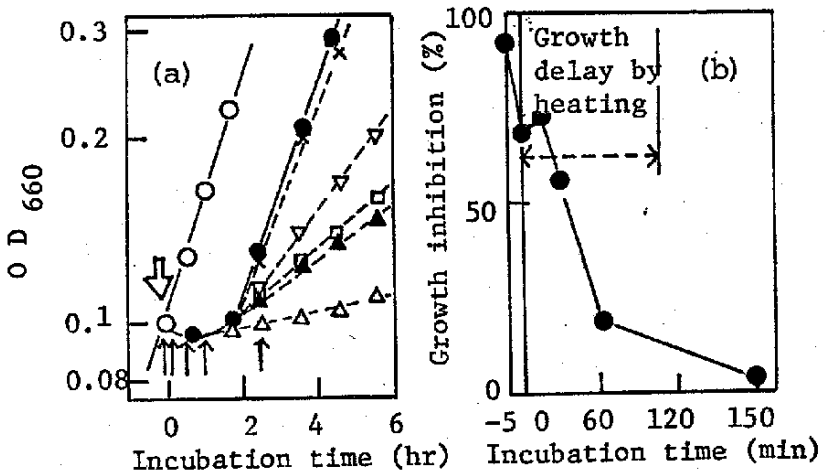

Fig. 4-2. Effect of delayed addition of tylosin on the growth inhibition of *E. coli* cells heated at 52°C for 5 min in minimal medium. (a) Time courses of growth inhibition. (b) Relationship between the time of addition of tylosin and the percentage of inhibition calculated from (a). Tylosin (10 μg/ml) was added (indicated by closed arrows) prior to heating (△), or at 0 (□), 5 (▲), 30 (▽), 60 (✕), or 150 (■) min after heating. Symbols : ○, growth of untreated cells ; ●, growth of cells heated without tylosin. See Fig. 4-1 for the open arrow.

各々の遊離の非結合分子と濃度的に平衡にあることを示唆している。そこでこのことを加熱処理細胞について検討した。すなわち，タイロシン（10 μg/ml）添加後，直ちに加熱処理した培養液を 37°C で振とう保温中，それぞれ異なった時期に同組成の新しい培地で 10 倍に希釈し，その後の増殖速度を調べた。 Fig. 4-3に図示したように，加熱単独処理細胞では希釈前後の増殖速度はほぼ同じであるが，タイロシン存在下に加熱処理した細胞では加熱後直ちに希釈すると，その後のタイロシンの阻害効果は著しく低下することがわかった。しかし，2 時間経過後希釈した場

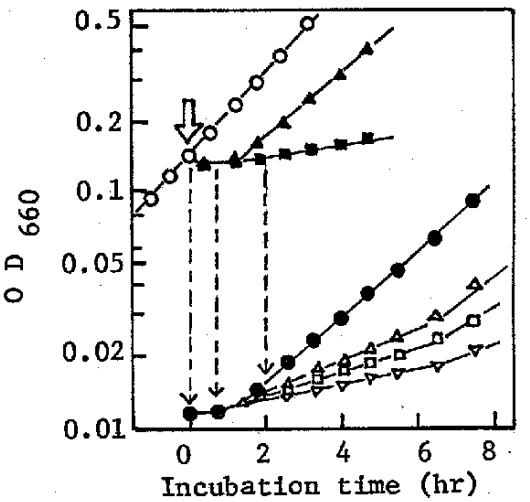

Fig. 4-3. Reversibility of the growth inhibition by tylosin of *E. coli* cells heated at 52°C for 5 min in minimal medium. Tylosin (10 μg/ml) was added (X) or not added (○) to unheated cells. Culture heated with tylosin (■) was diluted tenfold with fresh medium (indicated by broken lines and closed arrows) at 0 (△), 45 (□), or 120 (▽) min after heating. Culture heated without tylosin (▲) was diluted in the same way immediately after heating (●). See Fig. 4-1 for the open arrow.

合には，増殖阻害作用の低下はその後5時間にわたってほとんど認められなかった。これらの結果は，加熱処理細胞に対するタイロシンの作用がその薬剤透過性に関係することを示唆している。

EDTA はグラム陰性細菌の細胞表層に作用し，そのキレート作用によって細胞膜透過性を増大させることが知られている。[104,125,130] そこで次に，加熱処理のかわりにEDTA 処理した細胞に対するタイロシンの阻害効果を調べた。その結果，Fig. 4-4 に示したように，非致死的条件での EDTA 前処理によって加熱処理の場合と同様なタイロシン

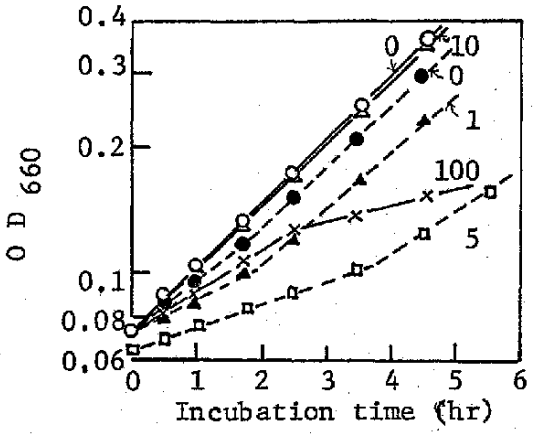

Fig. 4-4. Growth inhibition by tylosin of EDTA-treated cells of *E. coli*. Solid line, untreated cells; broken line, EDTA-treated cells. Numbers in the figure indicate the concentration of tylosin (μg/ml). See materials and Methods for the conditions of EDTA treatment.

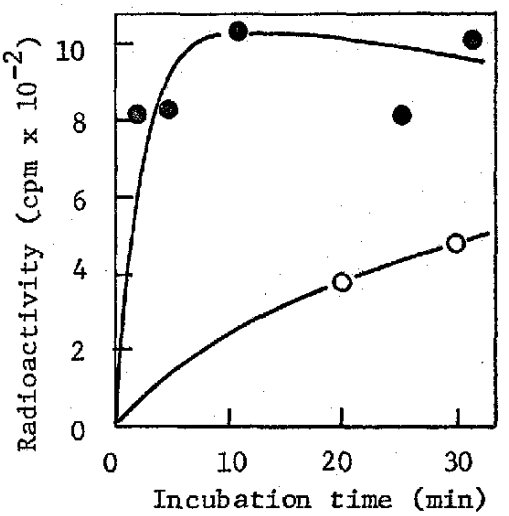

Fig. 4-5. Transfer of ^{3}H-tylosin into the heated cells of *E. coli*. Cells were incubated at 37°C (○) or 52°C (●) in nutrient broth containing ^{3}H-tylosin. The initial activity was subtracted from the measured radioactivity to give the indicated values.

の増殖阻害作用の拡大が認められた。またEDTA はグラム陰性細菌の細胞表層からリポ多糖体を遊離させることが報告されている[104]が，これはすでに才2章で示したように50°C で加熱処理した細胞についても観察しており（Fig. 2-6 ），52°C では一層顕著となることを認めている。

さらに，タイロシンの細胞内移行に対する加熱の影響を調べた。Fig. 4-5 に明らかなように，nutrient broth 中，対数増殖期にある細胞を含む培養液に添加した ^{3}H 標識タイロシンは，52°C での加熱によって急速に細胞内へ移行することがわかった。37°C における若干の移行は，細胞吸着とその細胞増殖による増加に基くものと思われる。

才4節　考察

抗生物質，タイロシンはグラム陰性細菌には作用力が低く，本実験条件下ではグラム陽性細菌に対するそれの，約1/200であった。しかし，半致死的条件で加熱処理した*E. coli*細胞の増殖に対しては顕著な阻害効果を示すことがわかった（Fig. 4-1 ，Table 4-1 ）。このタイロシンの加熱併用効果の要因は，その後の一連の結果から，薬剤分子の細胞への透過性にあるものと推察された。

アクチノマイシン，エリスロマイシン，リファンピシンなどの薬剤は，タイロシンと同様にグラム陰性菌には作用力が低いことが報告されており，[121,131-133] その原因は，これらの薬剤がグラム陽性菌のそれとは構造を異にするグラム陰性菌の細胞膜を透過できないことに起因すると考え

られている。

Fig. 4-2 と Fig. 4-3 の結果は，加熱処理細胞に対するタイロシンの作用が，加熱損傷の要因の一つである細胞膜透過性の損傷とその修復に密接な関係があることを示唆しており，次のように説明することができる。加熱後の増殖遅延期間中に細胞膜の薬剤透過障壁の傷害が次第に修復されるため，加熱直後にタイロシンを添加した場合にはその増殖阻害作用は著しいが，かなり修復が進行した段階で添加した場合には薬剤分子の細胞内移行が阻止され，阻害作用が低下したものと思われる。また希釈効果についての実験結果では，透過障壁が破壊された加熱直後に希釈すると細胞内の薬剤分子が漏出して作用力が低下するが，その修復が進行すると細胞内へ移行した薬剤分子は希釈によって流失せず，顕著な阻害作用が持続するのであろう。加熱処理細胞と同様なタイロシンの効果が，透過障壁を破壊することが知られる EDTA 処理した細胞でも認められた事実（ Fig. 4-4 ）はこのことを支持するものと考えられる。

上述の特定の薬剤に対する透過障壁の実体についてはまだ決定的な説はないが， Leive [125] は *E. coli* の EDTA 処理によって細胞表層のリポ多糖体が遊出することを見出しており，その後のいくつかの研究報告[104,134,135] から，この物質がグラム陰性細菌の透過障壁として有力である。Rogers [136] は，*E. coli* の 48°C での保温によってもリポ多糖体の遊出がおこることを報告しているが，この事実は本研究においても， 50°C （ Fig. 2-6 ）および 52°C

で認められた。また，加熱により培地中の^{3}H 標識タイロシンが多量細胞内へ透過することがわかった（Fig. 4-5）。これらの結果から，タイロシンの加熱併用効果の要因が，薬剤透過障壁の熱破壊に基く細胞内薬剤移行の拡大にあることが推定された。

タイロシンは，次章に述べる両性界面活性剤のような加熱中の細胞内物質の漏洩促進作用や食塩増感作用また死滅促進作用を示さないことを認めているので，加熱中の細胞損傷および死滅のプロセスには作用しないものと考えられる。さらに，加熱損傷細胞の食塩耐性の回復には影響しないこと，および加熱による細胞内 ATP レベルの低下を促進しないことを確認するとともに，加熱処理細胞の損傷回復期間と考えられる増殖遅延の時間にも影響を及ぼさないこと（Fig. 4-1）から，ソルビン酸に対して示された細胞の損傷回復の抑制作用も否定的である。以上のことから，加熱処理細胞に対するタイロシンの作用時点は，主に損傷回復後の増殖のプロセスと考えられる。

第5節　要約

薬剤の加熱併用効果の第2のモデルとして，食品防腐剤としての有用性が検討された抗生物質，タイロシンを対象とし，その *E. coli* に対する加熱併用効果の要因を検討した。得られた結果は次の通りである。

（1）タイロシンは，52°C での加熱による *E. coli* のコロニー形成能の低下を促進しなかったが，半致死的条件

で加熱（52°C　，5　分）した対数期細胞の増殖を，未加熱細胞には効果が小さい低濃度（　5～　30　μg/ml　）の条件で著しく阻害することを見出した。

（２）加熱処理細胞の増殖に対するタイロシンの作用は，加熱後その添加が遅れるほど低下すること，またタイロシン存在下に加熱した培養液を新しい培地で希釈したとき，その時期が早いほど阻害作用の低下が顕著なことを観察した。

（３）タイロシンの増殖阻害効果は，加熱処理のかわりに細胞膜透過性を変化させる EDTA 処理によっても増大することを認めた。

（４）52°C での加熱により，^{3}H 標識したタイロシンが多量細胞内へ移行した。

（５）*E. coli* に対するタイロシンの加熱併用効果の要因として，細胞膜の透過障壁の熱破壊に基く細胞内薬剤移行の拡大を示唆し，タイロシンは細胞の熱損傷からの回復後の増殖プロセスに作用するものと考えた。

第5章　細菌胞子に対する両性界面活性剤の加熱併用効果

第1節　緒言

両性界面活性剤は，その分子内に陽性基と陰性基の双方を有する一群の界面活性剤である。現在市販されているものは主としてアルキルアミノエチルグリシン系のテゴと呼ばれるもので，手術，治療，家具，居室や食品工場などの殺菌，消毒に用いられている。そのうちの主なものの構造は Fig. 5-1に示した通りで，これが陽イオン界面活性剤よりもすぐれている点は，低毒性でしかも蛋白や血清などと不溶性の沈澱を生成しにくい点である。陽イオン界面活性剤が顕著な殺菌作用を有することはよく知られる[69,137,138]が，両性界面活性剤の作用も強力である。しかしながら，ほとんどの抗菌薬剤がそうであるように，細菌胞子に対しては極めて殺菌効力が低い。Sykes [139]は，非致死的温度域（ 25°C ～ 50°C ）での *B. pumilus* 胞子に対する

Tego 51　$C_{12}H_{25}NHC_2H_4NHC_2H_4NHCH_2COOH$

Tego 103 G
- $C_{10}H_{21}NHC_2H_4NHC_2H_4NHCH_2COOH$
- and
- $C_{10}H_{21}NHC_2H_4$ ＼ NCH_2COOH
- $C_{10}H_{21}NHC_2H_4$ ／

Tego 15 DL
- $C_{12-16}H_{25-33}NHC_2H_4NHC_2H_4NHCH_2COOH$
- and
- $C_{12-16}H_{25-33}NHC_3H_6NHCH_2COOH$

Fig. 5-1. Structures of active substances in Tego preparations.

テゴ 103 Gの作用について予備試験的に検討し，その殺菌作用の温度依存性を報告している。著者は致死温度での加熱による相剰殺菌効果を期待し，耐熱，耐薬剤性などの点で最も問題とされる細菌胞子を対象に，薬剤の加熱併用効果の才 3のモデルとして両性界面活性剤をとりあげた。本章においては，この併用効果の特性および作用要因について検討した結果を述べる。

才 2節　実験材料および方法

供試菌　*B. subtilis* var. *niger* OUT 4380を用いた。

薬剤　テゴ 15 DLを使用し，一部の実験では比較のため，テゴ 51 ，テゴ 103 Gも用いた。これらは Goldschmidt 社の製品で日本商事から入手した。

胞子懸濁液の調製　胞子形成培地として nutrient broth に硫酸マンガンを 0.05 % 加えたものを用い，これを各々 100 ml 含む 500 ml 容フラスコ 10 本に供試菌を一白金耳接種して，30°C で 7日間振とう培養した。培養終了後，10,000 rpm ，10 分間遠心分離して胞子を集め，無菌水で 6回洗浄後，約 100 ml の無菌水に懸濁した。これを 1分間ホモゲナイザー（日本精機工業）で均一にし，残存している栄養細胞を 80°C ，20 分加熱処理して死滅させ，その後，冷蔵庫（ 4°C ）中に保存した。この胞子懸濁液の濃度は約 2×10^9/ml で，使用のつど 70°C ，30 分間加熱活性化した。

加熱および薬剤処理　予め油浴中で所定温度に保温

した 0.1 M リン酸緩衝液（pH 7.0）を 8.9 ml 含む試験管（16.5 mm x 165 mm）に，両性界面活性剤の水溶液を所定濃度になるよう 0.1 ml 添加し，さらに胞子懸濁液を 1 ml 加え，このときを初発として以後，加熱した。その間，経時的に試料 1 ml を採取し，常温の無菌水 9 ml を含む試験管に入れて直ちに氷中に移した。なお対照として，加熱単独処理の場合は両性界面活性剤を加えず緩衝液量を 9 ml とし，薬剤単独処理の場合は 30°C で保温した。

<u>生存胞子数の測定</u>　上述の試料を適当に希釈したのち，nutrient agar（NA）上で平板培養し，2 日後の生成コロニー数を測定した。食塩耐性についての実験では，この寒天培地に 6 %食塩を含むもの（NAS）も用いた。

<u>胞子内成分の定量</u>　0.1 M トリス塩酸緩衝液（pH 7.2）と両性界面活性剤（最終濃度 100 μg/ml）を含む試験管（26 mm x 195 mm）に，胞子懸濁液（最終濃度約 10^{10}/ml）を加えて 85°C で加熱した（全量 10 ml）。経時的に試料 3 ml を遠沈管にとり，氷中で冷却したのち，15,000 rpm，10 分，冷却遠心分離してその上澄液をとった。まず，その 260 nm での紫外吸光を比色計（日立，101型）により測定後，以下の物質を比色定量した。ペントースはオルシノール反応[88]によった。蛋白質は Lowry-Folin 法[140]，ジピコリン酸は Jannssen らの方法[141]に準じて定量した。

<u>濁度</u>　85°C に加熱した胞子懸濁液を適当に希釈して，濁度を 660 nm の波長で測定した。

第3節　実験結果

0.1 Mリン酸緩衝液（ pH 7.0 ）中の *B. subtilis* var. *niger* 胞子の熱死滅は，両性界面活性剤によって顕著に促進された。 Fig. 5-2 に示したように， 100 μg/ml のテゴ 15 DLによる死滅は 37°C ，60 分後では全く認められないし，テゴ不在下に 80°C で加熱しても生存数低下は約 0.5対数目盛にすぎないが，同濃度のテゴ 15 DL 存在下に

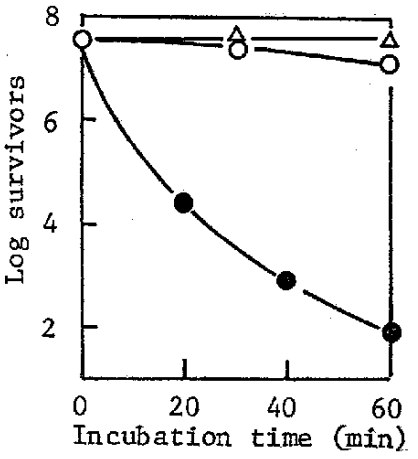

Fig. 5-2. Thermal death of *B. subtilis* var. *niger* spores at 80°C in the presence of Tego 15 DL at a concentration of 100 μg per ml. Symbols : ○, heated without Tego; △, Tego added; ●, heated with Tego.

80°C で加熱した場合には約 5 対数目盛もの生存率低下が認められた。このような両性界面活性剤の熱死滅促進効果はテゴ 103 G やテゴ 51 でもほぼ同程度の効果を得たので，以後の実験ではすべてテゴ 15 DL を使用した。

次に，両性界面活性剤の加熱併用殺菌効果に対する二，三の影響因子について検討した。 Fig. 5-3 はテゴの濃度

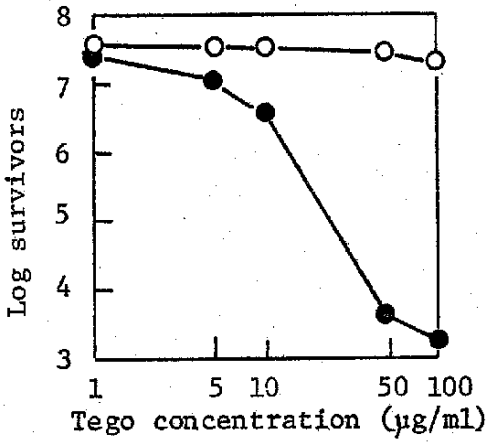

Fig. 5-3. Effect of the concentration of Tego 15 DL on the thermal death of *B. subtilis* var. *niger* spores at 80°C for 60 min. Symbols : ○, unheated; ●, heated.

の影響をみたもので，80°C ，60 分の加熱条件では，5 μg/ml の濃度を越えると効果が明らかになり，50 μg/ml

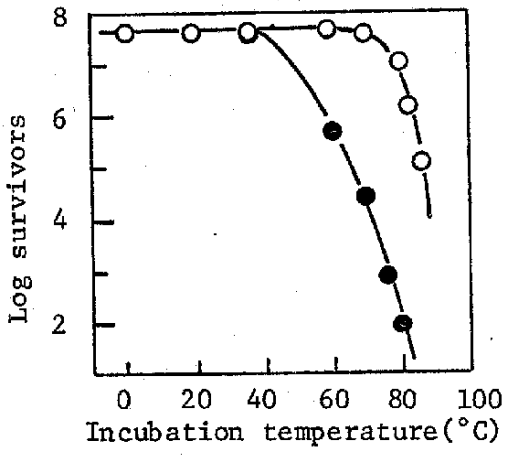

Fig. 5-4. Temperature dependence of the action of Tego 15 DL on the survival of *B. subtilis* var. *niger* spores. Spores were incubated at various temperatures with (●) or without (○) Tego 15 DL for 60 min.

の濃度では4対数目盛に近い生存率低下があった。また，加熱温度の影響を Fig. 5-4 に示した。100 μg/ml の濃度のテゴで 60分処理後の死滅は，加熱温度が40°C で認められるが，60°C 以上の温度では急激に増大した。一方，テゴ未添加の場合には 80°C 以上でようやく生存数の低下が認められるにすぎなかった。両性界面活性剤の殺菌効果は弱アルカリ pH で強力であるといわれている[142]が，80°C，60 分の加熱条件では，Fig. 5-5 に示したようにpH 7 で最大の生存率を示し，併用効果の pH 依存性は耐熱性のそれに類似していた。

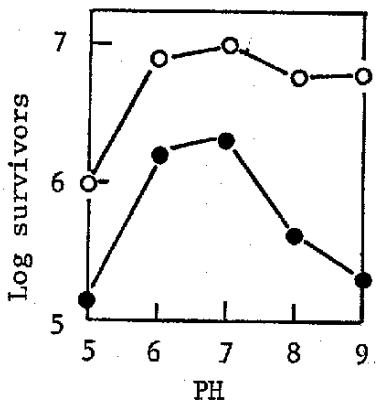

Fig. 5-5. PH dependence of the action of Tego 15 DL on the thermal death of *B. subtilis* var. *niger* spores at 80°C for 60 min. Spores were heated with (●) or without (○) Tego 15 DL at a concentration of 10 μg per ml.

微生物の栄養型細胞の加熱による食塩耐性低下についてはすでに第1章に記述したが，これは二，三の細菌胞子についても報告されており，[143,144] 本研究の使用菌でもこれを観察した。その結果が Fig. 5-6 で，80°C での加熱に

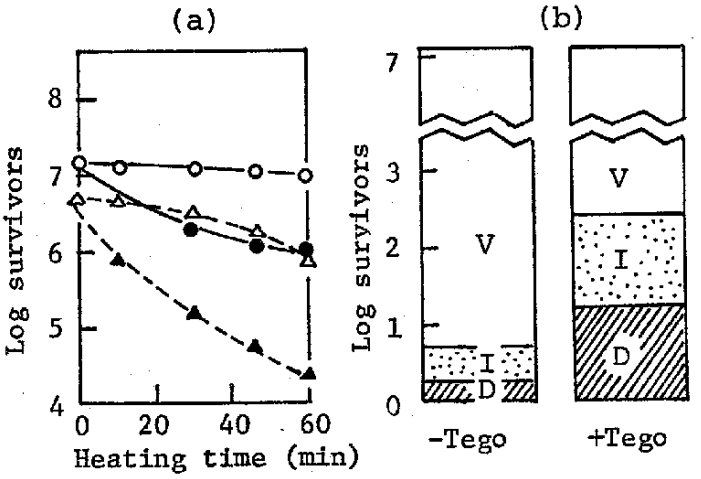

Fig. 5-6. Increase in the proportions of heat-injured and dead spores of *B. subtilis* var. *niger* at 80°C by Tego 15 DL at a concentration of 10 μg/ml. (a) Time courses of the loss of viability on NA (○,●) and NAS (△,▲). Open symbols, heated without Tego; closed symbols , heated with Tego. (b) Proportions of viable (uninjured, V), injured (I), and dead (D) spores calculated from the data for 60 min in (a). V = log survivors on NAS at 60 min, I = log survivors on NA at 60 min - log survivors on NAS at 60 min - (log survivors on NA at 0 min - log survivors on NAS at 0 min), and D = log survivors on NA at 0 min - log survivors on NA at 60 min.

よって平板培地中の6％食塩に対する耐性を失った胞子集団を加熱損傷胞子とすると，図からこの胞子数が経時的に増加してゆくことが明らかである（a）。さらに，加熱中に存在するテゴは食塩耐性の低下を著しく促進し，熱死滅胞子数とともに損傷胞子数が顕著に増加した（b）。

一方，85°C での加熱による胞子内の 260 nm 吸収物質の漏出は，Fig. 5-7 に示したように，テゴによって著しく促進され，60 分後には加熱単独処理の場合の約 3.8 倍に達することを認めた。このような作用は，程度は異なるが，Fig. 5-8 に示したように，オルシノール反応陽性物

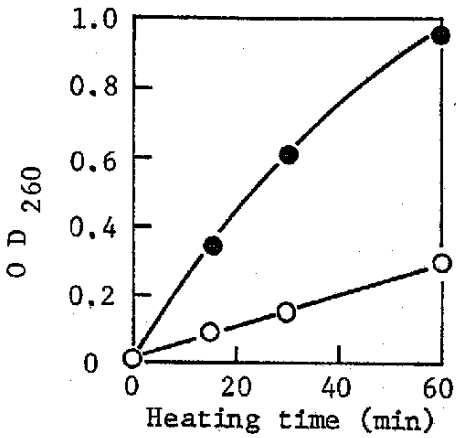

Fig. 5-7. Leakage of 260 nm-absorbing materials from the spores heated at 85°C with or without Tego 15 DL. Symbols : ○, heated without Tego; ●, heated with Tego (100 μg/ml).

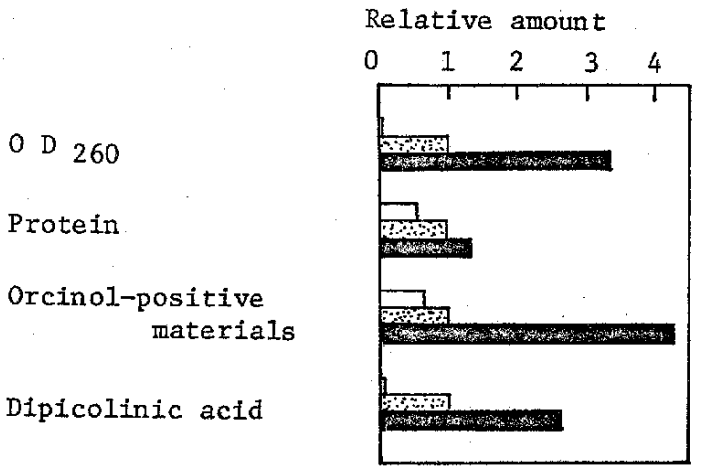

Fig. 5-8. Leakage of spore materials by heating at 85°C for 60 min with or without Tego 15 DL at a concentration of 100 μg per ml. ▭, Tego added; ▒, heated without Tego; ■, heated with Tego.

質，ジピコリン酸および蛋白質についても認めた。また，Fig. 5-9 に明らかなように，胞子懸濁液の濁度は 85°C での加熱によって低下することを認めたが，テゴはこれをさらに促進し，30 分後では初発の約 60 % に低下することが判明した。

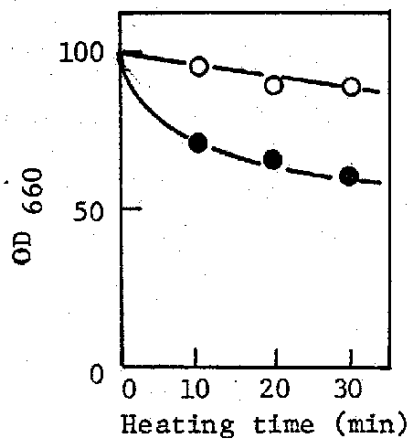

Fig. 5-9. Turbidity of spore suspension heated at 85°C in 0.1 M Tris-HCl buffer (pH 7.2) containing Tego at a concentration of 100 μg/ml. Although OD_{660} of spore suspension increased by 21 % after addition of Tego at 30 °C, this value was calculated as 100. Initial OD_{660} was 0.283. Symbols : ○ , heated without Tego; ● , heated with Tego.

第4節　考察

種々の物理的，化学的処理に対して抵抗性の強い細菌胞子に対し，各々単独ではほとんど効果のない条件で，加熱と両性界面活性剤を併用処理することにより，著しい併用殺菌効果を観察することができた（Fig. 5-2 ）。死滅は胞子の熱活性化がおこる非致死的温度ですでに認められる

が，致死温度ではさらに顕著となった（ Fig. 5-4 ）。また，加熱培地に1％のペプトンが存在しても活性の低下は軽微であることを認めている。

両性界面活性剤は加熱による胞子の食塩耐性低下を拡大した（ Fig. 5-6 ）ことから，その加熱損傷を促進するものと考えられる。また，一般に界面活性剤の作用部位の一つとして，従来から細胞表層が挙げられているが，[137,145,146] 既述のようにこれは細胞の加熱損傷の一要因でもあり，加熱によって細胞内の成分が漏出することは細菌胞子においても例外ではない。[147,148] 両性界面活性剤が，加熱による胞子内の 260 nm 吸光物質や蛋白質のほか，cortex 中に存在して耐熱性に寄与すると考えられているジピコリン酸[149,150] の漏出を促進したこと（ Fig. 5-7 ， Fig. 5-8 ）は，胞子表層の熱破壊がこの薬剤によって著しく促進されることを示唆している。また，加熱中の胞子懸濁液の濁度が，両性界面活性剤によって明らかに低下した事実（ Fig. 5-9 ）は，胞子の何らかの形態変化を示すものと考えられる。なお顕微鏡観察では，溶菌はほとんど認められなかった。これらの両性界面活性剤の作用は，才3章に述べたソルビン酸，および才4章でとりあげたタイロシンの作用と相違しており，加熱中に作用して胞子の損傷および死滅を促進するものと考えられる。

才5節　要約

薬剤の加熱併用効果の才3のモデルとして，耐熱，耐薬

剤性の細菌胞子を対象に，とくに環境殺菌剤としての発展的利用が期待される両性界面活性剤（テゴ）の加熱併用効果とその要因について検討し，次の結果を得た。

（1）0.1 M リン酸緩衝液に懸濁した *B. subtilis* var. *niger* 胞子の 80°C における熱死滅は極めて少ないが，常温では殺菌作用が小さい濃度（ 10 ～100 μg/ml ）のテゴ存在下で加熱すると著しい死滅がおこった。

（2）テゴの加熱併用効果は，80°C ，60 分の加熱条件では薬剤濃度が 5 μg/ml を越えると顕著になり，100 μg/mlの濃度，60 分の保温条件では 60°C 以上で明らかとなった。

（3）テゴは，加熱処理胞子の死滅を促進するとともに，6 % 食塩に対する耐性を失った損傷胞子の数を著しく増大させた。

（4）加熱による 260 nm 吸光物質やジピコリン酸などの胞子内成分の漏洩は，テゴの存在下ではさらに顕著となった。また，胞子懸濁液の濁度も，加熱・テゴ併用処理下では著しく低下した。

（5）得られた結果から，テゴは加熱中に胞子表層の熱破壊を拡大し，主に，胞子の加熱損傷および死滅のプロセスに作用するものと考えられた。

第6章　薬剤の加熱併用効果における細胞死滅の動力学

第1節　緒言

第3～5章にわたり，薬剤の加熱併用効果の作用要因について，ソルビン酸，タイロシンおよび両性界面活性剤をモデルに検討を行なってきた。本章では，とくに実用面における加熱・薬剤併用処理条件に関する知見を得ることを目的とし，上述の薬剤のうち，殺菌併用効果を有するソルビン酸と両性界面活性剤を対象に，加熱併用効果の特性について詳細な検討を試みた。

一般化学反応と同様に，温度は抗菌性物質の殺菌作用に対して著しい影響を与える。この効果を表示する特性値としては温度係数，Q_{10} がよく用いられ，各種殺菌剤の作用に対する Q_{10} は，常温付近の温度範囲にわたって2～3の値をとる。[151] 一方，とくに食品の熱殺菌効果の指標としてはD値（90％死滅時間）が用いられ，さらにこの値の温度依存性は片対数プロットでほぼ直線を示すので，その勾配から算出される z 値（D値を90％低下させるのに要する温度）も広く利用されている。

しかしながら，薬剤と加熱の併用処理による殺菌効果はその解析が複雑で，現在までに報告されている薬剤作用の温度依存性は，単に log D ～温度のプロットや z 値を表示するのみで，現在のところ，さらに歩を進めた報告例は見当らない。

本章においては，*E. coli* を用い，先の生理学的な検討からその作用要因が異なることが示唆された両性界面活性剤とソルビン酸の加熱併用効果について，その作用の動力学的特性を調べた。

才2節　実験材料および方法

<u>供試菌</u>　*E. coli* K-12 を使用した。

<u>培養</u>　細胞は，既述の nutrient broth 20 ml を含む 100 ml 容フラスコ中，37°C で 18 時間振とう培養した。培養終了後，5,000 rpm ，5 分の遠心分離によって集菌し，さらに無菌水で 2 回洗浄後，0.05 M リン酸緩衝液（pH 7.0 ）中に懸濁した。

<u>薬剤</u>　それぞれ，才 3，5 章で用いたソルビン酸カリウムと両性界面活性剤（テゴ 15 DL ）を使用した。また，一部の実験ではラウリル硫酸ナトリウム（SLS ）とセチルトリメチルアンモニウムブロマイド（ CTAB ）も用い，これらは半井化学から入手した。

<u>加熱および薬剤処理</u>　既述の方法に準じて行なった。所定濃度の薬剤を含む 0.05 M リン酸緩衝液（ pH 7.0 ） 9.5 ml を含む試験管（ 18 mm x 180 mm ）を所定温度に予熱しておき，これに細胞懸濁液，0.5 ml を加え，振とう下で加熱した。一定時間ごとに試料 1 ml をとり，生菌数測定の試料とした。

<u>生菌数測定</u>　既述の方法により，平板培地としては nutrient agar を用いた。

理論[90,152]　一般に，微生物の熱死滅は一分子反応に従うことが認められており，これは次式によって表わされる。

$$\frac{dN}{dt} = -kN \qquad (1)$$

ここで，N = 生存菌数，t = 加熱時間，k = 死滅速度定数である。したがって，時間0から時間tまで積分すると，

$$\log \frac{N}{N_0} = -\frac{k}{2.303} \cdot t \qquad (2)$$

となる。ここで，N_0 =初発生存菌数である。

緒言に述べにように，ある温度での熱殺菌効果を表示するのにD値が用いられるが，これはkと次の関係にある。

$$D = \frac{\log_e 10}{k} = \frac{2.303}{k} \qquad (3)$$

死滅速度定数kの温度依存性についてはニつの関係式があり，その一つは Arrhenius 式，

$$k = A e^{-Ea/RT} \qquad (4)$$

である。ここで，Ea =反応の活性化エネルギー(cal/mole)，T = 絶対温度（°K），A = 定数，R = 気体定数である。したがって，1/T に対してk の対数をプロットすると直線が得られ，その勾配が活性化エネルギーに比例することになる。

もう一つの関係式は，Eyring の絶対反応速度論[153]によって示されるもので，これは次のように表わされる。

$$k = \frac{k_B T}{h} e^{-\Delta H^*/RT} e^{\Delta S^*/R} \qquad (5)$$

ここで，ΔH^* = 反応の活性化エンタルピー（ cal/mole ），ΔS^* = 反応の活性化エントロピー（ cal/mole·deg ），k_B = Boltzman 定数（ 1.38×10^{-16} erg·°K^{-1} ），h = Planck 定数（ 6.63×10^{-27} erg·sec ）である。

（5）式を変形して対数をとると，

$$\ln \frac{k}{T} = -\frac{\Delta H^*}{R}\left(\frac{1}{T}\right) + \frac{\Delta S^*}{R} + \ln \frac{k_B}{h} \qquad (5')$$

となり，k/T の対数と 1/T をプロットすると直線関係が得られる。

ΔH^* と ΔS^* の関係は，

$$\Delta G^* = \Delta H^* - T\,\Delta S^* \qquad (6)$$

で表わされ，ΔG^* = 反応の活性化自由エネルギー（ cal/mole ）である。また，ΔH^* と Ea の関係は次式のように誘導できる。

$$\Delta H^* = Ea - RT \qquad (7)$$

一方，薬剤殺菌における死滅速度定数と薬剤濃度との関係については次の経験式が知られている。[154)]

$$k = A' C^n \qquad (8)$$

ここで C =薬剤濃度，n = 薬剤の殺菌濃度指数，A'= 定数である。両辺の対数をとると，

$$\log k = n \log C + \log A' \qquad (8')$$

となり，k と Cの両対数プロットをとると直線関係が得られ，その勾配が n である。

以上の関係式のプロットにおける直線は，最少自乗法によって求めた。

第3節　実験結果および考察

1. 熱死滅に対する薬剤作用の反応特性

0.05 M リン酸緩衝液（pH 7.0）中の *E. coli* の熱死滅は，Fig. 6-1 に示したように，50°C ～ 60°C の温度範囲内でほぼ一分子反応に従うことを認めた。一方，このリン酸緩衝液に両性界面活性剤（テゴ 15 DL, 1 ～ 100 μg/ml），あるいはソルビン酸（0.5 ～ 3 %）を加えて加熱すると，第3，5章で述べたような著しい薬剤の加熱併用効果が *E. coli* についても認められた。それらの生存曲線には，両性界面活性剤ではプラトーが，ソルビン酸の場合にはショルダーが現われたが，それぞれの直線部分から

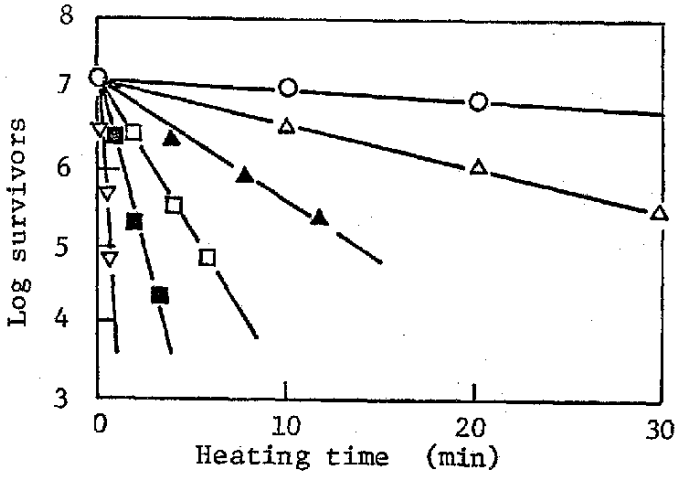

Fig. 6-1. Survivor curves of *E. coli* cells heated at various temperatures in 0.05 M phosphate buffer (pH 7.0). Symbols : ○, 50°C; △, 52°C; ▲, 54°C; □, 56°C; ■, 58°C; ▽, 60°C.

死滅速度定数 kを計算し，前項（5′）式の関係からその温度依存性を各々，Fig. 6-2 ，Fig. 6-3 に示した。さらにデータから，反応の活性化エンタルピー（ΔH^*），活性化エントロピー（ΔS^*），活性化自由エネルギー（ΔG^*）を（5′），（6），（7）式を用いて計算し，それらの値を Table 6-1 にまとめた。なお，活性化エネルギー（Ea）については（7）式の関係から，調べた温度範囲内ではほぼ ΔH^* に等しい値をとるため表示しなかった。薬剤不在下での *E. coli* の熱死滅に対する Ea の値は比較的高く，

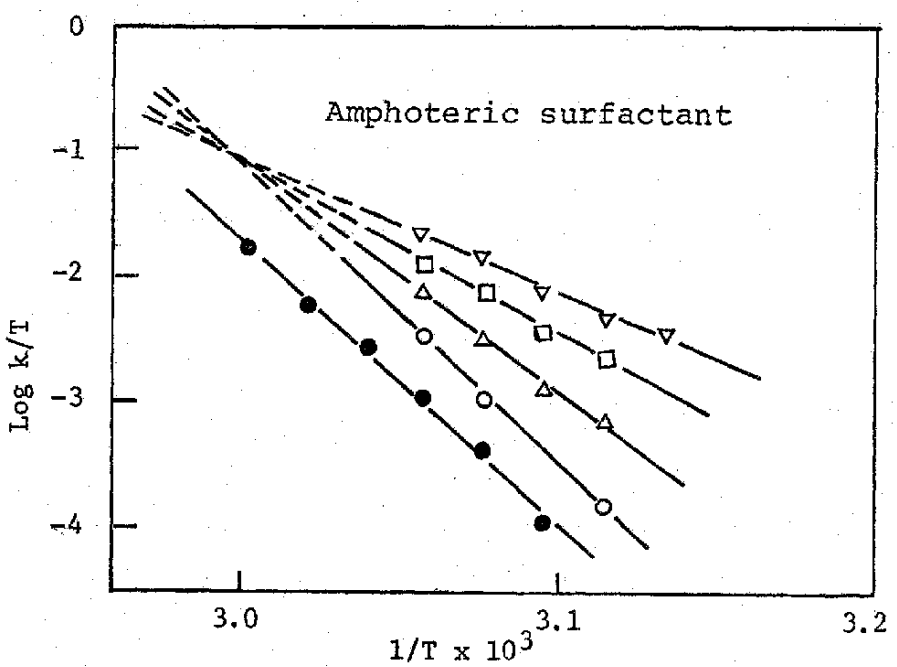

Fig. 6-2. Temperature dependence of the thermal death of *E. coli* in the presence of amphoteric surfactant at various concentrations. Cells were heated with amphoteric surfactant at a concentration of 0 (●), 1 (○), 2 (△), 5 (□) or 10 (▽) μg per ml in 0.05 M phosphate buffer (pH 7.0).

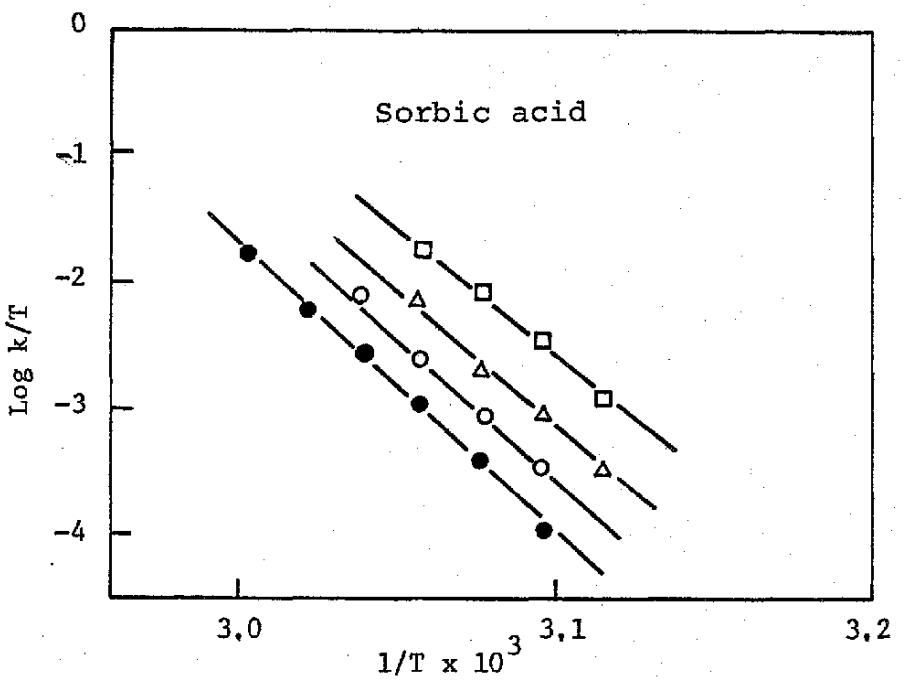

Fig. 6-3. Temperature dependence of the thermal death of *E. coli* in the presence of sorbic acid at various concentrations. Cells were heated with sorbic acid at a concentration of 0 (●), 0.5 (○), 1 (△) or 3 (□) % in 0.05 M phosphate buffer (pH 7.0).

他の微生物について得られている値に匹敵するものである。155)

両薬剤の作用を温度依存性（ Fig. 6-2 , Fig. 6-3 , Table 6-1 ）の点から比較すると，興味ある差異を指摘することができる。すなわち，両性界面活性剤の場合にはその濃度の増加とともにプロットの直線の勾配，したがって ΔH^* （≒ Ea）が急激に減少した（ 1 μg/ml における 108 Kcal/mole から 10 μg/ml における 51 Kcal/mole まで）が，一方のソルビン酸ではその濃度依存性が極めて

Table 6-1. Thermodynamic parameters for the thermal death of *E. coli* in the presence of amphoteric surfactant or sorbic acid.

Antimicrobial agent	Concentration	ΔH^* (cal/mole)	ΔS^* (cal/mole·deg)	ΔG^* (cal/mole)
None	0	104,000	248	23,900
Amphoteric surfactant	1 μg/ml	108,000	265	22,400
	2	85,000	195	22,200
	5	61,000	122	21,500
	10	51,000	93	21,000
Sorbic acid	0.5 %	113,000	279	23,000
	1	103,000	253	22,400
	3	96,000	231	21,500

ΔG^* was calculated from the data of 50°C.

小さく，ΔH^* の値は薬剤未添加の場合の値（ 104 Kcal/mole ）にほぼ近い値を示した。

変動の著しい両性界面活性剤の ΔH^* と ΔS^* について，その各濃度における値（ Table 6-1 ）をプロットし，Fig. 6-4に表わした。図は両者の間に直線関係が成立することを示しており，このことは，この死滅反応がいわゆるエンタルピーエントロピー補償則[110]に従うことを意味している。この関係は次式で表わされる。

$$\Delta S^* = (1/Tc)\,\Delta H^* + b$$

ここで，Tc =補償温度（°K），b = 定数である。このプロットの直線勾配から求められる Tc は 60.9°C と計算され，これは相対的に実験温度に近接した値であると言える。一方，ソルビン酸の場合には，ΔH^* と ΔS^* の薬剤濃度に対す

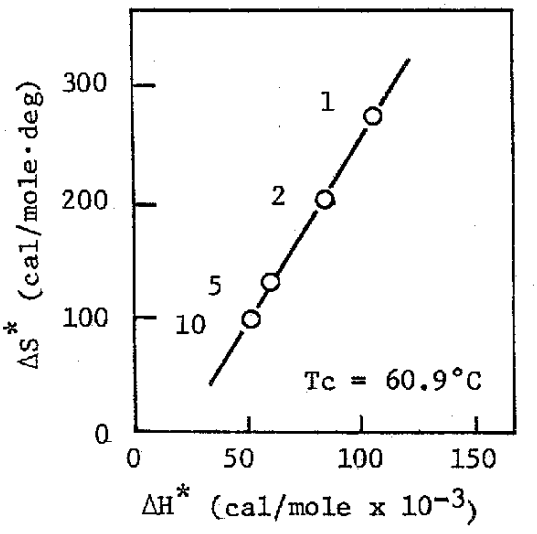

Fig. 6-4. Linear relationship between ΔH^* and ΔS^* for the thermal death of *E. coli* in the presence of amphoteric surfactant at various concentrations (μg/ml) indicated in the figure.

る変化が少ないため，誤差が大きくこの方法では算出できなかった。

Barnes ら[156]は，ウィルスの熱不活性化反応を例としてとりあげ，生物学的な研究にはあまり用いられていない一物理定数である補償温度，Tc の有用性を提唱した。彼らは，この定数の評価によって，ある二種類の現象が同じ機構によるものか否かを決定したり，関連条件下での反応速度や挙動の予測，さらにそれらの現象の分類が可能になると考えた。この特定の温度の有意性については，Rosenberg ら[40]によっても示されている。彼らは熱による細胞死滅の要因として蛋白変性を唱え，その論拠を両反応の補償効果のプロットから求めた Tc と b の値が極めて類似していることにおいている。この補償効果の存在は，生物学の分野では主に蛋白質分子の反応について見出され，反応プロセスの考察がなされている。[126,157,158] 補償効果および補償温度の物理化学的意義については未だ不明確であるが，Lumry と Rajender[157] は，水溶液中の蛋白質の挙動における補償効果を論じ，この効果に対する水分子の関与を示唆している。

Tc は Arrhenius プロットから直接算出することも可能である。両性界面活性剤の作用に対するプロット（Fig. 6-2 ）の各直線を図の左方向，すなわち高温側に外挿すると，ほぼ一点に収束する。この交点の温度が Tc で，各々二直線の交点の値の平均から求めると，61.5°C であり，この値は先の ΔH^* ～ ΔS^* プロット（ Fig. 6-4 ）から計

算した値にほぼ等しい。ただし，Fig. 6-2 にみられるように，対照の薬剤無添加の場合の直線はその交点を通らなかった。得られた Tc の値は，蛋白変性，[40] ウイルスの熱不活性化，[156] 噴霧乾燥による酵母の死滅[160] について報告されているものに近いものである。理論的には，Tc では細胞の死滅は両性界面活性剤の濃度に依存しないことになる。一方，ソルビン酸の場合（Fig. 6-3 ）には各直線が平行に近いため，外挿によって求められる Tc の値は実験温度を越えるほど大とみなすことができる。

Fig. 6-5 と Fig. 6-6 には，（8 ）式を用いて，それ

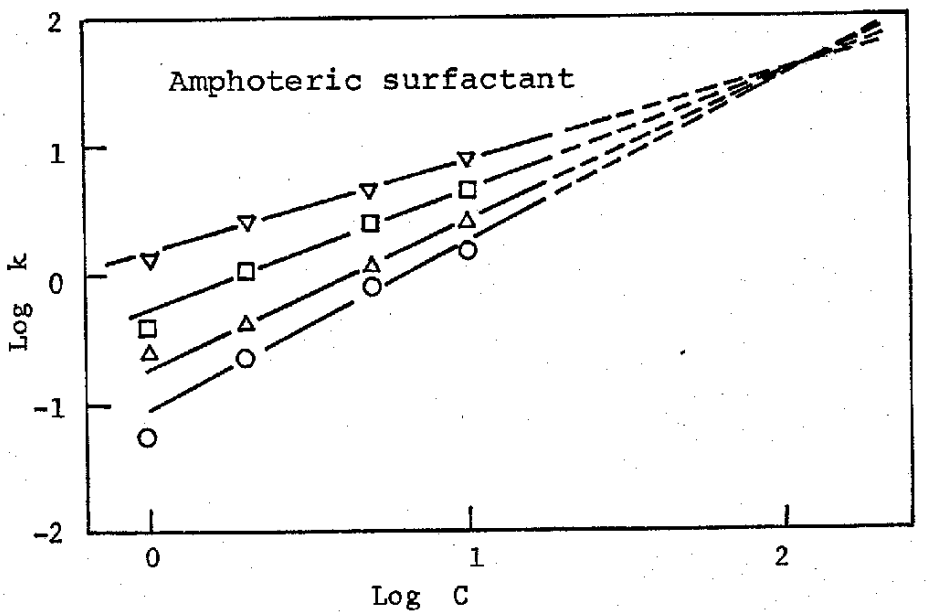

Fig. 6-5. Relationship between the thermal death rate constant and the concentration of amphoteric surfactant. Cells were heated with amphoteric surfactant in 0.05 M phosphate buffer (pH 7.0) at 48 (○), 50 (△), 52 (□) or 54 (▽) °C. Dilution coefficients at above temperatures were 1.32, 1.10, 0.95 and 0.72, respectively.

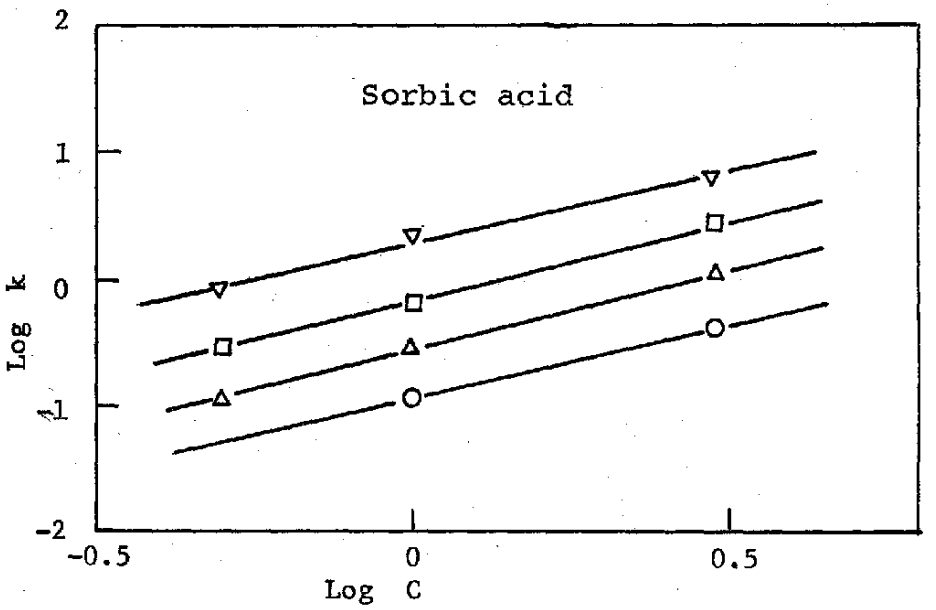

Fig. 6-6. Relationship between the thermal death rate constant and the concentration of sorbic acid. Cells were heated with sorbic acid in 0.05 M phosphate buffer (pH 7.0) at 48 (○), 50 (△), 52 (□) or 54 (▽) °C. Dilution coefficients at above temperatures were 1.15, 1.22, 1.20 and 1.10, respectively.

ぞれ生存曲線から求めた各温度における死滅速度定数と薬剤濃度との関係を示した。両薬剤に対して直線関係が得られたが，温度依存性の結果と同様に，この関係からもそれらの作用特性の相違を指摘できる。両性界面活性剤については，図の直線の勾配，すなわち薬剤の殺菌濃度指数は温度の上昇とともに低下の傾向にある（48°C で1.32 から 54°C で 0.72 まで）が，一方，ソルビン酸については温度に依存せず，ほとんど一定であった（1.10 ～ 1.12）。

また，両性界面活性剤の場合，Fig. 6-5 の各直線を右側（高濃度側）に外挿すると，それらはほとんど一点で交

わった。そこで，このときの濃度を臨界有効濃度と定義し，Tc を Arrhenius プロットから求めた場合と同様にして交点の平均からこれを計算した結果，114 μg/ml の値を得た。この濃度では，理論的には細胞死滅は加熱温度に依存しなくなると考えられる。ソルビン酸の作用に対する臨界有効濃度は，Fig. 6-6 の各直線がほぼ平行なため決定できないが，Tc と同様に実験範囲を越えるほど大とみることができる。

2. 加熱併用効果を有する薬剤の類型化

E. coli に対する両性界面活性剤とソルビン酸の加熱併用効果における作用特性は，温度依存性からも薬剤濃度依存性からも異なることがわかった。これら両薬剤の作用の動力学的特性の相違は，作用機構の違いを示唆するものと思われ，このことは才3，5章で論じた生理学的検討の結果と合致する。そこで，既述のTc の有用性に関するBarnesらの指摘を本研究に適用し，加熱併用効果を有する薬剤の作用特性評価や作用型式の類別に，熱力学的定数である Tc（もしくは臨界有効濃度）を利用できるものと考えた。

最近まで，多数の抗菌性物質が熱死滅促進活性を有することが知られている（序論，Table I-2 ）が，その作用の温度特性について詳細に検討した例は極めて少なく，しかもそれらは，すべて加熱温度に対するD値の対数の関係によって示されている。この関係は，用いた実験温度域では，両軸の逆数関係からほぼ Arrhenius プロットに近似

Table 6-2. Classification by the temperature dependence of antimicrobial agents having combined effect with heating.

Type	Compensation temperature	Mode of action*	Antimicrobial agent	Microorganism	Reference
Amphoteric surfactant-type	Near the observation temperature	Enhancement of thermal injury and death during heating	β-Propiolactone	*Sal. typhimurium*	55**
			NaOH	*Asp. niger* spores	47**
			Cetyltrimethyl-ammonium bromide	*E. coli*	This study
			Sodium lauryl-sulfate	*E. coli*	This study
Sorbic acid-type	Much higher than the observation temperature	Inhibition of recovery from injury after heating	Benzoic acid	*Sal. typhimurium*	55**
			Ethylene oxide	Bacterial spores	52**
			Propylene oxide	Bacterial spores	52**

* From the results described in Chapter 3 and 5
** From the plot of log D (decimal reduction time) versus temperature

できる。したがって，加熱併用効果を有する薬剤は，相対的に上述の両性界面活性剤とソルビン酸の二つの型に分類できるものとし，類型化を試みた。その結果，Table 6-2 にまとめたように，それぞれ対象とする微生物や加熱環境は様々であるが，β－プロピオラクトン，水酸化ナトリウム，セチルトリメチルアンモニウムブロマイドおよびラウリル硫酸ナトリウムは両性界面活性剤型に，安息香酸とエポオキサイドはソルビン酸型に分類することができた。なお，セチルトリメチルアンモニウムブロマイドとラウリル硫酸ナトリウムの作用のTc は，それぞれ 56.2°C と 59.4 °C であった。

本章で得られた結果から，加熱殺菌の薬剤併用処理条件について，以下の有用な知見が得られた。両薬剤とも，その添加によって殺菌処理温度を低下させる効果があるが，ソルビン酸型の薬剤では，どの殺菌温度でも添加濃度相応の（ Fig. 6-3 ），またどの薬剤濃度でも加熱温度相応の（Fig. 6-6 ）等しい殺菌効果をもたらす。しかるに，両性界面活性剤型の薬剤の場合には，添加濃度を上昇させた効果は高温短時間処理よりも低温長時間処理の場合に著しいこと（ Fig. 6-4 ），同様に加熱温度を高めた場合には殺菌濃度指数が顕著に低下すること（ Fig. 6-7 ）から，低濃度長時間処理の方が高濃度短時間処理よりも有効である。

第4節　要約

リン酸緩衝液（pH 7.0 ）中の *E. coli* の熱死滅に対する両性界面活性剤とソルビン酸の作用について，その動力学的特性を検討し，以下の結果を得た。

（1）加熱併用処理による細胞死滅の Arrhenius プロットから，両薬剤の作用特性に相違を認めた。両性界面活性剤の場合，その添加濃度の増加とともに死滅の Ea および ΔH^*，ΔS^* が著しく低下したのに対し，ソルビン酸ではその濃度が増加してもわずかの低下しか示さなかった。

（2）細胞死滅の薬剤濃度依存性についても作用特性の相違を認め，両性界面活性剤では加熱温度の上昇とともに殺菌濃度指数が著しく低下したのに対し，ソルビン酸の場合にはほぼ一定値をとることが判明した。

（3）両性界面活性剤の作用はエンタルピー－エントロピー補償則に従い，補償温度は 60.9°C で実験温度に近い値を示すが，ソルビン酸では実験温度を越えるほど大とみなすことができた。また臨界有効濃度を定義し，この値は前者では 114 μg/ml であったが，後者の場合は極めて高いものと考えた。

（4）細胞死滅における補償温度の相対的な値に基いて，一般に加熱併用効果を有する数種の薬剤を，両性界面活性剤型とソルビン酸型の二類型に分類することができた。

（5）得られた結果から，加熱殺菌と薬剤との併用における有用な処理条件を導いた。

総括および結論

食品などの殺菌・防腐手段としては多くの化学的，物理的方法があるが，とくに加熱処理と薬剤処理は一般に広く利用されている。しかし，これらの処理は，品質低下，二次汚染，人体に対する安全性などの点でそれぞれ得失があり，これらがしばしば問題となる。そこで，欠点を補い合い，しかも相剰殺菌・防腐効果も期待できる両者の併用が考えられ，すでに多くの薬剤について，その加熱併用効果が報告されてきている。現在，実際にナイシンをこの目的で使用許可している国もある。

この併用処理の実用にあたっては，その要因についての充分な理解が必要であるが，現在のところ，その検討例はほとんど見当らない。薬剤の作用は温度の上昇とともに増大するが，ある温度以上では微生物細胞の熱損傷がおこるため，その効果が著しく高められることが予測される。したがって，薬剤の加熱併用効果の要因解明のためには，薬剤の作用機作とともに細胞の熱損傷機構についての知見が必須である。しかしながら，微生物細胞の熱損傷については，酵素失活，細胞膜透過性の変化，RNA の低分子化，DNA 鎖の切断など細胞の多くの部位の傷害が挙げられており，その致死的要因は未だ明らかでない。

以上の観点から，本研究ではまず，熱殺菌の基本的な問題の一つである微生物細胞の熱損傷とその回復の機構を調べ，次いでその得られた結果を基に，熱殺菌における薬剤

併用効果について実用上の基礎的知見を得ることを目的とし，その作用の要因ならびに特性について検討を行なった。ここで得られた成果は次のように総括，結論される。

第1章では，酵母の *C. utilis* と細菌の *E. coli* を用い，その熱損傷と回復について検討した。*C. utilis* 細胞を 45°C ～ 60°C で加熱すると，生菌数の低下とともに細胞内の各種の物質が漏出することを認め，細胞膜透過性の傷害を明らかにした。また，RNA の低分子化がおこることも認めた。さらに，半致死的条件での加熱処理（45°C，15分）により，コロニー形成培地中の 7 % 食塩に対する耐性が低下した加熱損傷菌が出現すること，そしてこの低下した耐性は，加熱後 30°C のリン酸緩衝液中での保温により，次第に回復することを認めた。食塩耐性の低下を *E. coli* についても観察し，この耐性の回復は，加熱後 nutrient broth あるいはカザミノ酸を含むリン酸緩衝液中，37°C での保温によっておこった。阻害剤を用いた実験から，この食塩耐性の回復には RNA 合成および ATP 合成が関与し，DNA 合成，蛋白合成，細胞壁合成は関与しないものと考えた。

第2章では，脱イオン水中の *E. coli* の熱死滅が，加熱前歴因子としての昇温プロセスによって顕著に影響を受ける事実を見出し，この効果の要因について検討した。*E. coli* の 50°C における熱死滅は，0°C からの緩慢昇温，あるいは 45°C 以下の一定温度での予備保温処理によって著しく低下した。この現象は，熱の物理的作用によるもの

ではなく，生理学的な変化に基くことを明らかにし，細胞はみかけ上，昇温プロセス中に耐熱性を獲得することを示した。加熱中のRNAの低分子化およびDNAの一本鎖切断には昇温プロセスの効果が認められなかったが，リポ多糖体の遊出に差異が見出された。また，予備保温処理中，細胞内のATPレベルが上昇することを見出したことから，細胞表層の変化およびエネルギーレベルの変化が昇温プロセスの効果の要因の一つと考えられた。加熱中およびその後の液体培地での回復処理におけるATPレベルについての検討結果から，このATPレベルの変動は直接コロニー形成能と相関せず，細胞回復機能として重要と思われるエネルギー変換系の傷害に関連するものと推察した。

才1，2章の結果から，Fig. C-1に示したように，微生物細胞は加熱によって損傷を受け，さらには死滅すると考えられるが，損傷細胞の少なくとも一部は，加熱後適当な条件で回復でき，栄養条件が充足していればさらに増殖すると考えられる。そこで，このような細胞の熱損傷とその回復の機構を基礎に，以下，それぞれ実用上問題となる微生物を対象に，3種のモデルの薬剤を用い，その加熱併用効果の要因について検討を行なった。

才3章では，酸性食品において問題となる酵母の一種，*C. utilis*に対する防腐剤，ソルビン酸の加熱併用効果をとりあげ，その抗菌作用機作についての検討を基礎に，併用効果の要因を調べた。まず，ソルビン酸による酵母細胞の内生呼吸と基質酸化の促進およびATP合成の抑制を認め

たことから，その作用部位として酸化的リン酸化を示唆した。次に，*C. utilis* の加熱によるコロニー形成能の低下は，常温では殺菌作用を示さないソルビン酸によって著しく促進されることを確認した。ソルビン酸は，細胞内物質の漏洩やRNAの低分子化など加熱中の細胞損傷には作用しないが，加熱による細胞内ATPレベルの低下を促進し，呼吸活性の回復も抑制されたことから，この薬剤は細胞の損傷修復能の低下をもたらし，主に回復のプロセスに作用するものと結論した。

第4章では，代表的な汚染指標菌である *E. coli* を対象に，過去において食品防腐剤としての利用が検討された抗生物質，タイロシンの加熱併用効果を検討した。この加熱併用処理では殺菌効果は認められないが，加熱後，液体培地における増殖の速度が，常温では比較的弱い作用しか示さない濃度のタイロシンで著しく阻害されることを見出した。加熱細胞に対する薬剤添加時期の影響，併用処理細胞に対する阻害作用の可逆性，EDTA 処理細胞に対する作用，加熱による薬剤分子の細胞内移行の増大など一連の検討結果から，タイロシンは細胞膜の薬剤透過障壁の熱破壊によって細胞内へ多量移行し，主に細胞の損傷回復後の増殖プロセスに作用するものと推察した。

第5章では，耐熱，耐薬剤性などの点で最も問題となる細菌胞子を対象に，両性界面活性剤の加熱併用効果について調べた。リン酸緩衝液中の *B. subtilis* var. *niger* 胞子の熱死滅は，常温ではほとんど殺菌作用を示さない濃度の両

性界面活性剤により著しく増大することを明らかにした。この薬剤は加熱による食塩耐性低下を著しく促進するとともに，蛋白質やジピコリン酸などの胞子内成分の漏洩も顕著に促進する事実を認めたことから，両性界面活性剤は主に，胞子表層の熱損傷を拡大し，加熱中の損傷および死滅のプロセスに作用するものと結論した。

以上のように，それぞれ対象とする微生物の種類は異なるが，調べた種の薬剤の加熱併用効果における作用要因は異なり，Fig. C-1 にまとめたように，加熱処理細胞のそれぞれ異ったプロセスに作用するものと考えられた。

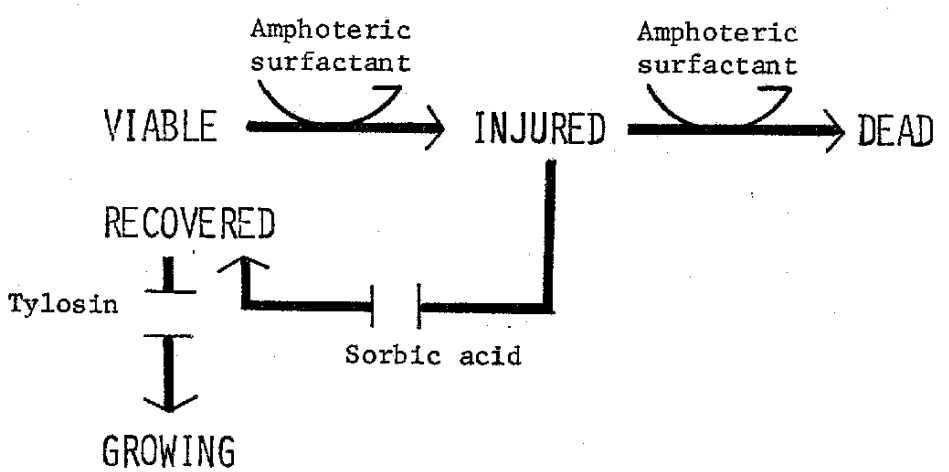

Fig. C-1. Schematic representation of the mode of action of antimicrobial agents on heated microbial cells.

最後に才6章では，加熱併用効果における薬剤作用の動力学的特性を調べ，*E. coli* の熱死滅に対する両性界面活性剤とソルビン酸の作用の温度依存性および薬剤濃度依存性に相対的な差異を見出した。すなわち，前者の薬剤では薬剤濃度の上昇にともなう死滅反応の活性化エンタルピー，活性化エントロピーの減少，加熱温度の上昇にともなう殺菌濃度指数の低下があるが，一方，後者の薬剤の場合にはそれらの値の変動が極めて少ないことを明らかにした。また，両性界面活性剤の作用についてエンタルピー－エントロピー補償効果の存在を示し，その補償温度（60.9°C ）および新にに定義した臨界有効濃度（ 114 μg/ml ）の値を求め，これらは相対的に実験範囲に近い値であることを認めた。しかし，ソルビン酸の作用におけるこれらの値は，いずれも実験範囲を越えるほど大とみなすことができた。さらに，一般に加熱併用効果を有する薬剤を，その作用の温度依存性から両性界面活性剤型とソルビン酸型の二類型に分類するとともに，加熱殺菌における薬剤併用についての有用な処理条件を導いた。

微生物細胞の熱損傷機構，さらには熱死滅の要因の解明は極めて難解な問題であるが，これは加熱殺菌研究の基本的命題の一つであり，ここで得られた成果は，薬剤の加熱併用効果の要因追求の基礎を与える一方，その一つの道を開くもので，とくに昇温プロセスの効果に関する研究は，新たなアプローチとして今後の検討が待たれるものである。さらにこれに関する研究結果は，実用面においても，微生

物の耐熱性試験においてはその温度変化を考慮すべきこと，また食品の品質低下を防止するために利用されている高温短時間加熱殺菌法が，殺菌効果の点でも有効なことを指摘している。

食品汚染微生物に対する加熱と薬剤の併用処理は，多くの点で有用な防腐・殺菌法で，今後，食品のみならず，医療関係やその他の環境殺菌の分野でも，その発展的利用が期待される。本研究で得られた成果は，その実用の基礎をなすものである。とくに，加熱併用処理における薬剤の作用の補償温度や臨界有効濃度は，その効果の特性を短的に評価できる指標として利用できるであろう。

文　献

1) 芝崎：食品殺菌工学，第2版，11，光琳書院 (1969).

2) Rose, A. H.: Thermobiology, Academic Press (1967).

3) Farrell, J., Rose, A. H.: Ann. Rev. Microbiol., 21, 101 (1967).

4) 大島編：蛋白質核酸酵素，20，161 (1975).

5) 大島：生化学，46，887 (1974).

6) Farrell, J., Campbell, L. L. : Adv. Microbial Physiol., 3, 83 (1969).

7) 芝崎：新しい食品の殺菌・除菌技術，光琳書院 (1976).

8) Crisan, E. V.: Mycologia, 65, 1171 (1973).

9) Gould, G. W., Dring, G. J.: Adv. Microbial.Physiol., 11, 137 (1974).

10) Roberts, T. A., Hitchins, A. D.: The Bacterial Spore (ed. Gould, G. W., Hurst, A.), 611, Academic Press (1969).

11) Hershey, A. D.: J. Bacteriol., 38, 563 (1939).

12) Nelson, F. E.: J. Bacteriol., 45, 395 (1943).

13) Heinmatz, F. Taylor,W. W., Lehman, J.J.: J. Bacteriol., 67, 5 (1954).

14) Allwood, M. C., Russell, A. D.: Adv. Appl. Microbiol., 12, 89 (1970).

15) Straka, R. P., Stokes, J. L.: J. Bacteriol., 78, 181 (1959).

16) 森地：凍結・乾燥と細胞障害（根井編），45 (1970).

17) 森地：食衛誌，13，173 (1972).

18) Allwood, M. C., Russell, A. D.: Appl. Microbiol., 15, 1266 (1967).

19) Russell, A. D., Harries, D.: Appl. Microbiol., 15, 407 (1967).

20) Allwood, M. C., Russell, A. D.: J. Bacteriol., 95, 345 (1968).

21) Strange, R. E., Shon, M.: J. Gen. Microbiol., 34, 99 (1964).

22) Iandolo, J. J., Ordal, Z. J.: J. Bacteriol., 91, 134 (1966).

23) Sogin, S. J., Ordal, Z. J.: J. Bacteriol., 94, 1082 (1967).

24) Welker, N. E.: The Survival of Vegetative microbes (Gray, T. R. G., Postgate, J. R.), 241, Cambridge Univ. Press (1976).

25) Russell, A. D., Harries, D.: Appl. Microbiol., 16, 1394 (1968).

26) Clark, C. W., Witter, L. D, Ordal, Z. J.: Appl. Microbiol., 16, 1764 (1968).

27) Haight, R. D., Ordal, Z. J.: Can. J. Microbiol., 15, 15 (1969).

28) Rosenthal, L. J., Iandolo, J. J.: J. Bacteriol., 103, 833 (1970).

29) Tomlins, R. I., Ordal, Z. J.; J. Bacteriol., 105, 512 (1971).

30) Tomlins, R. I., Ordal, Z. J.: J. Bacteriol., 107, 134 (1971).

31) Rosenthal, L. J., Martin, S. E., Pariza, M. W., Iandolo, Z. J.: J. Bacteriol., 109, 243 (1972).

32) Miller, L. L., Ordal, Z. J.: Appl. Microbiol., 24, 818 (1972).

33) Gray, R. J. H., Witter, L. D., Ordal, Z. J.: Appl. Microbiol., 26, 78 (1973).

34) Bhaumik, G., Bhattacharjee, S. B.: Can. J. Microbiol., 21, 1274 (1975).

35) Bridges, B. A., Ashwood-Smith, M. J., Manson, R. J.: J. Gen. Microbiol., 58, 115 (1969).

36) Woodcock, E., Grigg, G. W.: Nature New Biol., 237, 76 (1972).

37) Gomez, R. F., Sinskey, A. J.: J. Bacteriol., 115, 522 (1973).

38) Hurst, A., Hughes, A., Collins-Thompson, D. L., Shah, B. G.: Can. J. Microbiol., 20, 1153 (1974).

39) Hurst, A., Highes, A.: J. Gen. Microbiol., 89, 277 (19 75).

40) Rosenberg, B., Kemeny, G. Switzer, R., Hamilton, T.: Nature, 232, 471 (1971).

41) York, G. Y.: Appl. Microbiol., 14, 451 (1966).

42) Michener, H. D., Thompson, P. A., Lewis, J. C., Appl. Microbiol., 7, 166 (1959).

43) O'Brien, R. T., Titus, D. S., Devlin, K. A., Stumbo, C. R., Lewis, J. C.: Food Technol., 10, 352 (1956).

44) Heinemann, B., Voris, L., Stumbo, C. R.: Food Technol., 19, 592 (1965).

45) Denny, C. B., Bohrer, C. W.: Food Res., 24, 247 (1959)-

46) Wyatt, L. R., Waites, W. M.: J. Gen. Microbiol., 89, 337 (1975).

47) Cheng, M. K. C., Levin, R. E.: J. Food Sci., 35, 62 (19 70).

48) Han, Y. W., Schuyten, H. A., Callihan, C. D.: J. Food Sci., 36, 335 (1971).

49) Duncan, C. L., Foster, E. M.: Appl. Microbiol., 16, 401 (1968).

50) King, A. D., Michener, H. D., Ito, K. A.: Appl. Microbiol., 18, 166 (1969).

51) Kohl, F.: Food Technol., 25, 1176 (1971).
52) McConnell, J. E. W., Collier, C. P.: Food Eng. 34, (12), 96 (1962).
53) Liu, T. S., Howard, G. L., Stumbo, C. R.: Food Technol., 22, 86 (1968).
54) Kuzminsky, L. N., Howard, G. L., Stumbo, C. R., J. Food Sci., 34, 561 (1969).
55) Lategan, P. M., Vaughn, R. H.: J. Food. Sci., 29, 339 (1964).
56) Ito, K. A., Denny, C. B., Brown, C. K., Yao, M., Seeger, M. L.: Food Technol., 27, 58 (1973).
57) Toledo, R. T., Chapman, J. R.: Food Technol., 27, 68 (1973).
58) Toledo, R. T., Escher, F-E., Ayres, J. C.: Appl. Microbiol., 26, 592 (1973).
59) Garibardi, J. A.: Food Technol., 22, 1031 (1968).
60) Eller, C., Edwards, F. F., Wynne, E. S.: Appl. Microbiol., 16, 349 (1968).
61) Robinson, J. F., Hills, C. H.: Food Technol., 13, 251 (1959).
62) Trujillo, R., David, T. J.: Appl. Microbiol., 23, 618 (1972).
63) Sierra, G., Boucher, R. M. G.: Appl. Microbiol., 22, 160 (1971).
64) Thomas, S., Russell, A. D.: Appl. Microbiol., 28, 331 (1974).
65) 天羽：醸工, 36, 521 (1958).
66) Splittstoesser, D. F., Lienk, L. L., Wilkinson, M., Stamer, J. R.: Appl. Microbiol., 30, 369 (1975).
67) Parkinson, J. C., Pickett, J. M.: J. Appl. Bact., 27,

471 (1964).

68) Brigges, A., Yazdany, S.: J. Appl. Bact., 37, 623 (1974).

69) Rode, L. J., Foster, J. W.: Arch. Microbiol., 36, 67 (1960).

70) El-Bisi, H. M., Ordal, Z. J., Nelson, A. I.: Food Res., 20, 554 (1955).

71) Garibaldi, J. A., Ijichi, K., Bayne, H. G.: Appl. Microbiol., 18, 318 (1969).

72) Amaha, M., Ordal, Z. J.: J. Bacteriol., 74, 596 (1957).

73) Deasy, P. B., Küster, E., Timoney, R. F.: Appl. Microbiol., 22, 567 (1971).

74) Michener, H. D.: J. Bacteriol., 70, 192 (1955).

75) O'Brien, R. T., Titus, D. S.: J. Bacteriol., 70, 487 (1955).

76) Evison, L. H., Rose, A. H.: J. Gen. Microbiol., 40, 349 (1965).

77) Ron, E. Z., Davis, B. D.: J. Bacteriol., 107, 391 (1971).

78) Ron, E. Z., Shani, M.: J. Bacteriol., 107, 397 (1971).

79) Iandolo, J. J., Ordal, Z. J., Witter, L. D.: Can. J. Microbiol., 10, 808 (1964).

80) Stiles, M. E., Witter, L. D.: J. Dairy Sci., 48, 677 (1965).

81) Clark, C. W., Ordal, Z. J.: Appl. Microbiol., 18, 332 (1969).

82) Mukherjee, P., Bhattacharjee, S. B.: J. Gen. Microbiol., 60, 233 (1970).

83) Bridges, B. A., Ashwood-Smith, M. J., Munson, R. J.: Biochem. Biophys. Res. Commun., 35, 193 (1969).

84) Gomez, R. F., Sinskey, A. J., Davies, R., Labuza, T. P.: J. Gen. Microbiol., 74, 267 (1973).

85) Ganesan, A. K., Smith, K. C.: Cold Spring Harbor Symp. Quat. Biol., 33, 235 (1968).
86) Nash, C. H., Sinclair, N. A.: Can. J. Microbiol., 14, 691 (1968).
87) Baldy, R. W., Sommer, N. F., Buckley, P. M.: J. Bacteriol., 102, 514 (1970).
88) Brown, A. H.: Arch. Biochem., 11, 269 (1946).
89) Hodge, J. E., Hofreiter, B. T.: Methods in Carbohydrate Chemistry (ed. Whistler, R. L., Wolfrom, M. L.), 1, 380, Academic Press (1962).
90) Stumbo, C. R.: Thermobacteriology in Food Processing, 2nd ed., 70, Academic Press (1973).
91) 土戸：修士論文 (1971).
92) 米虫，高田，照井：醗工，44, 543 (1966).
93) Nozawa, R., Horiuchi, T., Mizuno, D.: Arch. Biochem. Biophys., 118, 402 (1967).
94) Kaplan, R., Apirion, D.: J. Biol. Chem., 250, 1854 (1975).
95) Hansen, N. H., Rieman, H.: J. Appl. Bact., 26, 314 (1963).
96) Brown, M. R. W., Melling, J.: Inhibition and Destruction of the Microbial Cell (ed. Hugo, W. B.), 8, Academic Press (1971).
97) 柴崎：食品保蔵（桜井，満田，柴崎編）才10版，146，朝倉書店 (1974).
98) 照井：醗工，44, 534 (1966).
99) Schneider, W. C.: J. Biol. Chem., 164, 747 (1946).
100) Kato, T., Kondo, S.: J. Bacteriol., 104, 871 (1970).
101) Osborn, M. J., Gander, J. E., Parisi, E., Garson, J.: J. Biol. Chem., 247, 3962 (1972).

102) Fields, K. L., Luria, S. E.: J. Bacteriol., 97, 57 (1969).
103) Foulds, J.: J. Bacteriol., 107, 833 (1971).
104) Leive, L.: Ann. New York Acad. Sci., 235, 109 (1974).
105) Strange, R. E., Wade, H. E., Dark, F. A.: Nature, 199. 55 (1963).
106) 香川, 曽根, 平田, 吉田：蛋白質核酸酵素, 20, 318 (1975).
107) Evans, Jr., D. J.: J. Bacteriol., 100, 914 (1969).
108) Gooding, C. M.: U. S. Patent No. 2, 294 (1945).
109) Melnick, D., Luckmann, E. H., Gooding, C. M.: Food Res., 19, 33 (1954).
110) Leffler, J. E.: J. Org. Chem., 20, 1202 (1955).
111) Whitaker, J. R.: Food Res., 24, 37 (1959).
112) York, G. K., Vaughn, R. H.: J. Bacteriol., 88, 411 (1964).
113) Azukas, J. J. Costilow, R. N., Sadoff, H. L.: J. Bacteriol., 81, 189 (1961).
114) Palleroni, N. J. De Pritz, M. J. R.: Nature, 185, 688 (1960).
115) Harada, K., Higuchi, R. Utsumi, I.: Agr. Biol. Chem., 32, 940 (1968).
116) 芝崎, 飯田：食品工誌, 15, 447 (1968).
117) 寺田, 村岡：蛋白質核酸酵素, 18, 911 (1973).
118) Mitchell, P.: Comprehensive Biochemistry (ed. Florlcin, M., Stotz, E. H.), 14, 327 (1967).
119) 若井, 岩田：New Food Industry, 7, 48 (1965).
120) 芝崎：醗工, 45, 783 (1967).
121) Mao, J. C. -H., Wiegand, R. G.: Biochim. Biophys. Acta, 157, 404 (1968).

122) Suzuki, M., Okazaki, M., Shibasaki, I.: J. Ferment. Technol., 48, 525 (1970).
123) Kageyama, B., Okazaki, M., Shibasaki, I.: J. Ferment. Technol., 49, 747 (1971).
124) Sinskey, T. J., Silverman, G. J.: J. Bacteriol., 101, 429 (1970).
125) Leive, L.: Proc. Natl. Acad. Sci. U. S., 53, 745 (1965).
126) 深田：生物物理，16, 194 (1976).
127) Garrett, E. R., Miller, G. H., Brown, M. R. W.: J. Pharm. Sci., 55, 593 (1966).
128) Garrett, E. R., Notle, H.: Chemother., 17, 81 (1972).
129) Mielck, J. B., Garrett, E. R.: Chemother.,14, 337 (1969).
130) Leive, L.: J. Biol. Chem., 243, 2373 (1968).
131) MaCalister, T. J., Costerton, J. W., Cheng, K. -J.: Antimicrob. Ag. Chemother., 1, 447 (1972).
132) Mao, J. C. -H., Putterman, M.: J. Bacteriol., 95, 1111 (1968).
133) White, R. J., Lancini, G.: Biochim. Biophys. Acta, 240, 429 (1971).
134) 中村：蛋白質核酸酵素，18, 710 (1973).
135) Tamaki, S., Sato, T., Matsuhashi, M.: J. Bacteriol., 105, 968 (1971).
136) Rogers, D.: Biochim. Biophys. Acta, 230, 72 (1971).
137) Lawrence, C. A.: Disinfection, Sterilization, and Preservation (ed. Lawrence, C. A., Block, S. S.), 430, Lea & Fabiger (1968).
138) 芝崎：食品殺菌工学，才2版，218，光琳書院 (1967).
139) Sykes, G.: J. Appl. Bact., 33, 147 (1970).
140) Lowry, O. H., Rosenberg, N. J., Farr, A. L., Randall,

R. J.: J. Biol. Chem., 193, 265 (1951).
141) Jannssen, F. W., Lund, A. J., Anderson, L. E.: Science, 127, 26 (1958).
142) 堀口: 合成界面活性剤, 68, 三共出版 (1970).
143) Roberts, T. A.: J. Appl. Bact., 33, 74 (1970).
144) Cook, A. M., Gilbert, R. J.: J. Appl. Bact., 32, 96 (1968).
145) Salton, M. R. J.: J. Gen. Microbiol., 5, 391 (1951).
146) Hamilton, W. A.: Inhibition and Destruction of the Microbial Cell (ed. Hugo, W. B.), 86, Academic Press (1971).
147) Russell, A. D.: Inhibition and Destruction of the Microbial Cell (ed. Hugo, W. B.), 451, Academic Press (1971).
148) Walker, H. W., Matches, J. R.: J. Food Sci., 30, 1029 (1965).
149) 門田: 耐久型細胞 (蜂須賀, 堀越編), 168, 岩波書店 (1976).
150) Murrell, W. G.: The Bacterial Spore (ed. Gould, G. W., Hurst, A.), 215, Academic Press (1969).
151) 芝崎, 照井: 醗工, 40, 125 (1962).
152) Aiba, S., Humphrey, A. E., Millis, N. F.: Biochemical Engineering, 186, Univ. of Tokyo Press (1965).
153) Glasstone, S., Laidler, K., Eyring, H.: The Theory of Rate Processes, McGraw-Hill (1941).
154) Watson, H. E.: J. Hyg., 8, 536 (1908).
155) Ernst, R. R.: Disinfection, Sterilization, and Preservation (ed. Lawrence, C. A., Block, S. S.), 703, Lea & Fabiger (1968).
156) Barnes, R., Vogel, H., Gordon, I.: Proc. Natl. Acad. Sci. U. S., 62, 263 (1969).
157) Lumry, R., Rajender, S.: Biopolymers, 9, 1125 (1970).
158) 卜部: 学位論文, 40 (1974).

159) Elizondo, H., Labuza, T. P.: Biotechnol. Bioeng., 16, 1245 (1974).

謝　　辞

本研究を行なうにあたり，終始御指導を賜った恩師，大阪大学工学部教授，芝崎　勲先生に厚く御礼申し上げます。また有益な御指導，御助言を頂いた同産業科学研究所教授，原田篤也先生，同工学部教授，岡田弘輔先生をはじめ，同教授，合葉修一先生，田口久治先生，大嶋泰治先生，市川邦介先生，ならびに日々御指導，御激励頂いた同助教授，高野光男先生，江夏敏郎先生，同薬学部助教授，岡崎光雄先生に深く感謝致します。

また研究に御協力頂いた中川良勝，鈴木貫八郎，小沢修，神田かよみ，西川季公子，加藤正樹，田原照久の各氏に謝意を表します。

本論文に関係ある主な報告

1. 微生物の加熱損傷に対する薬剤併用効果について（第1報） *Candida utilis* の加熱損傷とその回復

   醗酵工学雑誌 50, 93 (1972)

2. 微生物の加熱損傷に対する薬剤併用効果について（第2報） *Candida utilis* の加熱損傷に対するソルビン酸の併用効果の機構

   醗酵工学雑誌 50, 341 (1972)

3. Enhancing Effect of Chemicals on the Thermal Injury of Microorganisms

   Acta Alimentaria 2, 327 (1973)

   (International Union of Food Science and Technology Sumposium on Combination Treatments in Food Preservation, Budapest, 1972.)

4. Effect of Temperature-Elevating Process on the Subsequent Isothermal Death of *Escherichia coli* K-12

   J. Ferment. Technol., 52, 788 (1974)

5. Growth Inhibition of Heated Cells of *Escherichia*

coli by Tylosin

J. Ferment. Technol., 53, 363 (1975)

6. Enhancement of Spocicidal Activity of an Amphoteric Surfactant by Heating

J. Ferment. Technol., 53, 862 (1975)

7. Two Distinct Kinetics of Microbial Death in Combined Effect of Heat and Antimicrobial Agents

in press

(The 1st International Congress of Engineering and Food, Boston, 1976)