

## 文 献

- 1) 小瀬洋喜, 池田坦: 食衛誌, **5**, 206 (1964)
- 2) 小瀬洋喜, 池田坦, 古山嘉美, 高木勇: 食衛誌, **6**, 513 (1965)
- 3) 花田信次郎: 日本薬学会東海支部9月例会講演 (静岡・1967)
- 4) 花田信次郎: 日本薬学会東海支部第16回総会講演 (名古屋・1967)
- 5) 日高富男, 坂井稔: 食衛誌, **6**, 235 (1965)
- 6) 安永統男: 食衛誌, **8**, 325 (1967)
- 7) 坂崎利一: “腸内細菌の簡易なしらべ方” (1962) モダンメディア社刊
- 8) 徳重晴雄; 飯田豊: 神戸市衛研報, **2**, 103 (1960)
- 9) 児玉威: 食品衛生研究, **13**, (6), 98 (1963)
- 10) 安永統男: 食衛誌, **8**, 501 (1967)
- 11) 善養寺浩: 藤野恒三郎等編 “腸炎ビブリオ” 181 (1964) 一成堂刊

小瀬洋喜, 高木 勇\*: 糞便中の腸炎ビブリオに関する研究 (第4報)  
高静水圧に対する腸炎ビブリオ類似菌の耐圧性ならびに電子顕微鏡像

**Youki Ose and Isamu Takagi: Studies on the *Vibrio parahaemolyticus*  
Isolated from Excrements. (IV)**

**Electron-Microscopic Structure of Related Bacteria to *Vibrio parahaemolyticus*  
under Static High-Pressure and the Ability of Resistance  
for Static High-Pressure**

Synopsis

In previous report, the hypothesis about the biocycle of *Vibrio parahaemolyticus* was discussed. In that hypothesis, contamination of sea-water and subsoil by *Vibrio parahaemolyticus* will be occurred by folling out night-soil to sea water.

When *Vibrio parahemolyticus* folled and reached to subsoil, at the bottom of the sea they get the pressre by the depth of sea water.

In this report, we studied the effect of the presser by the depth of water to microbes. The ability of resistance to high pressure was studied, and the electron-microscopic structure under high pressure was observed. Critical pressure were ..... 2,000 Kg/cm<sup>2</sup> · 150 min., 2500 Kg/cm<sup>2</sup> · 60 min., 3,000 Kg/cm<sup>2</sup> · 30 min., 3500 Kg/cm<sup>2</sup> · 15 min., 4,000 Kg/cm<sup>2</sup> · 10 min., 5,000 Kg/cm<sup>2</sup> · 5 min., the electron-microscopic structure shown in Fig. 2—4.

Tested microbes were isolated from night-soil, and the nature of them were identified with standerd strain of *Vibrio parahaemolyticus* except the only nature of growthing in 1% pepton broth. They have pathologeneicity for mice.

1. まえがき

腸炎ビブリオが近海泥土中から多く検出されているが、これは海洋に投棄された汲取り尿の沈殿物に関連があ

\* 岐阜大学医学部 (Faculty of Medicine, Gifu University: Tsukasamachi, Gifu)

のではないかと推測のもとに、筆者は先に、腸炎ビブリオの生活環について新らたなる仮説を提出した<sup>1),2)</sup>。そして花田はこの仮説に示したし尿の海洋投棄による腸炎ビブリオ汚染を海洋実験で確認した<sup>3),4)</sup>。

腸炎ビブリオは近海泥土中から検出されているが、深海についての検出例はない。これは深水層の水温が極めて低いものによるのか、高水圧下での生存が不可能であるからなのか、あるいは検体採取上の問題なのかは明らかでない。

深海の海底土中の微生物については A. E. KrIcc<sup>5)</sup> が黒海、オホーツク海の 2,000~3,000 m の深海泥土についての調査を行ない、1g の泥土中に 100~1000×10<sup>6</sup> 程度の微生物を検出し、海底の表層中の微生物数は大陸棚でも深海底でも、それほど少くはないとのべている。

水中では水深 10m ごとにおよそ 1 kg/cm<sup>2</sup> 相当の水圧が加わるので深海中の生物は相当の高圧をうけることになる。生物が高水圧下でどんな反応を示すかということは、深海生物学上の関心事であったが、海洋投棄をうけたし尿粒に腸炎ビブリオが附着して深海底に到達したときの態度は、食中毒防止上も、生活環を解明するうえでも重要な知見となる。清掃法による尿投棄区域は黒潮の潮流にのる区域を目標として定められ、また大阪湾などの近海もあって、海底の様相は一樣ではないが、殊に深海海底での調査は今日まで充分なものとはいえない。

Johnson<sup>6)</sup> らは 1,000kg/cm<sup>2</sup> の水圧が支配している深海から採取した細菌は、1000kg/cm<sup>2</sup> の水圧で、温度の高低にかかわらず、平圧下よりも著しく繁殖すると報告し、ZoBell<sup>7)</sup> らは海棲細菌の中には高圧下においては分裂して増殖せずに糸状に長く伸びるものがあり、これは平圧にかえるとすぐ糸状が切れて短い桿状になるらしいと報じている。一方、微生物が高圧によってうける影響については、市橋<sup>8),9)</sup>、舟岡・高木<sup>10),11)</sup> らが電子顕微鏡によって観察している。

深海海底での腸炎ビブリオの生態については今後の検討がまたれるところであるが、その際にうけるべき高静水圧の影響の知る目的で本研究を行なった。

## 2. 実 験

### I. 実験材料

前報<sup>1)</sup>に準じて岐阜市内の汲取便所からバキュームカーによって集められたし尿を検体とし、指針に従って腸炎ビブリオの分離を行なった。試料は昭和 39 年 11 月 4 日採取した。

この際分離した菌は 1% ペプトン水にやや生育する点で、腸炎ビブリオ標準株と異なっていたが、他の諸性質については全く一致し、マウスに対する毒性を持っていた。このことは前報にも考察したように、安永の知見にもとづけば、好塩性を示す条件があたえられれば腸炎ビブリオの性質を示すことになるものと考えられる。その確認を行なっていないので、本報では一応類似菌であるとする。

### II. 高静水圧力による加圧方法

(1) 検体：3% NaCl 液に菌を浮遊させ、ほぼ 10% としたものを原液とし、その 1 部を対照試料、他の 1 部を加圧試料とした。

菌濃度の調整は、菌を 3% NaCl 加ブイオン培地に 18 時間培養し、その 0.5 ml をとつて 3% NaCl 加普通寒天培地上に注加し、18 時間培養したものを集菌し、これを 3% NaCl 液中に浮遊させたものにつき生菌数を計測することを繰り返す。数回の実験によって肉眼的観察によってもほぼ 10<sup>9</sup>/ml に調整することに成功した。実験の都度対照の菌濃度を測定し、その濃度の著しく異なるものは除外した。

(2) 加圧器：パスカルの原理を応用した油圧による加圧器<sup>11)</sup>を用いた。本器では最高 10,000 kg/cm<sup>2</sup> ま加圧可能である。

(3) 加圧法：滅菌した薄いゴム製の袋に浮遊液を入れ、固くしばったのち、水を満たした加圧器内に浮かべ、油圧

器により一定圧、一定時間の加圧を行なった後、速やかに(約1秒)平圧にもどして加圧器内より試料を取り出し、対照の菌液と同条件で希釈培養後菌数をかぞえた。

### Ⅲ. 菌数計算

対照菌および加圧菌をそれぞれ3% NaCl液を用いて10倍希釈法により順次希釈し、それぞれ0.1 mlをシャーレに注入し、3% NaCl加普通寒天平板培地で37°C定温器で培養後コロニーを計算した。

### Ⅳ. 電子顕微鏡による観察方法

耐圧性試験に用いた菌の一部を1,500 rpm, 30分間遠心分離し集菌したものを、N/15リン酸緩衝液の1%オスミウム酸(pH 7.4)で固定し、エタノール系列で脱水、メタクリル樹脂で包埋し、ウルトラミクロトームで超薄切片とし、日本電子 K.K. の電子顕微鏡で観察した。

## 3. 実験成績

### I. 耐圧性

菌浮游液に一定の静水圧を一定時間作用させた後、その生存菌数を計算して耐圧性を試験した。その結果をTable Iに示す。

Table 1. Relation between Pressure-Time and Number of Lived Bacteria

Pressure Kg/cm <sup>2</sup>	Time min.	Number of Bacteria before Pressed (in 1 ml)	Number of Bacteria after Pressed (in 1 ml)
2,000	60	10 <sup>9</sup>	8 × 10 <sup>5</sup>
	120	〃	3 × 10
	150	〃	0
2,500	30	〃	5 × 10 <sup>3</sup>
	45	〃	8 × 10
	60	〃	0
3,000	15	〃	9 × 10 <sup>3</sup>
	20	〃	6 × 10
	30	〃	0
3,500	5	〃	7 × 10 <sup>4</sup>
	10	〃	3 × 10
	15	〃	0
4,000	5	〃	4 × 10
	10	〃	0
4,500	5	〃	0
	5,000	5	〃

Table 1に示すように加圧前の菌濃度が10<sup>9</sup>であったものが2,000 kg/cm<sup>2</sup>・1時間の加圧では8 × 10<sup>5</sup>に減少し、2時間では更に3 × 10に減少を示し、2時間30分では菌数0となった。このように圧力を一定にした場合、加圧時間が長くなれば菌数は減少を示す。菌を死滅に至らしめたと考えられる臨界圧力と臨界時間とによって耐圧曲線を作ると Fig. 1 のようである。

Fig. 1には他の微生物の耐圧曲線も比較対照のために図示した。<sup>11)</sup> その結果 *Salmonella pullorum* とほぼ同じ耐圧性を示した。 *E. coli* (Kitasato 62) より弱く、 *Staphylococcus aureus* ようはるかに弱かった。しかし1,000kg/cm<sup>2</sup>以上の静水圧では実験範囲内の時間での生存率への影響をほとんど認めることができなかった。

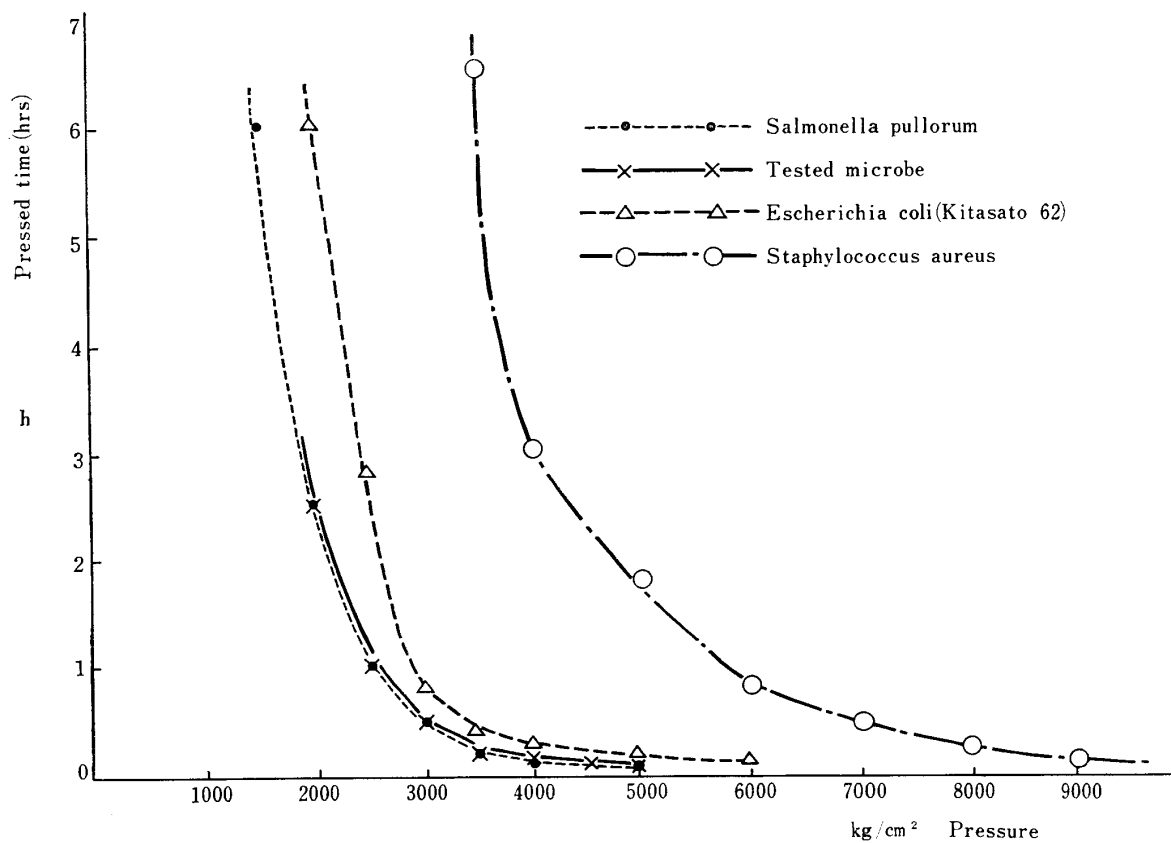


Fig.1 Critical Pressure of Microbes

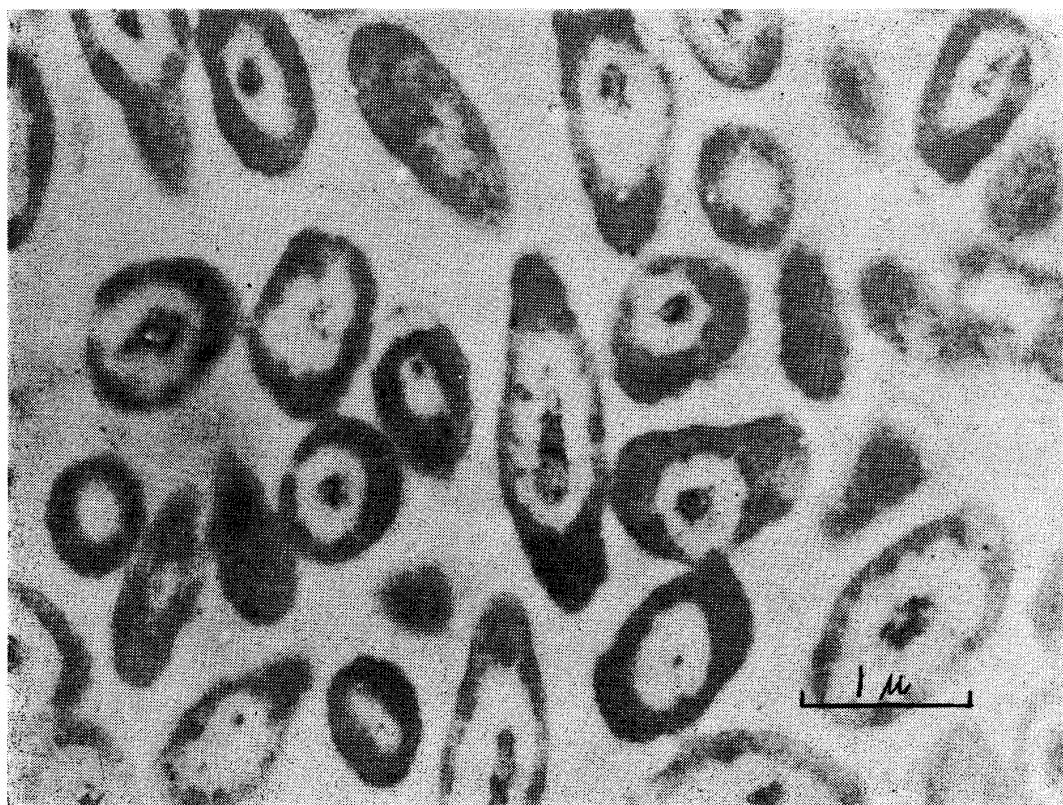


Fig. 2 Normal

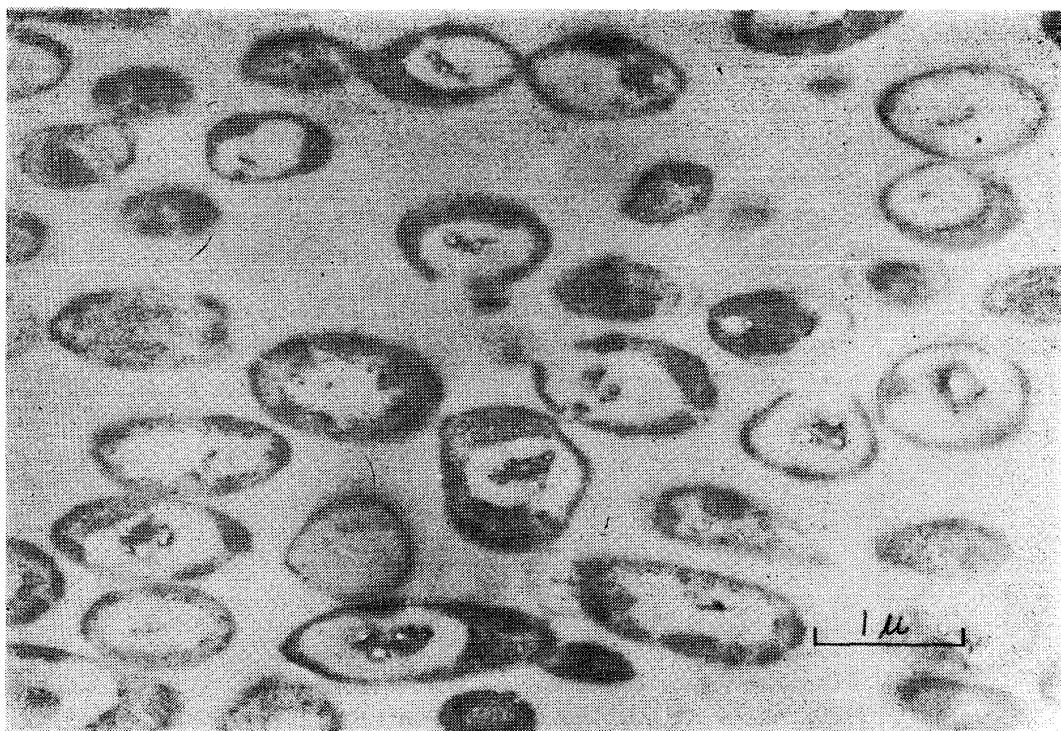


Fig. 3 3500 Kg/cm<sup>2</sup>, 20 min.

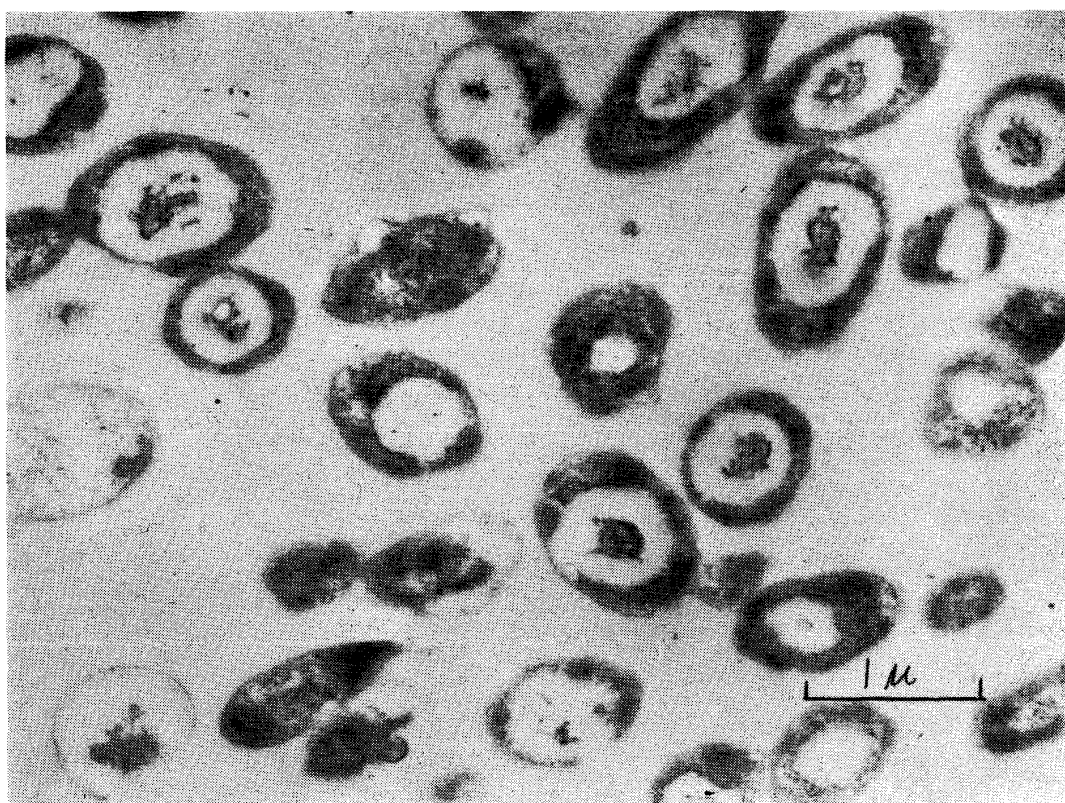


Fig. 4 6000 Kg/cm<sup>2</sup>, 10 min.

## II 電子顕微鏡像

腸炎ビブリオを加圧したときの菌体像の変化を観察した。Fig. 2は無処理の正常菌体像である。

3,500 kg/cm<sup>2</sup>・20分間加圧後の電子顕微鏡像を Fig. 3に示す。この条件は臨界圧をやや越えているが、無処理の正常菌に比べ菌体像に顕著な変化はない。しかし、細胞質などに電子密度の若干高いものが観察された。このように臨界圧をやや越える附近の加圧で顕著な変化が認められなかったのは *E. coli*<sup>11)</sup> の場合も同様であった。臨界圧をはるかに越えた6,000 kg/cm<sup>2</sup>・20分間加圧後の像は Fig. 4のようで、菌体が収縮して小さくなり、細胞質は若干凝集し、細胞膜が切断された様子が観察された。この傾向は *E. coli*<sup>11)</sup> の場合と同様であった。

## 4. 考 察

汲取り尿中に存在する腸炎ビブリオが海洋に投棄されて海底に到達した際、水圧をうけたときの状態を知る目的で実験を行ない、汲取り尿より分離した腸炎ビブリオ類似菌についてその耐圧性を検討した。

その結果、本菌の臨界圧は2,000 kg/cm<sup>2</sup>・2時間30分、2,500 kg/cm<sup>2</sup>・1時間、3,000 kg/cm<sup>2</sup>・30分、3,500 kg/cm<sup>2</sup>・15分、4,000 kg/cm<sup>2</sup>・10分、5,000 kg/cm<sup>2</sup>・5分であることを認めた。この臨界圧は *Sal. pullorum* と同じで、*E. coli* および *St. aureus* より弱い。

腸炎ビブリオの生息が知られている海底の深さは30m前後で2～3気圧にすぎず、著者らの実験した静水圧に比べれば非常に小さいので殆んど生存に対する影響はないものと考えられる。更に深海に到達した際にも10,000m程度までは殆んど水圧の影響はないものと考えられる。

深海海底の水温の低さがその生存に及ぼす影響は別に検討されなければならないが、本研究によって深海底ではその水圧の影響は殆んど無視し得ることを認めたので、今後、海底での腸炎ビブリオの生存を検討する際に示唆をあたえることになろう。

終りにのぞみ本研究に御指導御鞭撻をいただいた京都大学名誉教授岡省五博士に深謝申上げる。

本研究の要者は日本薬学会東海支部例会（1965. 6. 12・名城大薬学部）で発表した。

## 文 献

- 1) 小瀬洋喜, 池田坦: 食衛誌, **5**, (3), 206 (1964)
- 2) 小瀬洋喜, 池田坦, 古山嘉美, 高木勇: 食衛誌, **6**, (6), 513 (1965)
- 3) 花田信次郎: 日本薬学会東海支部42年9月例会(静岡)講演
- 4) 花田信次郎: 日本薬学会東海支部第16回総会講演(名古屋・1967)
- 5) アー・イエー・クリス(飯塚・山田訳): “海洋微生物学” 276 (1963) 技報堂
- 6) Johnson, F. and Lewin, I.: J. Cell. Comp. Physiol., **28**, 77 (1946)
- 7) ZoBell, C. and Oppenheimer, C.: J. Bact., **60**, 771 (1950)
- 8) 市橋太: 岡山医誌, **66**, 129 (1954)
- 9) 市橋太: 岡山医誌, **66**, 151 (1954)
- 10) 高木勇: 岐阜医紀, **12**, 75 (1964)
- 11) Funaoka, S., Takagi, I. and Furuyama, Y.: Lymphatologia Suppl., **2**, 17 (1964); 高木勇: 岐阜医紀, **13**, 10 (1965)
- 12) 小瀬洋喜: 本誌, **17**, 132 (1962)
- 13) 安永統男: 食衛誌, **8**, 501 (1967)