

addition to heat-injured spores, spores damaged by irradiation are more sensitive to the pH of the recovery medium than undamaged spores (Farkas and Andrassy, 1985). Other chemicals that improve spore recovery include sucrose and glycerol (Busta, 1978), bicarbonate (Odling and Pflug, 1977), and thioglycollate (Odling and Pflug, 1977). Several cations, such as iron, magnesium, copper, calcium, and manganese can improve recovery by enhancing germination or cell growth (Busta, 1967). Sucrose and glycerol are considered to be radical scavengers.

8-6. Oxidation-reduction potential (Eh)

The oxidation-reduction potential of the medium and the gaseous conditions can be influential on the recovery of normal as well as damaged anaerobic spore formers. (Shoesmith and Worsley, 1984).

Anaerobe spore of *C. perfringens* damaged by heat recovered best in a pure nitrogen or in hydrogen atmosphere than in one in which they are mixed. Irradiated spores, however, recovered better under nitrogen than hydrogen or their mixture. Spores damaged by ethylene oxide gas also preferred nitrogen in their recovery environment (Futter and Richardson, 1970b). These phenomena indicate that the recovery of the damaged spores differs depending on the sort of sterilization procedures.

The environments of carbon dioxide are known to enhance the germination and growth of *Clostridium* spp (Foegeding and Busta, 1983c). Hydrogen, in combination with carbon dioxide or nitrogen, however, did not alter germination, compared with a carbon dioxide or nitrogen atmosphere (Foegeding and Busta, 1983). Carbon dioxide levels at atmospheric pressure inhibited the germination of the aerobic *B. cereus*, but enhanced the germination of clostridia. Increased carbon dioxide levels under high pressure caused the complete inhibition of clostridial spore germination (Enfors and Molin, 1978). Although the type of gas atmosphere is important in the recovery of anaerobes, the oxidation-reduction potential of the substrate has been more important than the gas composition of the environment (Johnson and Busta, 1984). Improved recovery with sodium thioglycollate has been attributed to its reducing properties.

Reducing agents including thioglycollate may be inhibitory, depending on the type, the concentration, the strain, and the exposure time (Shoesmith and Worsley, 1984). Thus, the use of cysteine as a superior reducing agent, which is noninhibitory to clostridia, has been recommended (Shoesmith and Worsley, 1984).

8-7. Incubation temperature

The most appropriate and optimum incubation temperature varies for the enumeration of various species and types of spore formers. The optimum temperature for injured spores is in general different than for uninjured spores. This has been observed with heat-injured spores, which often require lower or more restrictive temperature ranges for optimal recovery (Adams, 1978; Futter and Richardson, 1970a; Shintani, 2006). The lower or more restrictive temperature range for better recovery of injured spores may be influential either on germination (Adams, 1978) or on outgrowth (Prentice, 1974). This phenomenon has been observed with a variety of heat treatments, heating substrates, and recovery media.

The species of spore formers that have required a lower or more restricted incubation temperature range include *B. subtilis* (Prentice and Clegg, 1974; Shintani, 2006), *G. stearothermophilus* (Cook and Gilbert, 1968; Shintani, 2006), *C. perfringens* (Futter and Richardson, 1970a), and *C. botulinum* (Odling and Pflug, 1977). Spore of *B. subtilis* type heat-injured at ultra-high temperature recovered more effectively at relatively lower temperature than at an optimum temperature of 45°C for uninjured spores (Edwards et al., 1965b; Shintani, 2006). Heated spore of *B. subtilis* also recovered better at 30°C, while uninjured spores were enumerated equally well at temperatures in the range 15 to 50°C (Prentice and Clegg, 1974). Maximum counts for heated *G. stearothermophilus* spore were obtained at 45 to 50°C; compared with at 50 to 65°C for unheated spores (Cook and Gilbert, 1968; Shintani, 2006). The maximum enumeration of heated *C. perfringens* spore was achieved at 26°C (Futter and Richardson, 1970a) compared with 34°C for the control. Injured spore of *C. botulinum* recovered best at 25°C compared with at 31 to 37°C for uninjured control (Adams, 1978).

Changes in the optimal incubation temperature have also been observed with irradiation-treated spores. Unirradiated spore of *C. botulinum* 62A was well enumerated at 45°C, while the detection of irradiated spore showed a maximum enumeration at 35°C (Chowdhury et al., 1976).

8-8. Incubation period

Injured spore formers exhibit a longer lag phase during recovery than uninjured spore formers. The period of lag phase can be as short as a few hours or as long as several months. Thus, the incubation period should be adjusted for optimum recovery (Blocher and Busta, 1982; Mossel and van Netten, 1984).

Delayed germination and growth of injured spores may result in the underestimation of heat resistance if

the incubation period has not been prolonged (Lynt et al., 1983). Longer incubation period has been required for heat, irradiation, and chemically injured spores (Futter and Richardson, 1970a; Chowdhury et al., 1976; Wallen and Walker, 1979; Neal and Walker, 1979). In some instances, repair may be accomplished during storage at refrigeration temperature (Edwards et al., 1965b). The incubation period may also be shortened by the addition of certain ingredients (e.g., yeast extract, glucose, pyruvate, alanine and so on) in the recovery medium (Wallen and Walker, 1979).

9. Conclusion

The presence of injured microorganisms in health care products and foods may cause any hazardous problems. It is necessary to diminish totally the injured and uninjured microorganisms to attain successful sterilization validation. Otherwise, faulty results may be attained in terms of sterilization validation. The phenomenon of superdormant spores (Gould et al., 1968) and their relationship to injury needs additional validation research.

The relationship of tailing in survivor curves relative to spore injury also needs evaluation (Ababouch et al., 1987; Ababouch et al., 1987, 1995). Preservation with combination of physical (e.g., heat) and chemical (e.g., sodium chloride, nitrite or sorbate) treatments may lead to spoiled or toxic products after a longer period of time than that for control treatment. It must be clarified whether this delay could involve some type of injury and repair process. Although heat injury has been studied more extensively than injury by other treatments, there is a need for additional work on injury caused not only by heating, but also by other sterilization processes, less well-investigated injuries, such as those caused by radiation, chemicals, drying, or cold temperature.

Future research should clarify the following matters. Why is injury expressed in various ways among species, strains, and processing treatments? Why does the same treatment sometimes result in injury that is expressed differently in various species or even within the same strain? Can knowledge on the repair requirements for some species be applicable to other species under similar conditions of injury? What is the extent and importance of injury in real healthcare product fabrication systems? Studies should be designed to clarify and to answer these and other pertinent questions. If such questions can be successfully addressed in the future, then guidelines and standardized procedures could be formulated for the recovery and enumeration of both normal and injured spore formers in culture media, as well as

in complicated healthcare product fabrication systems.

REFERENCES

- Ababouch, L., Dikva, A., and Busta, F. F. (1987) Tailing of survivor curves of clostridial spores heated in edible oils. *J. Appl. Bacteriol.*, **62**, 503-511.
- Ababouch, L.H., Gमित, L., Eddafry, R., and Busta, F.F. (1995) Thermal inactivation kinetics of *Bacillus subtilis* spores suspended in buffer and in oils. *J. Appl. Bacteriol.*, **78**, 669-676.
- Abshire, R. L., Bain, B., and Williams, T. (1980) Resistance and recovery studies on ultraviolet irradiated spores of *Bacillus pumilus*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **39**, 695-701.
- Adams, D. M., and Busta, F. F. (1972) Ultrahigh-temperature activation of a low-temperature *Bacillus subtilis* spore germination system. *Appl. Microbiol.*, **24**, 418-423.
- Adams, D. M. (1973) Sensitization by ethylenediaminetetraacetate of *Clostridium papingens* type A spores to germination by lysozyme. *J. Bacteriol.*, **116**, 500-502.
- Adams, D. M. (1974) Requirement for and sensitivity to lysozyme by *Clostridium perfringens* spores heated at ultrahigh temperatures. *Appl. Microbiol.*, **27**, 797-801.
- Adams, D. M. (1978) Heat injury of bacterial spores. *Adv. Appl. Microbiol.*, **23**, 245-261.
- Alderton, G. and Snell, N. (1963) Base exchange and heat resistance in bacterial spores. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **10**, 139-143.
- Alderton, G., Thompson, P. A., and Snell, N. (1964) Heat adaptation and ion exchange in *Bacillus megaterium* spores. *Science*, **143**, 141-143.
- Alderton, G., Chen, J. K., and Ito, K. A. (1974) Effect of lysozyme on the recovery of heated *Clostridium botulinum* spores. *Appl. Microbiol.*, **27**, 613-615.
- Barach, J. T., Adams, D. M., and Speck, M. L. (1974) Recovery of heated *Clostridium perfringens* type A spores on selective media. *Appl. Microbiol.*, **28**, 793-797.
- Barach, J. T., Flowers, R. S., and Adams, D. M. (1975) Repair of heat-injured *Clostridium perfringens* spores during outgrowth. *Appl. Microbiol.*, **30**, 873-875.
- Barach, J.T., Adams, D.M., and Speck, M. L. (1976) Stabilization of a psychrotrophic *Pseudomonas* protease by calcium against thermal inactivation in milk at ultrahigh temperature. *Appl. Environ. Microbiol.*, **31**, 875-879.
- Bayliss, C. E., and Waites, W. M. (1976) The effect of hydrogen peroxide on spores of *Clostridium bifermentans*. *J. Gen. Microbiol.*, **96**, 401-409.
- Blocher, J. C. and Busta, F. F. (1982) Constituents of media for recovery of sporeformers from foods. *Arch. Lebensmittelhyg.*, **33**, 138-143.
- Blocher, J. C. and Busta, F. (1985) Inhibition of germinant binding by bacterial spores in acidic environments. *Appl. Environ. Microbiol.*, **50**, 274-379, 1985.
- Briggs, A., and Yazdany, S. (1970) Effect of sodium chloride on the heat and radiation resistance and on the recovery of heated or irradiated spores of the genus *Bacillus*. *J. Appl. Bacteriol.*, **33**, 621-632.
- Busta, F. F. (1967) Thermal inactivation characteristics of bacterial spores at ultrahigh temperatures. *Appl. Microbiol.*, **15**, 640-645.
- Busta, F. F., and Adams, D. M. (1972) Identification of a germination system involved in the heat injury of *Bacillus subtilis* spores. *Appl. Microbiol.*, **24**, 412-417.

- Busta, F.F., Baillie, E., and Murrell, W.G. (1976) Heat-induced requirements for sucrose or magnesium for expression of heat resistance in *Bacillus cereus* forespores. *Appl. Environ. Microbiol.*, **32**, 312-314.
- Busta, F. F. (1978) Introduction to injury and repair of microbial cells. *Adv. Appl. Microbiol.*, **23**, 195-201.
- Cazemier, A.E., Wagenaars, S.F., ter Steeg, P.F. (2001) Effect of sporulation and recovery medium on the heat resistance and amount of injury of spores from spoilage bacilli. *J. Appl. Microbiol.*, **90**, 761-770.
- Chowdhury, M. S. U., Rowley, D. B., Anellis, A., and Levinson, H. S. (1976) Influence of post irradiation incubation temperature on recovery of radiation-injured *Clostridium botulinum* 62 A spores. *Appl. Environ. Microbiol.*, **32**, 172-178.
- Chumney, R. K., and Adams, D. M. (1980) Relationships between the increased sensitivity of heat injured *Clostridium perfringens* spores to surface active antibiotics and to sodium chloride and sodium nitrite. *J. Appl. Bacteriol.*, **49**, 55-63.
- Cook, A. M., and Brown, M. R. W. (1965) Effect of storage on the heat resistance of bacterial spore papers. *J. Pharm. Pharmacol.*, **17**, 7S-13S.
- Cook, A. M., and Gilbert, R. J. (1968) Factors affecting the heat resistance of *Bacillus stearothermophilus* spores. I. The effect of recovery conditions on colony count of unheated and heated spores. *J. Food Technol.*, **3**, 285-296.
- Craven, S. E., and Blankenship, L. C. (1985) Activation and injury of *Clostridium perfringens* spores by alcohols. *Appl. Environ. Microbiol.*, **50**, 249-258.
- Davis, S. B., Carls, R. A., and Gillis, J. R. (1978) Recovery of sublethal sterilization damaged *Bacillus* spores in various culture media. *Dev. Ind. Microbiol.*, **1978**, 427-438.
- Denyer, S.P., Hodges, N.A., and Gorman, S.P. (2004) *Pharmaceutical Microbiology*, pp.29-31, Blackwell Pub., Oxford, UK
- Duncan, C. L., Labbe, R. G., Reich, R. R. (1972) Germination of heat- and alkali-altered spores of *Clostridium perfringens* type A by lysozyme and an initiation protein. *J. Bacteriol.*, **109**, 550-559.
- Durban, E., Grecz, N., Farkas, J. (1974) Direct enzymatic repair of deoxyribonucleic acid single-strand breaks in dormant spores. *J. Bacteriol.*, **118**, 129-138.
- Edwards, J. L., Jr., Busta, F. F., and Speck, M. L. (1965a) Thermal inactivation characteristics of *Bacillus subtilis* spores at ultrahigh temperatures. *Appl. Microbiol.*, **13**, 851-857.
- Edwards, J. L., Jr., Busta, F. F., and Speck, M. L. (1965b) Heat injury of *Bacillus subtilis* spores at ultrahigh temperatures. *Appl. Microbiol.*, **13**, 858-864.
- Enfors, S. O., and Molin, G. (1978) The influence of high concentrations of carbon dioxide on the germination of bacterial spores. *J. Appl. Bacteriol.*, **45**, 279-285.
- Farkas, J., and Roberts, T. A. (1982) The effect of the composition of the recovery medium upon the colony-forming capacity of clostridial spores damaged by gamma-radiation. *Acta Aliment.*, **11**, 393-407.
- Farkas, J. and Andrassy, E. (1985) Comparative investigation of some effects of gamma radiation and ethylene oxide on aerobic bacterial spores in black pepper. *Microbial Associations and Interactions in Food*, Kiss, I. et al., Eds., Kluwer Academic, Hingham, MA, 17, 10A.
- Farkas, J., Andrassy, E., Meszaros, L., and Banati, D. (1995) Growth of untreated and radiation-damaged *Listeria* as affected by environmental factors. *Acta Microbiol. Immunol. Hung.*, **42**, 19-28.
- Feehery, F. E., Munsey, D. T., and Rowley, D. B. (1987) Thermal inactivation and injury of *Bacillus stearothermophilus* spores. *Appl. Environ. Microbiol.*, **53**, 365-370.
- Flowers, R. S. and Adams, D. M. (1976) Spore membrane as the site of damage within heated *Clostridium perfringens* spore. *J. Bacteriol.*, **125**, 429-434.
- Foegeding, P. M., and Busta, F. F. (1981) Bacterial spore injury - an update. *J. Food Prot.*, **44**, 776-781.
- Foegeding, P. M., and Busta, F. F. (1983a) Proposed role of lactate in germination of hypochlorite-treated *Clostridium botulinum* spores. *Appl. Environ. Microbiol.*, **45**, 1369-1373.
- Foegeding, P. M., and Busta, F. F. (1983b) Proposed mechanism for sensitization by hypochlorite treatment of *Clostridium botulinum* spores. *Appl. Environ. Microbiol.*, **45**, 1374-1379.
- Foegeding, P. M., and Busta, F. F. (1983c) Effect of carbon dioxide, nitrogen and hydrogen gases on germination of *Clostridium botulinum* spores. *J. Food Prot.*, **46**, 987-999.
- Foegeding, P. M. (1985) Ozone inactivation of *Bacillus* and *Clostridium* spore populations and the importance of the spore coat to resistance. *Food Microbiol.*, **2**, 123-135.
- Foegeding, P. M., Hemstapat, V., and Giesbrecht, F. G. (1986) Chlorine dioxide inactivation of *Bacillus* and *Clostridium* spores. *J. Food Sci.*, **51**, 197-205.
- Futter, B. V. and Richardson, G. (1970a) Viability of clostridial spores and the requirements of damaged organisms. I. Method of colony count, period and temperature of incubation, and pH value of the medium. *J. Appl. Bacteriol.*, **33**, 321-330.
- Futter, B. V., and Richardson, G. (1970b) Viability of clostridial spores and the requirements of damaged organisms. II. Gaseous environment and redox potentials. *J. Appl. Bacteriol.*, **33**, 331-341.
- Gilbert, P. (1984a) The revival of micro-organisms sublethally injured by chemical inhibitors. *Soc. Appl. Bacteriol. Symp. Ser.*, **12**, 175-197.
- Gilbert, P. (1984b) The revival of micro-organisms sublethally injured by chemical inhibitors, in *The Revival of Injured Microbes*, Andrew, M. H. E. and Russell, A. D., Eds., The Society for Applied Bacteriology Symposium, Academic Press, London, pp. 175-197.
- Gombas, D. E. (1983) Bacterial spore resistance to heat. *Food Technol.*, **37**, 105-112.
- Gombas, D. E. and Gomez, R. F. (1978) Sensitization of *Clostridium perfringens* spores to heat by gamma radiation. *Appl. Environ. Microbiol.*, **36**, 403-407.
- Gomez, R. F., Gombas, D. E., and Herrero, A. (1980) Reversal of radiation-dependent heat sensitization of *Clostridium perfringens* spores. *Appl. Environ. Microbiol.*, **39**, 525-529.
- Gould, G. W., Jones, A., and Wrighton, C. (1968) Limitations of the initiation of germination of bacterial spores as a spore control procedure. *J. Appl. Bacteriol.*, **31**, 357-366.
- Gould, G. W. (1984) Injury and repair mechanisms in bacterial spores, in *The Revival of Injured Microbes*, Andrew, M. H. E. and Russell, A. D., Eds., Academic Press, London, pp. 199-215.
- Grecz, N. and Grice, J. (1978) The use of alkaline sucrose gradient sedimentation of DNA to study injury and repair of bacterial spores. *Spore News!*, **6**, 61-69.
- Grischy, R. O., Speck, R. V., and Adams, D. M. (1983) New media for enumeration and detection of *Clostridium sporogenes* (PA 3679) spores. *J. Food Sci.*, **48**, 1466-

- 1471.
- Gurney, T. R., and Quesnel, L. B. (1980) Thermal activation and dry-heat inactivation of spores of *Bacillus subtilis* MD 2 and *Bacillus subtilis* var. *niger*. *J. Appl. Bacteriol.*, **48**, 231-247.
- Gurney, T. R., and Quesnel, L. B. (1981) Amino acid enhancement of recovery in dry-heat damaged spores of *Bacillus subtilis*. *J. Appl. Bacteriol.*, **51**, 67-72.
- Hanlin, J. H., Cloutier, M. J., and Slepecky, R. A. (1981) Heat and sensitization of bacterial spores after exposure to ethidium bromide, acriflavine or daunomycin. *Appl. Environ. Microbiol.*, **42**, 79-82.
- Hurst, A. (1977) Bacterial injury: a review. *Can. J. Microbiol.*, **23**, 935-948.
- Hurst, A. (1984a) Revival of vegetative bacteria after sublethal heating, in *The Revival of Injured Microbes*, Andrew M. H. E. and Russell, A. D., Eds., Academic Press, London, pp. 77-103.
- Hurst, A. (1984b) Reversible heat damage in *Repairable Lesions in Microorganisms*, Hurst, A. and Nasim, A., Eds. Academic Press, London, pp.303-316.
- Johnson, K. M., and Busta, F. F. (1984) Detection and enumeration of injured bacterial spores in processed foods, in *The Revival of Injured Microbes*, Andrew, M. H. E. and Russell, A. D., Eds., Academic Press, London, pp. 241-256.
- Labbe, R. G. (1979) Recovery of spores of *Bacillus stearothermophilus* from thermal injury. *J. Appl. Bacteriol.*, **47**, 457-462.
- Labbe, R. G., and Norris, K. E. (1982) Evaluation of plating media for recovery of heated *Clostridium perfringens* spores. *J. Food Prot.*, **45**, 686-695.
- Labbe, R.G., and Chang, C.A. (1995) Recovery of heat-injured spores of *Clostridium perfringens* types B, C and D by lysozyme and an initiation protein. *Lett. Appl. Microbiol.*, **21**, 302-6.
- Lynt, R. K., Kautter, D. A., and Solomon, H. M. (1983) Effect of delayed germination by heat-damaged spores on estimates of heat resistance of *Clostridium botulinum* Types E and F. *J. Food Sci.*, **48**, 226-237.
- Mackey, B. M. (1984) Lethal and sublethal effects of refrigeration, freezing and freeze-drying on micro-organisms, in *The Revival of Injured Microbes*, Andrew, M. H. E. and Russell, A. D., Eds., The Society for Applied Bacteriology Symposium, Academic Press, London, pp. 45-70.
- Manas, P., and Mackey, B.M. (2004) Morphological and physiological changes induced by high hydrostatic pressure in exponential- and stationary-phase cells of *Escherichia coli*: relationship with cell death. *Appl. Environ. Microbiol.*, **70**, 1545-1554.
- Mattick, K.L., Jorgensen, F., Legan, J.D., Lappin-Scott, H.M., and Humphrey, T.J. (2001) Improving recovery of *Salmonella enterica* serovar *typhimurium* DT104 cells injured by heating at different water activity values. *J. Food Prot.*, **64**, 1472-1476.
- Mossel, D. A., and van Netten, P. (1984) Harmful effects of selective media on stressed micro-organisms: nature and remedies, in *The Revival of Injured Microbes*, Andrew, M. H. E. and Russell, A. D., Eds., The Society for Applied Bacteriology Symposium, Academic Press, London, pp. 329-351.
- Nadir, M. T. and Gilbert, P. (1982) Injury and recovery of *Bacillus megaterium* from mild chlorhexidine treatment. *J. Appl. Bacteriol.*, **52**, 111-115.
- Neal, N. D., and Walker, H. W. (1977) Recovery of bacterial endospores from a metal surface after treatment with hydrogen peroxide. *J. Food Sci.*, **42**, 1600-1608.
- Northrop, J. and Slepecky, R. A. (1967) Sporulation mutations induced by heat in *Bacillus subtilis*, *Science*, **155**, 838-839.
- Odling, T., and Pflug, I. J. (1977) Recovery of spores of *Clostridium botulinum* in yeast extract agar and pork infusion agar after heat treatment. *Appl. Environ. Microbiol.*, **34**, 377-381.
- Orth, D. S. (1977) Comparison of sulfite-polymyxin-sulfadiazine medium and tryptose-sulfite-cycloserine medium without egg yolk for recovering *Clostridium perfringens*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **33**, 986-988.
- Pflug, I. J., Scheyer, M., Smith, G. M., and Kopelman, M. (1979) Evaluation of recovery media for heated *Clostridium sporogenes* spores. *J. Food Prot.*, **42**, 946-957.
- Pflug, I. J., Smith, G. M., and Christiansen, R. (1981) Effect of soybean casein digest agar lot on number of *Bacillus stearothermophilus* spores recovered. *Appl. Environ. Microbiol.*, **42**, 226-236.
- Polvino, D. A. and Bernard, D. T. (1982) Media comparison for the enumeration and recovery of *Clostridium sporogenes* P.A. 3679 spores, *J. Food Sci.*, **47**, 579-585.
- Prentice, G. A., and Clegg, L. F. L. (1974) The effect of incubation temperature on the recovery of spores of *Bacillus subtilis* 8057. *J. Appl. Bacteriol.*, **37**, 501-513.
- Ray, B. and Adams, D. A., Jr. (1984) Repair and detection of injured microorganisms, in *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Food*, Speck, M. L., Ed., American Public Health Association, Washington, D.C., pp. 112-123.
- Roberts, T. A. (1970) Recovering spores damaged by heat, ionizing radiations or ethylene oxide. *J. Appl. Bacteriol.*, **33**, 74-94.
- Rode, L. J. and Foster, J. W. (1966) Influence of exchangeable ions on germinability of bacterial spores. *J. Bacteriol.*, **91**, 1582-1588.
- Rowley, D. B., Firstenberg-Eden, R., and Shattuck, G. E. (1983) Radiation-injured *Clostridium botulinum* type E spores: outgrowth and repair, *J. Food Sci.*, **48**, 1829-1838.
- Sakurai, M., Takahashi, R., Fukunaga, S., Shiomi, S., Kazuma, K., and H. Shintani (2003) Several factors affecting ozone gas sterilization, *Biocontrol Sci.*, **8**, 69-77.
- Sasaki, K., Shintani, H., Itoh, J., Kamogawa, T., Kajihara, Y. (2000) Effect of calcium in assay medium on D value of *Bacillus stearothermophilus* ATCC 7953 spores. *Appl. Environ. Microbiol.*, **66**, 5509-5513.
- Shintani, H., and Akers, J.E. (2000) On the cause of performance variation of biological indicator used for sterility assurance. *PDA J. Pharm. Sci. Technol.*, **54**, 332-342.
- Shintani, H., Sasaki, K., Kajiwara, Y., Itoh, J. (2000) Validation of D value by different SCD culture medium manufacturer and/or different SCD culture medium constituent. *PDA J. Pharm. Sci. Technol.*, **54**, 6-12.
- Shintani, H. (2006) Importance of consideration of injured microorganisms to attain successful sterilization validation, The 33rd Bohkin Bohbai Gakkai.
- Shoosmith, J. G. and Worsley, B. W. (1984) Anaerobes and exposure to oxygen, in *The Revival of Injured Microbes*, Andrew, M. H. E. and Russell, A. D., Eds., The Society for Applied Bacteriology Symposium Academic Press, London, pp. 127-146.
- Tanooka, H. (1978) Thermorestitution of mutagenic radiation damage in bacterial spores, *Science*, **200**, 1493-1494.

- Traci, P. A., and Duncan, C. L. (1974) Cold shock lethality and injury in *Clostridium perfringens*. *Appl. Microbiol.*, **28**, 815-821.
- Tsuchido, T., Takano, M., and Shibasaki, I. (1983) Inhibitory effect of sucrose esters of fatty acids on intact and heated bacterial spores. *J. Antibact. Antifung. Agents*, **11**, 567-573.
- Tsuchido, T., Ahn, Y.-H., and Takano, M. (1987) Lysis of *Bacillus subtilis* cells by glycerol and sucrose esters of fatty acids, *Appl. Environ. Microbiol.*, **53**, 505-508.
- Tsuchido, T. (2003) Characteristics of injured microorganisms in disinfection process, *Jpn. J. Food Microbiol.*, **20**, 141-149.
- Uchida, A. and Kadota, H. (1979) DNA injury in *Bacillus subtilis* cells induced by heat treatment. *Spore Newsl.*, **6**, 222-229.
- Vary, J. C. (1973) Germination of *Bacillus megaterium* spores after various extraction procedures. *J. Bacteriol.*, **116**, 797-802.
- Waites, W. M., Bayliss, C. E., King, N. R., and Davics, A. M. C. (1979) The effect of transition-metal ions on the resistance of bacterial spores to hydrogen peroxide and to heat. *J. Gen. Microbiol.*, **112**, 225-232.
- Waites, W. M., and Bayliss, C. E. (1984) Damage to bacterial spores by combined treatments and possible revival and repair processes, in *The Revival of Injured Microbes*, Andrew, M. H. E. and Russell, A. D., Eds. Academic Press, London, pp. 221-237.
- Wallen, S. E., and Walker, H. W. (1979) Influence of media and media constituents on recovery of bacterial spores exposed to hydrogen peroxide, *J. Food Sci.*, **44**, 560-568.
- Wyatt, L. R. and Waites, W. M. (1975) The effect of chlorine on spores of *Clostridium bifermentans*, *Bacillus subtilis* and *Bacillus cereus*, *J. Gen. Microbiol.*, **89**, 337-344.
- Yokoya, F., and York, G. K. (1965) Effect of several environmental conditions on the "thermal death rate" of endospores of aerobic, thermophilic bacteria. *Appl. Microbiol.*, **13**, 993-999.

講座

損傷菌ならびに貧栄養菌の特性および これらの菌の修復・培養条件について⁵

放射線滅菌に抛る損傷ならびにその耐性

新谷 英晴¹, 山口 透²

はじめに

照射線滅菌に対する菌の抵抗性については食品照射ならびに医療用具滅菌の場合に共通して言える重要な問題である。一般的に照射に対して抵抗性が高いのは芽胞菌であるが、ウイルスあるいは栄養細胞の中には芽胞菌より例外的に抵抗性の高いのが存在する(表1)。

一般的に芽胞菌の抵抗が高いが芽胞菌と栄養細胞との抵抗(D値)の差は熱抵抗の場合に比べ小さい(表1)。例えば *Bacillus* 属の場合、熱抵抗性は芽胞菌と栄養細胞とでは1000倍位の差が見られるが、放射線の場合にはその差はせいぜい4倍位である(表1)。この違いは両者の滅菌メカニズムの違いから生じる。微生物芽胞に対する放射線に抛るDNA損傷とその修復に関しては総説を参照されたい¹⁾。医療用具に対する放射線滅菌については文献2を参照されたい。

本解説では芽胞菌に対する放射線の効果、損傷と回復について記述する。

1. 放射線に対する芽胞の耐性

放射線滅菌の場合の生残曲線には *B. pumilus* の場合の様に直線性を示す場合もあるが、*B. megaterium* の場合の様にショルダーを示す場合もある。時にはテーリング減少を示し、生残曲

表1. 菌の放射線滅菌に対するD値

菌種	D値(kGy)	ショルダー部分のD値(kGy)
嫌気性芽胞菌		
<i>Clostridium botulinum</i>		
Type A 36	3.3	4.0
Type B	1.1-3.3	4.0-11.0
Type D	2.2	2.5-3.5
Type E Beluga	0.8	2.5-3.5
Type F	2.5	2.5-3.5
Types A, B	3.4-4.2	2.5-3.5
<i>Clostridium sporogenes</i>	1.6-2.2	
<i>Clostridium perfringens</i>	1.2-2.0	
<i>Clostridium tetani</i>	2.4	
好気性芽胞菌		
<i>Bacillus subtilis</i>	0.6	
<i>Bacillus pumilus</i> E601(wet)	3.0	
<i>B. pumilus</i> E601(dried)	1.7	
<i>B. pumilus</i> ATCC 27142	1.4-4.0	
<i>Bacillus sphaericus</i> C1A	10.0	
栄養細胞ならびに微		
<i>Salmonella typhimurium</i>	0.2	
<i>S. typhimurium</i> R6008	1.3	4.0
<i>S. typhimurium</i>	0.8	
<i>Salmonella seftenburg</i>	0.9	
<i>Pseudomonas</i> spp	0.06	
<i>Lactobacillus brevis</i> NCDO 110	1.2	0.2-0.5
<i>Staphylococcus aureus</i>	0.2	
<i>Streptococcus faecium</i>	2.8	
<i>Deinococcus radiodurans</i>	2.2	12.0
<i>Moraxella osloensis</i>	5.8	
<i>Acinetobacter radioresistens</i>	1.3-2.2	
<i>Aspergillus niger</i>	0.5	
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	0.5	
ウイルス		
Foot and mouth	13.0	
Coxsackievirus	4.5	

¹ 国立医薬品食品衛生研究所 〒158-8501 東京都世田谷区上用賀1-18-1 ☎03-3700-9268

² 日本電子照射サービス(株) 〒300-2646 茨城県つくば市緑ヶ原4-16 ☎029-847-5511

線がシグモイド型になる場合もある。初期菌数はこれら生残曲線のスロープには影響しない。ショルダーに対しては培地への馴化、損傷の回復、lag phase、誘導期などで説明され、テーリング現象はクランプ形成で説明されることが多いが、これらの説明で全てのケースを十分に説明し切れない。

照射前のヒートショック時は芽胞の耐放射線性に影響を与えるとは考えられない。放射線に抛る芽胞の不活化とは栄養細胞の発芽と生育の阻害とで表わされる。だから芽胞の呼吸鎖に関連した酵素系も活性を維持している。

2. 芽胞の放射線耐性メカニズム

2-1. 芽胞構造の観点から

芽胞ならびに栄養細胞に対する放射線不活化のメカニズムはDNAの損傷であり、特に一重鎖ならびに二重鎖の崩壊に抛る。芽胞の熱耐性ならびに放射線耐性は高いが、両者の耐性メカニズムは同じではない。

システイン含有量が多い芽胞ほど放射線に対する抵抗性が高い。この理由としてシステインの還元作用から説明されている³⁾が、一方必ずしもこのとおりとは言えないという報告もある⁴⁾。またジピコリン酸がUV照射耐性に影響を与えるという報告^{5,6)}がある一方ジピコリン酸が放射線照射耐性に影響を与えないという報告もある⁷⁾。芽胞DNAの放射線照射耐性は本質的には低いと考えられている。しかしそれは芽胞の存在状態、例えば芽胞の水分活性や芽胞DNAの高次元構造にも依存する。また α, β, γ 型の小分子量酸溶解性の芽胞蛋白質は放射線耐性に関与しないと考えられる⁸⁾。

2-2. 芽胞DNAに対する放射線損傷の修復

放射線に抛る不活化の主要な原因にはDNA損傷が主要な要因と考えられるが、それだけではない。芽胞は休眠状態であるため、一般的にDNAの修復は顕著ではない。しかし修復酵素の活性は保持されており、栄養条件が整って発芽が開始さ

れると修復酵素の活性も高まる⁹⁾。ここで放射線滅菌での生残曲線でショルダーを示さない芽胞(*C. botulinum* 51B)と2-6kGy付近でショルダーを示す芽胞(*C. botulinum* 33A)の放射線耐性を比較したところ、3kGy以上の照射でショルダーを示す放射線耐性菌株には一重鎖DNAの崩壊が殆ど認められず、また認められても照射後、嫌気性環境下では一重鎖DNAの崩壊の修復が起こることが確認された¹⁰⁾。本修復は損傷DNAを基質とするポリヌクレオチドリガーゼに抛る。また本酵素による修復はキレート剤(EDTAなど)で阻害され、Mgなどの添加で阻害が解除され、修復が進む。

3. 芽胞の放射線耐性に対する環境要因

環境要因の一例として温度を考えた場合、例えば*B. coagulans*が28℃と55℃とで芽胞形成された場合を比較したところ、前者の場合の方が放射線抵抗性が高いことが分かった。照射時の温度¹¹⁾ならびに培養時の温度¹²⁾が芽胞生育に与える影響については報告されている。また芽胞形成培地組成が放射線抵抗性¹³⁾ならびに高圧蒸気滅菌抵抗性¹⁴⁾に影響を与えることが知られている。当然のことながら芽胞に与える影響は栄養細胞に与える影響に比べて遙かに少ない¹⁵⁾。何れにする広範囲に渡って温度が与える影響について配慮する必要がある¹⁶⁾。

菌種にも抛るが一般的に芽胞に対する放射線滅菌効果は温度0℃で最大であるとされている¹⁷⁾。0℃以下では放射線滅菌で生成された滅菌化学種であるOHラジカルが氷で捕捉されるため滅菌効果が減少する。一方比較的高温の場合、例えば50-70℃の場合、放射線抵抗性は室温あるいはそれ以下の温度の場合より高い。これは高温では生成したラジカルのアニール効果の促進に抛ると考えられている^{18, 19)}。

*B. cereus*²⁰⁾ならびに*C. botulinum*²¹⁾芽胞に対する放射線滅菌の場合、pH5-8では影響は殆ど無いが、pH5以下では抵抗性が減少する。*C. botulinum*芽胞の場合、放射線滅菌時の温度が凝固点あるいはそれ以下だとpHに対する芽胞の

放射線感受性が高まることが知られている²²⁾。

芽胞の放射線抵抗性は水分活性, A_w , が低下することでも高まるが, 放射線滅菌での水分活性の変動の影響は加熱滅菌の場合での影響に比べれば遙かに低い^{23, 24)}。ある培地で培養した場合には水分活性が低いと生残曲線のショルダーの時間が長くなることで放射線抵抗性を増すことが知られている²⁵⁾。生残曲線のショルダーの時間と放射線抵抗性との間には相関がある。

4. 放射線暴露に拠る芽胞の損傷とその結果

4-1. 直接作用

放射線滅菌では芽胞の不活化とDNA損傷以外の効果をも芽胞に与える。例えばある場合には亜致死量の照射は芽胞の発芽の促進ともなる²⁶⁾。この場合培地中に低分子量成分, オリゴペプチドならびにジピコリン酸が溶け出す^{27, 28)}。放射線に拠る本効果は超音波処理の場合の効果と類似している^{29, 30)}。芽胞に対する熱不活化でもジピコリン酸の漏出が見られるが, オリゴペプチドの漏出は放射線の場合に比べて少ない²⁸⁾。放射線滅菌に伴って細胞内のオリゴペプチドやジピコリン酸などの漏出が見られることは放射線滅菌の作用と芽胞発芽機序とが類似していることを示している³¹⁾。

4-2. 照射で損傷を受けた芽胞回復に及ぼす環境要因

放射線滅菌での芽胞損傷の程度は回復培地の種類ならびに芽胞の種類に拠って異なる^{32, 33)}。また加熱処理に拠る損傷と同様に照射に拠る損傷の場合も生存芽胞は二次ストレスに対する感受性が高まっている。芽胞菌に対する照射では培地のpHに対する感受性が高まり, 本効果は芽胞の生育至適培養温度から乖離する程高まる²⁰⁾。また培地中の塩素(NaCl)は照射損傷を受けた芽胞の生育を阻害させる^{34, 35)}。培地中の亜硝酸塩が非損傷 *C. botulinum* の生育を阻害するのに対して, 照射滅菌損傷 *C. botulinum* の回復/生育を促進させるという事実は興味深い³⁶⁾。亜硝酸塩

が示す理由については良く分かっていない。

4-3. 照射芽胞の熱感受性の増加

照射芽胞は熱抵抗性が減少することが知られている。照射と加熱との組み合わせでの滅菌効果については表2, 3に示したとおり温度と放射線との組み合わせで滅菌効果が高まることが知られており, 順序が異なると結果が異なることを示している²⁶⁾。表2には培養温度が至適温度より低いと培養コロニー数が少ないことも同時に示している(30°Cと20°Cの比較)。前述のとおり表2で興味あるのは温度と照射との組み合わせで, それらの順序が逆になることで滅菌効果はかなり異なる

表2. *Bacillus cereus* 芽胞形成に及ぼす温度, 照射, ならびに温度と照射の組み合わせ効果について

滅菌方法	培養温度 (°C)	
	30	20
コントロール	100	100
90°C, 12分	19.2	12.9
4kGy	8.3	7.6
90°C, 12分+4kGy	1.6	0.9
4kGy+90°C, 12分	0.0001	0.00002

表3. *Bacillus cereus* 芽胞形成に及ぼす温度, 照射, ならびに温度と照射の組み合わせ効果について

滅菌方法	対数生存数 (CFU)
コントロール	9.7
0.5 kGy	9.4
4 kGy	7.7
90°C, 27分	9.4
90°C, 95分	7.7
0.5 kGy+90°C, 27分	8.3
0.5 kGy+90°C, 95分	6.4
4.0 kGy+90°C, 27分	4.5
4.0 kGy+90°C, 95分	1.5

表4. *Clostridium perfringens* 芽胞形成に及ぼす温度, 照射, ならびに温度と照射の組み合わせ効果について

滅菌方法	対数生存数 (CFU)
コントロール	9.2
4 kGy	8.6
80°C, 30分	8.3
85°C, 10分	8.2
80°C, 30分+4 kGy	7.6
85°C, 10分+4 kGy	7.3
4 kGy+80°C, 30分	7.3
4 kGy+85°C, 10分	6.8

表5. 食塩含有培地中での *Clostridium* 属種芽胞形成に及ぼす温度, 照射, ならびに温度と照射の組み合わせ効果について

滅菌方法	食塩濃度 (% w/v)	
	0.5	6.0
生存菌数 (CFU)		
<i>Clostridium botulinum</i> 7272 A		
コントロール	9.2	7.8
4kGy	8.6	4.8
80°C, 30分	8.3	6.4
80°C, 30分+4kGy	7.6	3.2
4kGy+80°C, 30分	7.3	<1.5
滅菌方法	食塩濃度 (% w/v)	
	0.5	2.5
生存菌数 (CFU)		
<i>Clostridium botulinum</i> 1304 E		
コントロール	7.2	6.0
4kGy	5.4	3.3
70°C, 60分	7.0	5.2
70°C, 60分+4kGy	5.1	2.8
4kGy+70°C, 60分	<1.8	<1.8

表6. 食塩含有培地中での *Bacillus* 属種芽胞形成に及ぼす温度, 照射, ならびに温度と照射の組み合わせ効果について

滅菌方法	食塩濃度 (% w/v)	
	0.0	2.0
生存菌数 (CFU)		
<i>Bacillus cereus</i> T		
コントロール	10.2	10.3
4kGy	9.0	8.4
90°C, 12分	9.4	7.0
90°C, 12分+4kGy	8.3	4.4
4kGy+90°C, 12分	4.2	<2.5
滅菌方法	食塩濃度 (% w/v)	
	0.0	8.0
生存菌数 (CFU)		
<i>Bacillus circulans</i>		
コントロール	9.5	9.3
4kGy	7.5	7.3
90°C, 93分	6.0	4.6
90°C, 93分+4kGy	3.9	2.8
4kGy+90°C, 93分	<1.8	<1.8

ことである²⁶⁾。表3の場合は滅菌効果が照射量と滅菌温度とその時間に依存することを示している²⁶⁾。同様のことは表4に示した *Clostridium perfringens* を用いた場合でも言える³¹⁾。培地の種類と培養 pH に拠っても生育菌数が異なることが知られている³⁸⁾。

表7. 亜硝酸ソーダ含有培地中での *Bacillus circulans* 芽胞形成に及ぼす温度, 照射, ならびに温度と照射の組み合わせ効果について

滅菌方法	亜硝酸ソーダ濃度 (ppm)	
	0.0	150
生存菌数 (CFU)		
コントロール		
コントロール	9.5	9.6
4kGy	7.5	8.1
90°C, 93分	6.0	8.4
90°C, 93分+4kGy	3.9	6.1
4kGy+90°C, 93分	<1.8	<1.8

表5, 6に示すとおり損傷菌は塩素 (NaCl) に対して感受性が高い^{26, 35)}。食塩添加で菌生育阻害が生じる理由として考えられるのは塩素に拠る生育阻害で, イオン添加に共通した現象としての水分活性の減少とかイオン強度の増加とかなどからは説明できない。なぜならば表7に示すとおり食塩の代わりに亜硝酸ソーダを添加した場合, 亜硝酸ソーダを添加した場合の方が菌数が増加するからである。イオンが培地に及ぼすイオン強度の観点だけから言うと食塩添加も亜硝酸ソーダ添加もイオン強度の点では変わらない。

表2から7に共通して言えることは照射と加熱との組み合わせの場合, 照射を先に行うと滅菌効果がより有効であるということが分かる。また相乗効果の場合, 効果は線量依存, アレニウス式に従った温度依存, ならびに乾熱の場合には相対湿度に依存する³⁹⁾。相乗効果の理由としてはDNA損傷回復酵素の熱不活化がまず考えられる^{39, 40)}。他の理由としては照射に拠って芽胞コルテックスペプチドグルカンの破壊あるいは脱カルボキシル化, 浸透圧調整能ならびにコア脱水メカニズムの脆弱化が生じ, そのために熱に対する感受性が高まり, 滅菌効果が上昇したと考えられる^{40, 41)}。一方培地中にグリセリンやショ糖が多い場合には照射効果が減少する。これは照射の滅菌化学種であるOHラジカルがグリセリンやショ糖のOHと水素結合して消費されるため, グリセリンやショ糖は照射に対する保護効果を発揮する。照射に拠る芽胞コアの部分的脱水は芽胞発芽メカニズムと同様である。つまり熱感受性の高まった部位からのジピコリン酸ならびに細胞内部物質の溶出である⁴²⁾。

表8. *B. subtilis* 芽胞に対する超音波(S), 放射線(R), 加熱処理(H)単独ならびに組み合わせに抛る致死率効果

処理方法	致死率 (対数)
S	0.3
R	0.75
H	0.85
S+R	1.0
S+H	1.4
R+H	2.0
S+R+H	2.85

表9. 培地中のカルシウム (Ca) 量の多少と照射量とが芽胞発育に与える影響 (n=3)

Ca 量	照射量 (kGy)	発育率 (%)
少ない	1	86.0
少ない	3	82.7
多い	1	92.2
多い	3	86.2
多い, 少ない	0	100

少ない場合の Ca 量は $161 \pm 14 \mu\text{g}$, 多い場合は $216 \pm 2.5 \mu\text{g}$

4-4. 照射と加熱処理あるいはそれ以外の組み合わせでの滅菌効果

表8には *B. subtilis* の超音波処理 (S, 20kHz, 120W, 30分), 放射線処理 (R, 2kGy), 加熱処理 (H, 99°C, 60分) 単独ならびにそれぞれの組み合わせと致死率 (対数表示) との関係を示した。その結果, 超音波処理の場合の効果は他の場合に比べて致死率は低いが, 放射線と加熱処理単独ではほぼ同じ致死効果が得られ, それぞれの組み合わせで致死効果が上昇することが確認できる。最大の致死効果を示したのは全ての組み合わせの場合で, 次いで放射線と加熱処理との組み合わせの場合であった⁴³⁾。

同時に放射線滅菌した *B. subtilis* 培養に Ca 量の少ない培地 ($161 \pm 14 \mu\text{g}$) と Ca 量の多い培地 ($216 \pm 2.5 \mu\text{g}$) のそれぞれの場合の発育率 (%) を示した (表9)⁴³⁾。菌種ならびに滅菌方法ともに異なるが, Ca が生育に及ぼす影響に関しては同様な現象を示すことを我々も確認している^{44, 45)}。この現象を損傷を受けたリボゾームの回復から説明されている場合があるが⁴⁶⁻⁴⁸⁾, リボゾームであれば Mg も有効でなはずである。我々の実験の場合には^{44, 45)}Mg 添加に抛る損傷回復の有効性は認められなかった。我々の場

合^{44, 45)}と他の報告⁴⁶⁻⁴⁸⁾の場合との結果が必ずしも一致しないのは培地組成, 菌種, 滅菌方法などが同じではないためと考えている。実際のところ, 滅菌方法, 菌種などが異なると損傷部位も異なり, 回復に要する添加剤も異なることが分かっている⁴⁹⁾。

高圧条件下での照射が芽胞感受性を高めることが知られている^{50, 51)}。この理由としては芽胞コルテックスのペプチドグリカンへの照射で生じる芽胞の部分的再水和ならびに圧力に抛る発芽抑制に起因すると考えられている。

放射線と無機ならびに有機化合物との相乗効果も報告されているが⁵²⁻⁵⁴⁾, そのメカニズムについての詳細は不明である。

結 語

芽胞膜構造ならびにコルテックス構造に損傷を与える物理的ならびに化学的因子は芽胞の抵抗性を減少させる。このことから, 照射, 加熱処理ならびに/あるいは阻害因子との組み合わせが芽胞形成菌の生育を阻害させるのに有効である。本相乗効果を理解するためには損傷菌の亜致死状態の性質を十分に理解しておく必要がある。致死率の向上は滅菌効果ならびに保存効果の向上に寄与する。その意味では消費者ならびに生産者との利害は一致しており, 両者とも滅菌後の化学薬剤の残留を減らしたいと望んでいる。その意味で照射, 加熱処理などの滅菌方法を組み合わせることで化学薬剤の使用量が減少でき, 同時に滅菌効果の向上も可能となる。ただ同時に考慮すべき点は滅菌効果の向上と同時に製品の品質が保たれていることの確認である。これは GMP の観点から要求される。

参 考 文 献

- 1) Farkas, J. (1994) Tolerance of spores to ionizing radiation: mechanisms of inactivation, injury and repair. *Soc Appl Bacteriol Symp Ser.*, 23, 81S-90S.
- 2) Dorpema, J. W. (1990) Review and state of the art on radiation sterilization of medical

- devices. *Radiation Physics Chemist.*, 35, 357-360.
- 3) Vinter, V. (1959) Differences in cyst(e)ine content between vegetative cells and spores of *Bacillus cereus* and *Bacillus megaterium*. *Nature*, 183, 998-999.
 - 4) Hitchins, A. D., King, W. L., and Gould, G. W. (1966) Role of disulphide bonds in the resistance of *Bacillus cereus* spores to gamma irradiation and heat. *J. Appl. Bacteriol.*, 29, 505-511.
 - 5) Berg, P. E., and Grecz, N. (1970) Relationship of dipicolinic acid content in spores of *Bacillus cereus* T to ultraviolet and gamma radiation resistance. *J. Bacteriol.*, 103, 517-519.
 - 6) Kamat, A. S., and Pradhan, D. S. (1987) Involvement of calcium and dipicolinic acid in the resistance of *Bacillus cereus* BIS-59 spores to U. V. and gamma radiations. *Int. J. Radiat. Biol. Relat. Stud. Phys. Chem. Med.*, 51, 7-18.
 - 7) Rowley, D. B., and Newcomb, H. R. (1964) Radiosensitivity of several dehydrogenases and transaminases during sporogenesis of *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.*, 87, 701-709.
 - 8) Setlow, P. (1988) Small, acid-soluble spore proteins of *Bacillus* species: structure, synthesis, genetics, function, and degradation. *Ann. Rev. Microbiol.*, 42, 319-338.
 - 9) Terano, H., Tanooka, H., and Kadota, H. (1969) Germination-induced repair of single-strand breaks of DNA in irradiated *Bacillus subtilis* spores. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 37, 66-71.
 - 10) Durban, E., Grecz, N., and Farkas, J. (1974) Direct enzymatic repair of deoxyribonucleic acid single-strand breaks in dormant spores. *J. Bacteriol.*, 118, 129-138.
 - 11) Chowdhury, M. S., Rowley, D. B., Anellis, A., and Levinson, H. S. (1976) Influence of postirradiation incubation temperature on recovery of radiation-injured *Clostridium botulinum* 62A spores. *Appl. Environ. Microbiol.*, 32, 172-178.
 - 12) Anellis, A., Shattuck, E., Rowley, D. B., Ross, E. W. Jr, Whaley, D. N., and Dowell, V. R. Jr. (1975) Low-temperature irradiation of beef and methods of evaluation of radappertization process. *Appl. Microbiol.*, 30, 811-820.
 - 13) Yamazaki, K., Ito, M., Sato, K. and Oka, M. (1968) Effects of growth media composition on radioresistance of bacterial spores. *Food Irrad.*, 3, 13-19.
 - 14) Yamazaki, K., Kawai, Y., Inoue, N., and Shinano, H. (1997) Influence of sporulation medium and divalent ions on the heat resistance of *Alicyclobacillus acidoterrestris* spores. *Lett. Appl. Microbiol.*, 25, 153-156.
 - 15) Ma, K., and Maxcy, R. B. (1981) Factors influencing radiation resistance of vegetative bacteria and spores associated with radappertization of meat. *J. Food Sci.*, 46, 612-616.
 - 16) Anellis, A., Berkowitz, D., and Lemper, D. (1977) Comparative radiation death kinetics of *Clostridium botulinum* spores at low temperature gamma irradiation. *J. Food Protect.*, 40, 313-316.
 - 17) Friedman, Y. S., and Grecz, N. (1974) The role of water in thermorestitution of bacterial spores. *Acta Aliment.*, 3, 251-265.
 - 18) Ehret, C.F., Smaller, B., Powers, E.L., and Webb, R.B. (1960) Thermal annealing and nitric oxide effects on free radicals in x-irradiated cells. *Science*, 132, 1768-1769.
 - 19) Webb, R. B., Powers, E. L., and Ehret, C. F. (1960) Thermorestitution of radiation damage in dry bacterial spores. *Radiat. Res.*, 12, 682-693.
 - 20) Farkas, J., Kiss, I. and Andrassy, E. (1967) The survival and recovery of irradiated bacterial spores as affected by population density and some external factors. In *Radiosterilization of Medical Products*, pp. 343-354. Vienna, IAEA.
 - 21) Masokhina-Porshnyakova, N. N. and Ladukhina, G. V. (1967) The effect of ionizing radiation on *Clostridium botulinum* spores. In *Microbiological Problems in Food Preservation by Irradiation*, pp. 89-98.

Vienna, IAEA.

- 22) Grecz, N., and Upadhyay, J. (1970) Radiation survival of bacterial spores in neutral and acid ice. *Can. J. Microbiol.*, 16, 1045-1049.
- 23) Harnulv, B.G., and Snygg, B.G. (1973) Radiation resistance of spores of *Bacillus subtilis* and *B. stearothermophilus* at various water activities. *J. Appl. Bacteriol.*, 36, 677-682.
- 24) Harnulv, B. G., and Snygg, B. G. (1972) Heat resistance of *Bacillus subtilis* spores at various water activities. *J. Appl. Bacteriol.*, 35, 615-624.
- 25) Wheaton, E., and Pratt, G.B. (1962) Radiation survival curves of *Clostridium botulinum* spores. *J. Food Sci.*, 27, 327-334.
- 26) Farkas, J. and Roberts, T. A. (1976) The effect of sodium chloride, gamma irradiation and/or heat on germination and development of spores of *Bacillus cereus* T in single germinants and complex media. *Acta Aliment.*, 5, 289-302.
- 27) Levinson, H. S., and Hyatt, M. T. (1960) Some effects of heat and ionizing radiation on spores of *Bacillus megaterium*. *J. Bacteriol.*, 80, 441-451.
- 28) Farkas, J, and Kiss, I. (1965) Observations on biochemical changes in irradiated spores of *Bacillus cereus*. *Acta Microbiol. Acad. Sci. Hung.*, 12, 15-28.
- 29) Palacios, P., Burgos, J., Hoz, L., Saviz, B., and Ordonez, J.A. (1991) Study of substances released by ultrasonic treatment from *Bacillus stearothermophilus* spores. *J. Appl. Bacteriol.*, 71, 445-451.
- 30) Ordonez, J. A., and Burgos, J. (1976) Effect of ultrasonic waves on the heat resistance of *Bacillus* spores. *Appl. Environ. Microbiol.*, 32, 183-184.
- 31) Rode, L. J., and Foster, J. W. (1964) Mechanical germination of bacterial spores. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 46, 118-128.
- 32) Roberts, T. A. (1970) Symposium on bacterial spores: VII. Recovering spores damaged by heat, ionizing radiations or ethylene oxide. *J. Appl. Bacteriol.*, 33, 74-94.
- 33) Farkas, J., and Roberts, T.A. (1982) The effect of the composition of the recovery medium upon the colony-forming capacity of clostridial spores damaged by gamma-radiation. *Acta Aliment.*, 10, 393-398.
- 34) Roberts, T.A., Ditchett, P.J., and Ingram, M. (1965) The effect of sodium chloride on radiation resistance and recovery of irradiated anaerobic spores. *J. Appl. Bacteriol.*, 28, 336-348.
- 35) Kiss, I., Rhee, C. O., Grecz, N., Roberts, T.A., and Farkas, J. (1978) Relation between radiation resistance and salt sensitivity of spores of five strains of *Clostridium botulinum* types A, B, and E. *Appl. Environ. Microbiol.*, 35, 533-539.
- 36) Rowley, D. B., Feeherry, F., and Powers, E. (1971) Effect of curing salt on the gamma radiation resistance and recovery of *Clostridium botulinum* type 62A spores. *Bact. Proc.*, 64.
- 37) Gombas, D. E., and Gomez, R. F. (1978) Sensitization of *Clostridium perfringens* spores to heat by gamma radiation. *Appl. Environ. Microbiol.*, 36, 403-407.
- 38) Shamsuzzaman, K., Payne, B., Cole, L. and Borsa, J. (1990) Radiation induced heat sensitivity and its persistence in *Clostridium sporogens* spores in various media. *Can. J. Food Sci. Technol. J.*, 23, 114-120.
- 39) Fisher, D.A., and Pflug, I.J. (1977) Effect of combined heat and radiation on microbial destruction. *Appl. Environment. Microbiol.*, 33, 1170-1176.
- 40) Stegeman, H., Mossel, D. A. A. and Pilnik, W. (1977) Studies on the sensitizing mechanism of preirradiation to a subsequent heat treatment on bacterial spores. In *Spore Research*, Barker, A.W., Wolf, J., Ellar, D.J., Dring, G. J. and Gould, E. W. (Eds), pp. 565-587. London, Academic Press.
- 41) Gomez, R. F., Gombas, D. E., and Herrero, A. (1980) Reversal of radiation-dependent heat sensitization of *Clostridium perfringens* spores. *Appl. Environ. Microbiol.*, 39, 525-

- 529.
- 42) Farkas, J. (1994) Tolerance of spores to ionizing radiation: mechanisms of inactivation, injury and repair. *Soc. Appl. Bacteriol. Symp. Ser.*, 23, 81S-90S.
- 43) Farkas, J., Andrassy, E., Formanek, Z., and Meszaros, L. (2002) Luminometric and differential scanning calorimetry (DSC) studies on heat- and radiation inactivation of *Bacillus subtilis* luxAB spores. *Acta Microbiol. Immunol.*, 49, 141-150.
- 44) Sasaki, K., Shintani, H., Itoh, J., Kamogawa, T., and Kajihara, Y. (2000) Effect of calcium in assay medium on D value of *Bacillus stearothermophilus* ATCC 7953 spores. *Appl. Environ. Microbiol.*, 66, 5509-5513.
- 45) Shintani, H., Sasaki, K., Kajiwar, Y., Itoh, J., Takahashi, M., and Kokubo, M. (2000) Validation of D value by different SCD culture medium manufacturer and/or different SCD culture medium constituent. *PDA J. Pharm. Sci. Technol.*, 54, 6-12.
- 46) Anderson, W. A., Hedges, N. D., Jones, M. V., and Cole, M.B. (1991) Thermal inactivation of *Listeria monocytogenes* studied by differential scanning calorimetry. *J. Gen. Microbiol.*, 137, 1419-1424.
- 47) Mackey, B. M., Miles, C. A., Parsons, S. E., and Seymour, D. A. (1991) Thermal denaturation of whole cells and cell components of *Escherichia coli* examined by differential scanning calorimetry. *J. Gen. Microbiol.*, 137, 2361-2374.
- 48) Belliveau, B. H., Beaman, T. C., Pankratz, H. S., and Gerhardt P. (1992) Heat killing of bacterial spores analyzed by differential scanning calorimetry. *J. Bacteriol.*, 174, 4463-4474.
- 49) Shintani, H. (2005) in preparation.
- 50) Clouston, J.G., and Wills, P.A. (1969) Initiation of germination and inactivation of *Bacillus pumilus* spores by hydrostatic pressure. *J. Bacteriol.*, 97, 684-690.
- 51) Sale, A. J., Gould, G. W., and Hamilton, W. A. (1970) Inactivation of bacterial spores by hydrostatic pressure. *J. Gen. Microbiol.*, 60, 323-334.
- 52) Gould, G. W. (1984) Injury and repair mechanisms in bacterial spores. *Soc. Appl. Bacteriol. Symp. Ser.*, (12), 199-220.
- 53) Gould, G. W. (1970) Mechanism of the inhibition of germination of bacterial spores by gamma-irradiation in the presence of iodoacetamide and iodate. *J. Gen. Microbiol.*, 64, 301-309.
- 54) Gould, G. W. (1970) Potentiation by halogen compounds of the lethal action of gamma-radiation on spores of *Bacillus cereus*. *J. Gen. Microbiol.*, 64, 289-300.

講座

損傷菌ならびに貧栄養菌の特性および これらの菌の修復・培養条件について⑥

化学薬剤に対する微生物の損傷と回復

新谷 英晴

はじめに

医療用品、食品ならびに化粧品中の微生物の成育を阻害させるために種々の物理的ならびに化学的手段がとられる。低用量の化学薬剤の使用では製品中の微生物を死滅させるには不十分であるが損傷させることは可能である。致死的に損傷した菌体は健常菌が生育できる培養条件では生育できず、またその様な損傷菌は種々のストレスに対する感受性が高まっている。これらの損傷菌を通常の培養条件で培養した場合、損傷菌がたとえ生存したとしても生育して来ない可能性が考えられる。これら損傷菌も損傷ストレスが解除されれば回復し、生育可能となる。だから損傷菌が製品中に存在しているということは使用者にとって非常に危険なことである¹⁾。その意味で化学薬剤に限らないが、滅菌ならびに殺菌条件をバリデートするに際し、損傷ならびに健常菌の両方が生育できる培養条件の確立が必要とされる所以である²⁾。同時に物理的手段ならびに化学薬剤暴露でも製品の品質が維持され、同時にバイオバーデンの滅菌が最大限に発揮できる条件をバリデートする必要がある^{3, 4)}。以上の培養条件ならびに滅菌条件のバリデートに際し、滅菌に拠る菌の生化学的变化に加えて損傷菌の回復条件についても検討する必要がある。滅菌に伴う菌体の損傷については多くの研究がなされているが損傷菌体の回復に関する

研究は少ない。損傷回復の結果前述した様な問題が生じる可能性があるため損傷回復に関する検討も無視できない課題である。

菌体に対して物理的あるいは化学的に暴露させると菌体の特性は変化する。当然のことながら特性変化の中には菌体の損傷が含まれる。菌体の損傷ならびにその後の損傷回復は損傷の性質とその程度に依存する。また菌体の損傷ならびに回復は菌体の種類、損傷を受ける前の生育条件⁵⁻⁷⁾、バイオバーデンの回収方法ならびに回収培地組成に拠って異なる⁸⁻¹³⁾。滅菌後の損傷回復に関しては、ガンマ線滅菌¹⁴⁾、加熱滅菌¹⁵⁾、凍結¹⁶⁾、凍結乾燥¹⁷⁾などの場合について報告がある。

化学薬剤に拠る菌体の損傷を考える場合、薬剤濃度そのものよりも菌体と薬剤との比が重要な因子となる。化学薬剤の損傷回復の場合に専ら使用されるのは不活化剤の添加である¹⁸⁾。しかしながらこれらの不活化剤には界面活性作用があるため損傷菌に対して二次的なストレスを与える可能性が否定できない^{19, 20)}。また化学薬剤と菌体とが共有結合の様な形で強固に結合してしまった場合には不活化剤の添加の効果も余り期待できない。

ところで芽胞を不活化させる薬剤としてはグルタルアルデヒド、ホルムアルデヒド、塩素、ヨード、酸、塩基、過酸化水素、過酢酸、エチレンオキシド、 β -プロピオンラクトン、ならびにオゾンなどがある。フェノール、第4級アンモニウ

ム塩、アルコール、ビスグアニジド、有機酸、有機酸、有機酸エステルなどがある。水銀化合物には栄養細胞を不活化させるが、芽胞を不活化させる効果は期待できない。以上示した薬剤が芽胞ならびに栄養細胞の致死に働く初期の部位は一般的には同じと考えられているが、例えばグルタルアルデヒドの場合、初期の致死効果を発揮する部位は必ずしも同一では無いと言われている。そのため薬剤と細胞との結合部位については現時点では未だ断定的な事は言えない。

栄養細胞に比べて芽胞が致死効果に対して抵抗性を発揮する理由は、芽胞コートやコルテックスの存在が薬剤を原形質内に侵入するのを阻害しているためと考えられている。だから芽胞を致死できる薬剤は芽胞の最外層を破壊し、原形質内に侵入可能な薬剤ということになる。

本解説では化学薬剤で損傷を受けた菌の損傷メカニズムならびに損傷回復について記述する。

1. 抵抗性に於ける芽胞外層の役割

一般的に芽胞コートは芽胞を薬剤から守る主要な働きをすることが知られているが、そのことは滅菌剤に扱ってもまた芽胞に扱っても異なる。芽胞コートの薬剤防御作用についてはコートが無い芽胞あるいはコートが不完全な芽胞を用いて研究されている。電子顕微鏡ならびに化学分析に拠ると芽胞コートは二重層となっており、内膜はアルカリ溶解性で、外膜はアルカリ不溶性である。S-S結合を-SH-SH-に還元することでコート二重層の両方の膜が同時に抽出可能となることが知られている。

二重層の膜剥離が芽胞を死滅させ滅菌を達成する上で最大の課題となる。塩素ならびにヨウ素遊離試薬は例えば *B. subtilis* の二重層膜剥離に有効に作用する。塩素遊離試薬では例えば pH7.4 の緩衝作用を持たせた次亜塩素酸ソーダ (NaClO) ならびにクロラミン-T などは *B. subtilis* の栄養細胞型に対して類似の死滅作用を示す。その場合の有効塩素量は50-100ppm であるが有効性の順序で言えば次亜塩素酸ソーダ > クロラミン-T である。これは遊離塩素の出来易さ

表1. 種々の操作に拠る *B. subtilis* のコート蛋白質の抽出量

操 作	抽出総コート蛋白質量 (%)
0.2% NaOH	10.0
0.4% NaOH	17.5
1.0% NaOH	24.5
UDS	67.5

UDS: 尿素/ジチオスレイトール/ラウリル硫酸ナトリウム

に起因する。pH7.0の緩衝作用を持たせた有効ヨード量が5000ppmの場合に *B. subtilis* の栄養細胞型に対して有効な死滅作用を示す。有効塩素と有効ヨードの量の比較から塩素の方が菌に対する死滅効果が高いことが分かる。

B. subtilis 芽胞の分析から、10-24.5%の蛋白質(多分コート内膜蛋白、表1)がカセソーダ(NaOH)で抽出され、尿素/ジチオスレイトール/ラウリル硫酸ナトリウム(UDS、界面活性剤)の場合には67.5%の蛋白質(多分コート内膜ならびに外膜蛋白質の両方)が抽出されている(表1)。塩素ならびにヨード遊離試薬の場合、カセソーダ存在下で菌死滅効果が高まり、NaOHの濃度が高いほど高くなることが知られている(表1)。ハロゲン遊離試薬ならびにクロロフォルムに対する *C. bifermentans*, および *B. cereus* 芽胞の死滅効果もコート蛋白質の抽出で説明されている。

2. 化学的阻害剤に拠る損傷

微生物の致死的損傷に拠って菌体内の構造的な変化が生じ、その結果細胞機能の一時的あるいは永久的な欠落が生じる。DNA に対する薬剤暴露損傷の例としてはDNAからRNAへの転写あるいは蛋白質への翻訳の阻害がある²¹⁾。損傷の回復はクロモゾーム機能の回復として表現され(その意味ではクロモゾームの構造維持に必須なMgの存在が不可欠となる)、突然変異が起こらない様になること、細胞構造ならびに機能の保全の確保となる。細胞壁あるいは細胞膜に薬剤が作用して変化が生じた場合、その程度が深刻な場合には細胞内容物の漏出で細胞死、深刻でない場合には細胞機能がほぼ保持される。

損傷は代謝機能ならびに構造的な観点からも判断できる²²⁾。代謝に関連した損傷の場合には最

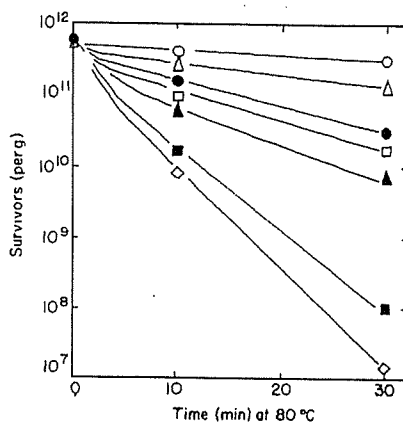


Fig.1. Injury and repair of the spore heat resistance mechanism by cation exchange.

Spores of *Bacillus megaterium* were equilibrated with acid at pH 4, then reequilibrated in solutions of salts of various cations at higher pH values.

The figure shows the reduction in resistance brought about by the acid treatment and the re-statement of resistance brought about by "re-loading" the spores with cations: ●, untreated control spores; ◇, acid treated at pH 4; ■, Ca²⁺ at pH 6; □, Ca²⁺ at pH 8; ○, Ca²⁺ at pH 9.5; ▲, Na⁺ at pH 8; △, Na⁺ at pH 9.5

小培地あるいは選択培地の様な栄養分が少ない培地では損傷菌の生育は認められないが富栄養培地では菌の生育は認められる。致死性的損傷菌を増殖させるためには特定の薬剤を培地に添加することで増殖能を回復させることが可能となる。例えば図1に示した様にカルシウムなどを添加することで損傷の回復が達成できる。

3. 化学的薬剤に拠る損傷からの再生

3-1. 修復

損傷菌の修復とは正常な生理的機能の再確保にある。損傷菌の場合には誘導期 (lag phase) が長くなっているが、正常細胞に回復することで誘導期間の長さも短縮され、同時にDNAや細胞壁構成成分であるペプチドグルカンなどの高分子成分の損傷も修復される²³⁾。これらの成分は正常細胞の機能にとって必須である。ペプチドグルカンの修復は必ずしも正常細胞への修復のために必須要件とは見なされず細胞の蘇生と考えられてい

るが、細胞壁が完全でなければ細胞内容物の漏出を可能にさせるためこの様な不完全な細胞壁の状態のまま存在することは決して好ましいことではない。

損傷細胞の再生とは修復と蘇生との組み合わせと考えられる。薬剤は菌体と接触することで細胞を構造的に変化させることで細胞機能の不全をもたらす、同時に種々の細胞因子を失活させることで滅菌効果の発揮に繋がる。

3-2. 蘇生

薬剤が細胞の損傷に与える部位は大抵の場合は既に特定されている²⁴⁾。抗菌剤のメカニズムは単一のメカニズムではなく、多くの場合多様なメカニズムの組み合わせで起こる。広範囲な阻害剤ならびに阻害効果の研究から、菌体と薬剤とは専ら強固な共有結合に拠って滅菌効果が発揮されると考えられている。共有結合の結果で起こるため、作用は不可逆的で生じる²⁵⁾。直接的な損傷の例としては例えば界面活性剤に拠る細胞膜の溶解での細胞構造の不安定化がある^{26, 27)}。その結果として細胞内容物の漏出が認められる。この場合、損傷を受けた菌体成分を外部から添加することで回復が図れるが、どの菌体成分が損傷されているか正確には分からないため最終的な手段としては培地を富栄養条件にすることで解決されることが多い。多くの場合、カルシウム、マグネシウム、グルコース、ピルビン酸、複合アミノ酸（特にL-アラニン必須）などの添加で損傷菌が修復することが知られている。

4. 細胞壁への化学的損傷

細胞壁の構成成分であるペプチドグリカンはムコペプチド (図2) でできた複雑な構造をしており、細胞の構造維持に寄与している。本構造のために高浸透圧にも耐える様になっている。ペプチドグリカンが無くなると原形質内に水が浸透し、膨潤が起り、その結果溶解 (lysis) が生じ、最終的には細胞死となる。その意味でペプチドグリカンは薬剤の滅菌ターゲットの最初の部位と考えられる。

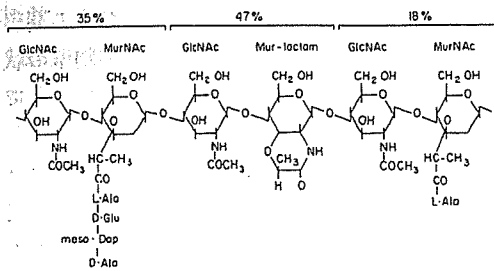


Fig. 2. Structure of peptidoglycan

4-1. 繊維状細胞誘導

大腸菌²⁸⁾やグラム陰性菌にはベータラクタム型抗生物質と共有結合する数種類の蛋白質の存在が知られている。これらには細胞伸張^{28, 29)}, 形態保持^{30, 31)}, ならびに細胞分裂に必要な蛋白質が含まれている^{32, 33)}。細胞分裂に必要な蛋白質の阻害は, 細菌の繊維状細胞化を生じさせる³²⁾。ベータラクタム型抗生物質は種々のペニシリン結合蛋白質と結合し, 抗生物質濃度に応じて細胞に形態変化を起こさせる。繊維状細胞誘導は結果として細胞死となる³²⁾。

4-2. 浸透圧

シクロセリンやペニシリンなどの細胞壁合成阻害作用を有する薬剤やリゾチームなどの蛋白分解酵素は細胞壁を溶解し, その結果細胞内部を高浸透圧に耐えることができなくさせる。しかし例えば高シヨ糖濃度の培地や血清が添加された培地の場合には高浸透圧にも耐えることができる。細胞壁合成阻害剤がある場合ならびに浸透圧安定剤が存在しない場合, 細胞形態の不安定化を引き起こす。細胞形態の不安定化を防ぐためには栄養源の供給ならびに浸透圧の調整が重要であり, その結果細胞は成長を維持することができ, 細胞分裂も昂進する^{34, 35)}。細胞壁合成阻害剤やリゾチームなどの除去あるいは不活化は細胞を通常の形態に復帰することを可能とさせる³⁶⁾。ただし細胞壁の全再合成機能の回復が重要であるため, リゾチームの不活化だけで達成される部分的な修復は細胞損傷成分に対する完全な修復とは見なされない。

低濃度の界面活性剤が細胞膜の加水分解を起

すことが知られている。またフェノールやホルムアルデヒドなどがペプチドグリカンの合成を阻害し, 細胞膜の分解を生じさせると考えられている。界面活性剤としてはトリトンならびにラウリル硫酸ナトリウム塩などが細胞膜の脂肪組織を溶解して分解させることが報告されている^{27, 37)}。

4-3. 細胞膜浸透性の変化

抗菌剤の作用に拠ってグラム陽性菌もグラム陰性菌もその細胞膜が変化する^{5, 6, 38, 39)}。グラム陰性菌の外膜と同時に細胞膜のペプチドグリカンは親水性高分子成分の分子ふるい効果を担う^{40, 41)}。その役割はペプチドグリカン層の厚さや架橋度に依存する⁴²⁾。薬剤の作用に拠って上記のペプチドグリカンの作用機能が低下し, 細胞膜孔径が広がってしまうことで親水性高分子が原形質膜に到達することを可能とさせてしまう。

グラム陰性菌の場合に, 疎水性最外層は親水性成分を排除するのに有効な働きをし, その結果リゾチームなどの親水性高分子に対する抵抗性が高まる。最外層は二価陽イオンで架橋されたペプチドグリカンならびにリポ蛋白質で安定化されている。EDTAはそのキレート作用でもって二価陽イオンを除去する。以上の作用で細胞を完全に死滅させ得ることはないが, 阻害剤の侵入を容易にさせることで細胞死に繋がる可能性は充分考えられる。

P. aeruginosa の場合, ブラウンリポ蛋白質が欠如しているため EDTA に対して感受性が高くなっている。そのため多価陽イオンを添加することで EDTA に対する感受性を低下させ, 健全状態に回復ならびに維持できる⁴³⁻⁴⁵⁾。

5. 原形質膜に対する化学薬剤での損傷

細胞内の生化学的変化は濃度依存で, K, Mg, Ca などの金属の存在が必要である。原形質内の溶質濃度は細胞外の濃度より高く維持されている。微生物の成育に際し細胞外の成分が必要とされる場合には濃度勾配に逆らって細胞外の成分が細胞内に取り込まれる。この濃度勾配に逆らった能動輸送にはエネルギー源として ATP を必要とする。

原形質膜は小分子量成分は通過させるが、高分子量成分は通過させない特性を持っている。この機能には特殊な輸送蛋白質が関与している。細胞膜は細胞の生育に最適となる様に細胞内成分濃度を維持する役割を果たしている。原形質膜に対する薬剤の作用は透過性を変化させて原形質内への栄養成分の輸送ならびに成分濃度に影響を与える。また膜に関連する酵素を阻害する。

5-1. 陽イオン浸透性の特異的变化

陽イオン輸送に関与する薬剤は極めて特異性がある。呼吸鎖のアンカップラーであるジニトロフェノールは呼吸に拠って膜を透過して生成するプロトンを消費させ、能動輸送を阻害する。膜透過性の変化は細胞内 K の消失、K 依存輸送ならびに生合成の阻害となり、更には呼吸に拠る酸化的リン酸化を阻害する。

薬剤に拠る細胞損傷は、細胞膜の浸透圧調整機能の損傷ならびに蛋白質合成の様な K 依存過程の損傷などから説明される⁴⁶⁾。これらは Na 含有培地では損傷菌の感受性が高まり、一方 K 含有培地では感受性の高まりが低いことから説明できる。K を Mg あるいは Ca に変えると更に良好な結果が得られることが期待される。ただ膜と薬剤との結合は単純なイオン結合であるため単純に希釈でもって薬剤は膜から遊離され、その結果損傷の回復と細胞の代謝機能の回復が認められるケースが多い。

5-2. 浸透性の非特異的变化

原形質膜の機能はリン脂質の二重層構造の維持にあり、そこには機能性蛋白質や構造蛋白質などが存在している⁴⁷⁾。これら蛋白質の機能ならびに構造維持は隣接するリン脂質の性質如何による。

抗菌剤の多くは非特異的に膜を透過したり、膜関連酵素活性を阻害する。これらの薬剤としては界面活性剤であるトリトン²⁷⁾やラウリル硫酸ナトリウム⁴⁸⁾、抗菌剤としては4級アンモニウム塩、フェノール^{49, 50)}、フェニルエタノール⁵¹⁾、フェノキシエタノール⁵²⁾、クロロヘキシジン⁵³⁾などがある。

これらの薬剤は膜と結合し、浸透し、内部の原

形質の脂質ならびに蛋白質と作用する。その結果膜の変形ならびに選択的透過性に変化を生じさせる。また膜結合細胞壁溶解蛋白質が遊離することで細胞の溶解ならびに死滅が生じる⁵⁴⁾。膜の非特異的な透過性の変化は細胞外へのリン酸⁵⁵⁾、核酸塩基⁵³⁾、ペントース⁵²⁾、K⁵⁶⁾などの漏出で確認できる。これらの物質の漏出の動力学は一般的に一次反応で起こる場合が多く、細胞内からの損失は損傷した膜からの漏出から説明されている⁵⁷⁾。また漏出量や漏出成分の違いは薬剤濃度や接触時間の長さなどに依存する。低濃度の場合には低分子量である K の漏出が顕著に見られ、高濃度の場合には高分子である核酸塩基の漏出が比較的多く認められる⁵²⁾。細胞内の K の漏出は膜損傷の初期の兆候の一つであり、これは細胞の浸透圧調整機能、蛋白質合成機能などの機能不全に起因する⁵⁸⁾。

細胞膜の損傷を修復し、物質の漏出を減少させることは可能ではある⁵⁹⁾。塩だけを含む選択培地では損傷菌の生育は認められない^{3, 4, 60)}。その理由としては原形質膜の損傷が考えられる。重致死状態の菌体の回復メカニズムは損傷メカニズムの解明そのものに繋がるが、その種の研究は少ない。例えばフェニルエタノール^{51, 61, 62)}やクロロヘキシジン⁶³⁾を用いた場合の研究例はそれらに該当する研究例であるが、これらの研究は多くはない。

フェニルエタノールは微生物の成育を阻害すると考えられているが、多様な濃度で菌体に対して多様な生理学的ならびに形態学的な効果が認められる。この効果は原形質膜に対する二次的な作用の結果と考えられており⁶⁴⁾それは原形質膜の K の損失ならびに色素アクリフラビンの細胞内浸透で立証されている⁵¹⁾。これら薬剤に拠って生じる変化は菌体損傷の指標に用いられることが多い。

菌体をフェニルエタノールで処理し、その後遠心分離で薬剤を除去した後10分間回復期間を置いた後色素アクリフラビンと接触させる。菌体内に侵入した色素の測定は残った上澄み液濃度から逆測定する。10分間で細胞は修復されるためフェニルエタノールが除去されたと判断される⁵¹⁾。同様な結果は CN が存在した場合にも得られて

いる。

フェニルエタノールの除去に拠って細胞内 K 濃度は本来の濃度に復帰する⁵¹⁾。フェニルエタノールに拠る処理後の膜修復では膜が物理的に修復され、そのことはフェニルエタノールが膜を物理的に変形させたことで一連の堅固な構造が維持されなければならない呼吸鎖を変化させることになり、フェニルエタノールの消失の立証で膜の構造が本来の形態に復帰したと解釈される。

亜致死濃度のクロロヘキシジンの暴露は原形質膜を損傷させ、その結果細胞内 K⁶⁵⁾、核酸塩基⁶³⁾、リン酸⁶⁵⁾などを消失させる。クロロヘキシジンは細胞膜中の蛋白質と相互作用し、呼吸鎖の電子伝達系を阻害させることが知られている^{66, 67)}が、低濃度でもその様な阻害作用を示すかどうかについては定かではない。6.1ppm のクロロヘキシジンに5分間暴露された *B. megaterium* の損傷回復の場合、SCDA (ソイビーンカゼイン消化寒天) 培地に添加された際、約半数の修復生育しか認められない⁶³⁾。つまり残りの半分は SCDA 中に5.5%含有する KCl のために阻害されたままで存在していることになる。KCl に対する耐性の損失が膜損傷の指標であり、30分間 SCDB (ソイビーンカゼイン消化液体) 培地で培養すると損傷が回復する⁶³⁾。しかし更に深刻に損傷された菌の場合には60分間の培養でも菌の増殖の開始は認められない。SCDB 培地に含まれる呼吸阻害剤、蛋白形成阻害剤、核酸塩基形成阻害剤は損傷菌が示す KCl 感受性の回復には顕著な影響を示さない (図3)⁶³⁾。塩感受性からの回復は膜損傷回復と一致した結果を示す⁶⁸⁾。これには損傷の程度にも拠るが少なくとも4時間を要する。深刻な代謝機能の損傷を伴った熱損傷菌や原形質膜の構造的な変形を伴った熱損傷菌の場合にはその回復には更に長時間を要する^{69, 70)}。30分以内の塩感受性からの回復も報告されているが、それは凍結細胞¹⁶⁾やフェニルエタノール⁵¹⁾の様な化学薬剤に拠る損傷の場合であって熱損傷の場合には当てはまらない。

クロロヘキシジンの場合には膜の物理的な変形だけが起こり、そのために回復も早く、修復に際し蛋白質、核酸塩基の形成も要求されない。通常

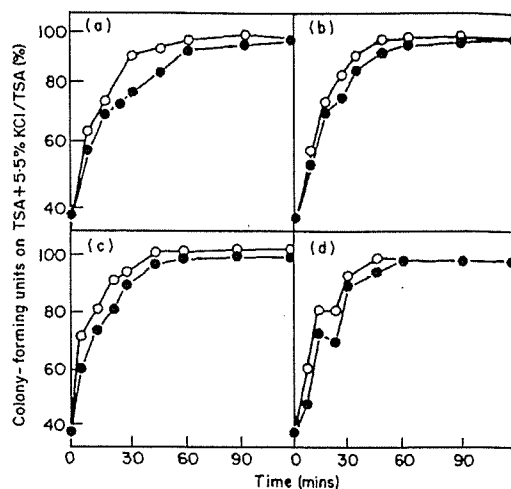


Fig.3. Recovery of salt tolerance by *Bacillus megaterium* cells treated for 5 min with 12 μ mol/l chlorhexidine and recovery

(○) tryptone soya broth (TSB); (●) TSB containing various metabolic inhibitors: (a) actinomycin D, 15 μ g/ml; (b) chloramphenicol, 20 μ g/ml; (c) nalidixic acid, 20 μ g/ml; and (d) antimycin A, 10 μ g/ml. Colony-forming ability on tryptone soya agar (TSA) +5.5% (w/v) KCl is expressed as a percentage of those on TSA alone.

の場合、薬剤は原形質膜に挿入し、その形態を歪曲させる。回復は薬剤 (例えばフェニルエタノールやポリミキシンなど) の除去と膜の物理的形態の修復と膜組成物 (脂質、蛋白質) の蘇生の結果で得られる。

原形質膜に対する深刻な損傷は高分子物質 (例えば蛋白質など) の漏出が見られ、それは酵素の加水分解や膜組成物の上清液の溶解と関連して起こる。膜組成物の上清液の溶解はトリトンの様な界面活性剤の作用でも見られ、その結果として膜蛋白質の溶解が起こるとされている^{26, 27)}。またトルエンでの脱脂質でもこのことは起こる¹¹⁾。トリトンやトルエンでの膜破壊の修復の場合、6時間以上でも修復されないため、この様な場合の損傷は回復不能な不可逆的損傷と考えられる²⁰⁾。

原形質膜の損傷はその透過性を変化させることで得られる2種類の損傷が存在する。その一つは薬剤を不活化させることで容易に回復可能な損傷で、これは薬剤と膜組成物とが物理的に結合して

いる可能性が考えられる。他の場合としては膜組成物の分解も含んだ不可逆的な損傷である。

化学薬剤と微生物の細胞との関係は特異的なレセプター部位での不可逆的な共有結合あるいは特異的な分子団との可逆的なイオン結合の何れかで起こる。不可逆的な結合の場合でも、一時的な細胞機能損失が細胞にとって耐え得る程度のものであれば残留薬剤の除去あるいは中和後に回復が起こり、損傷組成物は再合成される。その様な損傷は薬剤と膜組成物との直接的な結合あるいは欠損細胞組成物の合成の何れかで生じる。回復は損傷後2～4時間以内に起こり、それは熱損傷の場合に類似し、菌に対しては深刻な代謝損傷が起こっている。薬剤とレセプターとの非共有結合の場合は懸濁液の希釈、中和剤の添加などで結合を外すことができる。その様な可逆的な場合には回復も容易に起こる。

化学薬剤に対する阻害剤を用いて損傷回復を図る研究がなされているが、化学薬剤に拠る微生物の損傷メカニズムが未だ十分に解明されていないため、阻害剤を用いる研究も今後に残された課題であり、損傷回復条件を極めるに於いてまずは損傷メカニズムの解明が待たれる。ただこれは全ての滅菌方法に共通して言えることであるが、培養培地を富栄養条件にすれば損傷回復が早まり、高まることだけは過去から経験的に知られている。

参 考 文 献

- 1) Sorrels, K. M., Speck, M. L., and Warren, J. A. (1970) Pathogenicity of *Salmonella gallinicus* after metabolic injury by freezing. *Appl. Microbiol.*, 19, 39-43.
- 2) Mossel, D. A. A., and Corry, J. E. L. (1977) Detection and enumeration of sublethally injured pathogenic and index bacteria in foods and water processed for safety. *Alimentation-sonderausgabe Mikrobiol.*, pp.19-34.
- 3) Scheusner, D. L., Busta, F. F., and Speck, M. L. (1971a) Inhibition of injured *Escherichia coli* by several selective agents. *Appl. Microbiol.*, 21, 46-49.
- 4) Scheusner, D. L., Busta, F. F., and Speck, M. L. (1971b) Injury of bacteria by sanitizers. *Appl. Microbiol.*, 21, 41-45.
- 5) Gilbert, P., and Brown, M. R. W. (1978a) Effect of R-Plasmid RPI and nutrient depletion on the gross cellular composition of *Escherichia coli* and its resistance to some uncoupling phenols. *J. Bacteriol.*, 133, 1062-1065.
- 6) Gilbert, P., and Brown, M. R. W. (1978b) Influence of growth rate and nutrient limitation on the gross cellular composition of *Pseudomonas aeruginosa* and its resistance to 3- and 4-chlorophenol. *J. Bacteriol.*, 133, 1066-1072.
- 7) Gilbert, P., Dickinson, N. A., and Brown, M. R. W. (1979) Interrelation of DNA replication, specific growth rate and growth temperature in the sensitivity of *Escherichia coli* to cold shock. *J. Gen. Microbiol.*, 115, 89-94.
- 8) Iandolo, J. J., and Ordal, Z. J. (1966) Repair of thermal injury of *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.*, 91, 134-142.
- 9) Mossel, D. A. A., and Ratto, M. A. (1970) Rapid detection of sublethally impaired cells of *Enterobacteriaceae* in dried foods. *Appl. Microbiol.*, 20, 273-275.
- 10) Nelson, F. E. (1972) Enumeration of *Escherichia coli* in frozen samples after recovery from injury. *Appl. Microbiol.*, 25, 499-503.
- 11) Ray, B., and Speck, M. L. (1973a) Discrepancies in the enumeration of *Escherichia coli*. *Appl. Microbiol.*, 25, 494-498.
- 12) Busta, F. F. (1976) Practical implications of injured microorganisms in food. *J. Milk Food Technol.*, 39, 138-145.
- 13) Hurst, A., Hendry, G. S., Hughes, A., and Paley, B. (1976) Enumeration of sublethally treated staphylococci in some dried foods. *Can. J. Microbiol.*, 22, 677-683.
- 14) Norman, E. G., and Malcom, C.P. (1984) Damage and repair from ionizing radiation. In *Repairable lesions in microorganisms*, Hurst, A and Nasim, A (eds), pp. 58-85, London, Academic Press.
- 15) Adams, D. M. (1978) Heat injury of bacterial