

# 肝細胞の呼吸に及ぼす高水圧の影響

## 特に基質との関連性について

岡山大学医学部第一生理学教室 (指導: 前林 香苗教授)  
 (指導: 現西田 勇教授)

大学院 得 本 博 允  
 学 生

〔昭和37年8月6日受稿〕

### I. 緒 言

高水圧の生活組織に及ぼす影響については、Talisman が深海に生物の存在するという事を認めて以来、Regnard<sup>22)</sup> や Certes<sup>5)</sup> の実験を始めとし数多くの研究がなされている。そのうち呼吸作用に及ぼす高水圧の影響に関するものとしては、E. Büchner<sup>3)</sup> 及び H. Büchner<sup>4)</sup>, Chlopin 及び Tammann<sup>6)</sup>, Fontaine<sup>7)</sup>, Benthous<sup>1)</sup>, Johnson<sup>10)-12)</sup>, Borrowman<sup>2)</sup>, 並びに Morita<sup>17)</sup>, ZoBell<sup>16)-17)</sup> 等のおびただしい報告に接し得る。これら多くの業績と相まって我々の教室においても十数年来多くの研究がなされている。これらの実験成績の一つとして大和<sup>20)</sup>, 川岡<sup>14)</sup>, 市橋<sup>9)</sup>, 安田<sup>26)</sup>, 河野<sup>15)</sup> 等により筋肉を始め大脳, 腎臓, 心臓, 末梢神経等諸種の生活組織は、300kg/cm<sup>2</sup> 程度の水圧のもとでの酸素消費が亢進するという興味ある報告がなされている。即ち大和<sup>20)</sup> はメダカの棲む水の圧力を 60~200kg/cm<sup>2</sup> に上げてメダカの酸素消費量が亢進することを認め、蛙の別出縫工筋も 100~300 kg/cm<sup>2</sup> において圧の高さに応じ酸素を多量に消費することを証明した。川岡<sup>14)</sup> は骨格筋を始め大脳, 腎臓, 心臓, 及び坐骨神経に水圧を作用させ、100~300 kg/cm<sup>2</sup> において酸素消費が亢進するが、しかし 400 kg/cm<sup>2</sup> 以上の加圧ではこの亢進作用はかえって減少してくることを観察した。次いで市橋<sup>9)</sup> は加圧処理した細菌浮游液の酸素消費量を調べ球菌では 1600 kg/cm<sup>2</sup> でも抑制されず却つて多量の酸素を消費し、芽胞のある馬鈴薯菌では特に酸素消費の増加が著しいと報告している。河野は高圧作用中の細菌その他縫工筋・大脳, 腎臓, 心臓等蛙の別出諸組織につき 100~500kg/cm<sup>2</sup> ではその呼吸の亢進を認めた。そこで著者は蛙の別出肝組織のホモジェネート及びスライスを用いた場合にも同様のことが観察されるかどうか、あるいはその呼吸を主として基質との関

連性からみた場合の変化はどうか、更には前述の如き加圧による酸素消費の促進は如何なる作用機序によるものか等をしらべるために本実験を行なった。即ち Warburg 氏検圧計により主として TCA-サイクルに関係ある基質を用いて酸素消費をしらべ、Neotetrazolium Chloride (以後 NT 塩と略す) にてコハク酸脱水素酵素活性を、Thunberg 法を用いて脱水素酵素活性の変化をしらべた。更にその阻害物を添加し阻害効果に対する圧影響の上に如何なる変化があるかを肝組織スライスを用いて観察した。

### II. 実験材料, 装置及び方法

(1) 試料: トノサマカエル (*Rana nigromaculata*) の肝組織ホモジェネート及び肝組織スライスを使用した。即ち別出肝臓 (500 mg) を磷酸緩衝液で pH 7.2 とした等張 KCl 溶液に入れ、ホモジェナイザーで懸濁液を作製し、その 10% 稀釈液を 5000 r. p. m. で遠沈して、その上清を実験に試供した。一方肝組織スライスは肝臓を生理的食塩水で洗滌しあらかじめ長方形に作つてから slicer の上におき、常法<sup>24)</sup> に従つて厚さの比較的そろつたものを 7×18 mm の大きさに載る。酸素消費量を測定した後 100°C, 90 分乾燥させ、その単位瓦当りの酸素消費量を算出し、それを比較検討した。

(2) 基質: グルコース, フルクトース, 乳酸, 酒石酸, グルタミン酸, 焦性ブドウ酸, クエン酸, コハク酸, 醋酸, リンゴ酸, グリセロ磷酸を用い終末濃度が M/100 となる様に調製した。

阻害物として用いた薬品は 1.10<sup>-2</sup> M から 1.10<sup>-6</sup> M迄の各種濃度のマロン酸溶液である。

(3) 加圧装置: 実験に使用した高圧ポンプ装置は、既に報告<sup>9)26)</sup> されている教室の油圧型高圧ポンプで、これを用いて試料に全周から平等に 100, 300, 500, 800, 1000, 1500 kg/cm<sup>2</sup> の各圧力を30分間加えた。

ホモジェネート及びスライスは二分し、一方を加圧し他方を対照とした。測定に当り何れも流動パラフィンを重層し同一室温に保ち、出来るだけ両者を同一条件にするようにした。除圧後、油を除去して駒込ピペットで必要量を中層より取り出し測定した。

(4) 酸素消費量測定：Warburg 氏検圧計を用いた常法<sup>24)</sup>に従い圧力を負荷した試料につき除圧直後にその酸素消費量を測定した。

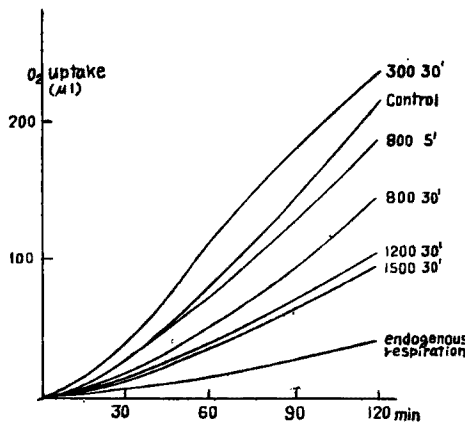
(5) NT 塩によるコハク酸脱水素酵素活性測定：コハク酸を基質として種々高圧下の NT 塩還元反応を行なった。小田<sup>20)</sup>の行なった方法に従い基質の量、NT 塩の量、組織量及び pH を定めた。

(6) 脱水素酵素活性測定：脱水素酵素活性については Thunberg 法に準拠して methylene blue の褪色時間を測定した。褪色時間の逆数と対照の褪色時間の逆数の商をもつて還元係数とし、脱水素酵素作用の強度とを比較検討した。

III. 実験成績

(1) 肝組織ホモジェネートに対する加圧効果を窺う目的で、グルコースを基質として 100~1500 kg/cm<sup>2</sup> に至る各気圧を30分作用させた時の酸素消費量を測定した結果を第1図に示した。この図に見ら

図1 肝組織ホモジェネートの酸素消費に及ぼす高圧の影響



縦軸……酸素消費量  
横軸……時間

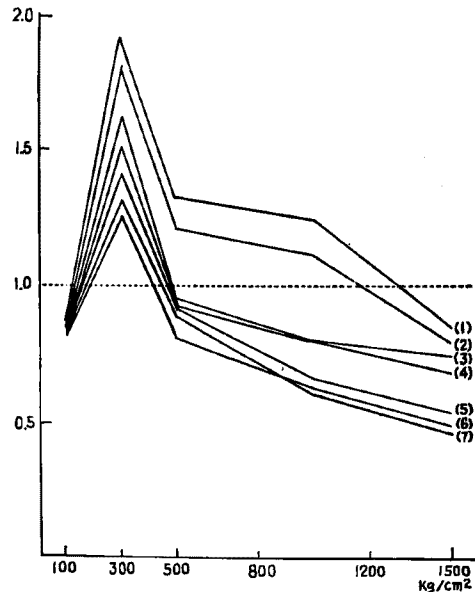
加圧時間：5分及30分  
試料：肝組織ホモジェネート  
基質：0.01 M グルコース  
実験条件：37.5°C 2時間

れる如く肝組織ホモジェネートの酸素消費に及ぼす高水圧の影響は、300kg/cm<sup>2</sup>で促進し単位時間における酸素消費量は対照の1.2~2倍となり800 kg/cm<sup>2</sup>では30分加圧、5分加圧でも酸素消費は抑制されてそれぞれ約0.9倍、0.6倍となり1200kg/cm<sup>2</sup>で約0.5倍、1500 kg/cm<sup>2</sup>で約0.4倍となる。高圧を作用さすと著明な阻害を受け、阻害度は圧の高い程大となり、又加圧時間の長い程大となる。

(2) 次に第2図は諸種基質を用いて肝組織ホモジェネートの酸素消費量に及ぼす高水圧の影響を示したものである。試料を300 kg/cm<sup>2</sup>、30分加圧の後、基質としてグルコース、フルクトース、焦性ブドウ酸、リンゴ酸、乳酸、酒石酸、アスパラギン酸を作用させた場合、一つの最高値を示し、500 kg/cm<sup>2</sup>以上では酸素消費の低下が見られ TCA-サイクル上のもものではコハク酸において低下が認められた。これに反し第1表に示す様に醋酸、クエン酸、グリセロ磷酸、あるいはグルコサミンを用いると、却つて高圧(800 kg/cm<sup>2</sup>、30分)により酸素消費量の増加が認められた。

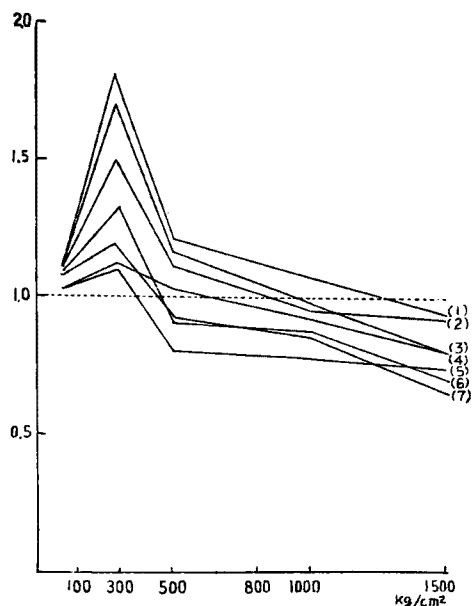
肝組織の酸素消費に及ぼす高圧の影響と基質の種類

図2 肝組織ホモジェネート



(1) 醋酸 (5) コハク酸  
(2) クエン酸 (6) 焦性ブドウ酸  
(3) フマル酸 (7) グルコース  
(4) リンゴ酸

図3 肝組織スライス



縦軸……酸素消費量 (1) 醋酸  
 (2) クエン酸  
 (3) グルコサミン  
 横軸……高圧度 (4) 乳酸  
 (5) コハク酸  
 (6) 焦性ブドウ酸  
 (7) グルコース  
 加圧時間: 30分  
 基質: 0.01M  
 実験条件 37.5°C 2時間

表1 肝組織ホモジェネートの呼吸抑制

	800kg/cm <sup>2</sup> 30min.			1200kg/cm <sup>2</sup> 30min.		
	C (対照)	P (加圧)	P/C (%)	C (対照)	P (加圧)	P/C (%)
グルコース	215.5	148.7	69.4	345.6	185.0	53.5
フルクトース	166.3	163.4	98.3	134.4	108.9	81.0
リンゴ酸	224.2	210.4	93.8	124.6	89.0	71.4
フマル酸	221.9	178.4	80.4	165.0	125.0	75.7
醋酸	149.6	223.4	131.2	245.9	218.5	89.1
乳酸	174.2	98.0	56.3	318.8	165.9	52.2
コハク酸	273.3	194.7	71.3	235.3	144.1	56.8
クエン酸	165.4	199.1	121.0	117.9	101.1	86.0
グリセロリン酸	171.6	215.6	125.6	243.7	222.2	90.1
焦性ブドウ酸	273.0	196.6	71.8	235.0	131.6	56.0
アスパラギン酸	169.5	156.5	98.2	200.8	168.3	80.8
グルコサミン	98.7	117.6	119.2	230.4	172.2	74.3

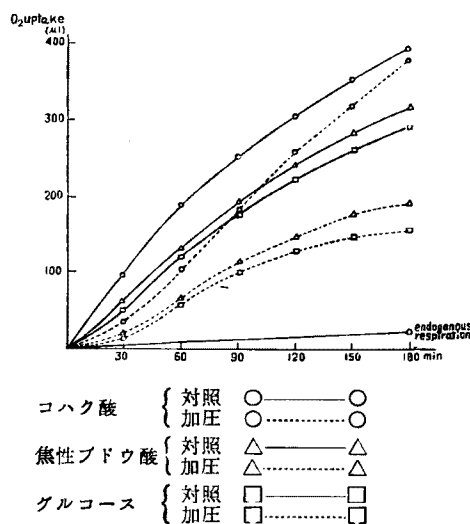
(数値は2時間の酸素消費量 (X<sub>02</sub>) を示す)

(3) 肝組織スライスにおける成績は第3図の如くである。曲線に示す如く基質別に観察すると、醋酸、クエン酸、グルコサミンの場合酸素消費の亢進を示

し、グルコース、焦性ブドウ酸、コハク酸において高圧に依つて著明に阻害されることがわかる。即ちホモジェネートの場合と類似の成績を得たが、100 kg/cm<sup>2</sup> でホモジェネートでは多少阻害をうけるのに反し、スライスの場合、いずれの基質でも亢進し、特に 300 kg/cm<sup>2</sup> では各基質共圧力による細胞機能の亢進は強くなり最高値を示し、500kg/cm<sup>2</sup> 位迄持続する。それ以上の圧力になると抑制へと移行し、且つ圧力が高くなる程その抑制の程度も大となる。この傾向もホモジェネートと大体類似しているが、ただ 1000~1500 kg/cm<sup>2</sup> における阻害効果がホモジェネート (0.8~0.45) よりスライス (0.95~0.65) の場合が小である。

(4) 第2図において基質の酸化能にかなりの阻害が認められたコハク酸、グルコース、焦性ブドウ酸の基質を用い、1500 kg/cm<sup>2</sup> の圧を加えて後、除圧してからの酸素消費の時間的推移を観察した。第4

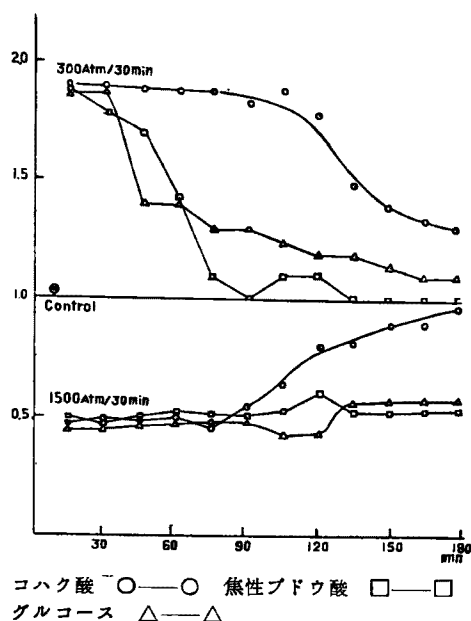
図4 肝組織ホモジェネートの酸素消費量の時間的推移



図に示す如く、グルコース、焦性ブドウ酸は3時間後もかなりの低下を示しているが、これに反してコハク酸において漸次回復され、3時間後には殆んど正常値迄回復し対照と殆んど差がなくなり、最終酸素消費量は対照と略々同程度となる。

(5) コハク酸、グルコース、焦性ブドウ酸を基質として 1500 kg/cm<sup>2</sup>, 300 kg/cm<sup>2</sup> の圧を30分加えて酸素消費量を測定した。その結果は第5図の如くで、コハク酸を加えたものは 1500 kg/cm<sup>2</sup> で抑制さ

図5 肝組織ホモジェネートの単位時間当りの酸素消費の時間的推移



れたものがまもなく回復する。300 kg/cm<sup>2</sup> で促進しているものでは長く促進効果が残る。これに対してグルコース、焦性ブドウ酸を基質とした場合は、1500 kg/cm<sup>2</sup> で抑制された時も 300 kg/cm<sup>2</sup> で促進されたものも除圧直後はコハク酸と変わらないが、抑制からの回復が遅く促進されたものも早く促進が消えるという相違がみられる。

(6) 肝組織スライスを加圧し、除圧後各種基質を作用させて酸素消費量を測定すると、何れの基質においてもその酸素消費量が 100~500 kg/cm<sup>2</sup> で亢進し、800 kg/cm<sup>2</sup> 以上では圧力の増加と共に酸素消費量が減少することは上記のホモジェネートの成績と類似しているが、第3図にみられる様に阻害効果の強く表われた基質の内、グルコース、焦性ブドウ酸、コハク酸の三基質を用い肝組織スライスについて除圧後長時間観察し、その時間的推移をみた。即ち図 6a, 6b, 6c に示された如く、コハク酸においては他の二基質と異なり 300 kg/cm<sup>2</sup> の促進効果が長く残り、又 1500 kg/cm<sup>2</sup> における抑制も著明に早く回復することが認められた。寧ろホモジェネートの場合よりスライスの方が回復現象が著明である。

以上のことより高圧の肝細胞の呼吸に対する作用点がグルコースより焦性ブドウ酸、又は焦性ブドウ酸から TCA-サイクルに入る径路、主としてコハク酸酸化系に存するのではないかと考えられる。そこで高圧下のコハク酸脱水素酵素活性度を調べようと NT 塩を用い、次の如き実験を行なった。

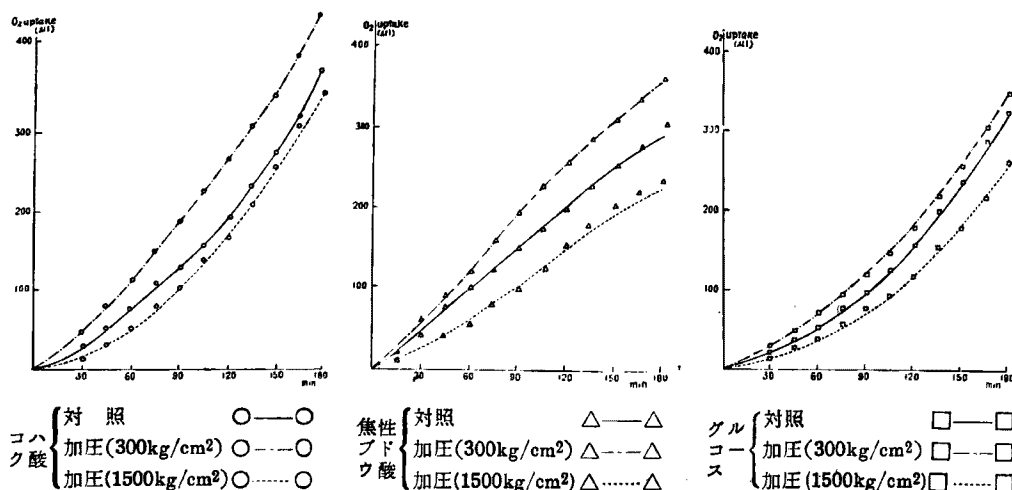
(7) 肝組織ホモジェネートに種々の高圧を加え除圧後コハク酸、及び NT 塩を加え NT 塩の還元される量を比色計により測定した。第7図はその成績を示したものである。300 kg/cm<sup>2</sup> では対照より還元量が増大し、それ以外の加圧範囲、即ち 300 kg/cm<sup>2</sup> より低い圧、又は高い圧では減少する。各圧における endogenous reduction は圧の増加と共に増えて

図6 肝組織スライスの酸素消費量の時間的推移

図6 a

図6 b

図6 c



コハク酸酸化酵素活性に及ぼす高圧の影響

図7 肝組織ホモジェネート

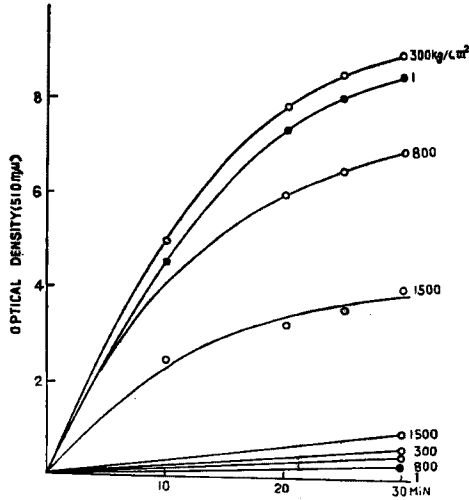
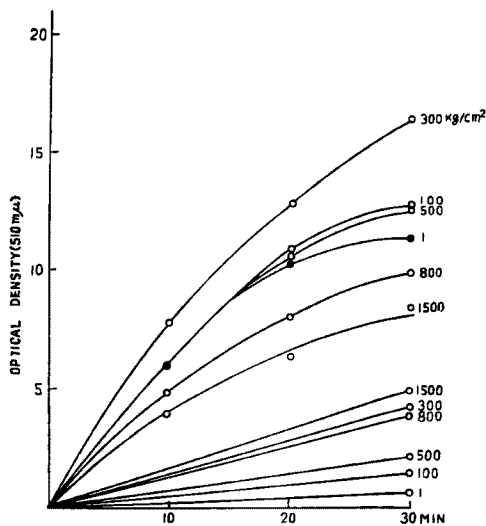


図8 肝組織スライス



基質：○ — ○ コハク酸  
 ○ — ○ 無基質

おり 1500 kg/cm<sup>2</sup> では 1 kg/cm<sup>2</sup> の 4~5 倍の値が見られた。

(8) 肝組織スライスについて(7)と同様の実験を行なった。その成績は第8図の如く、100, 300, 500 kg/cm<sup>2</sup> でいずれも還元された NT 塩は対照に比し増大し、800 kg/cm<sup>2</sup> 以上では活性を減じ30分間の NT 還元量は圧力の増加につれて減少している。endogenous reduction を補正すると、1, 300,

500 kg/cm<sup>2</sup> では NT 塩還元量が大体等しい値を示しているが、800, 1000, 1500 kg/cm<sup>2</sup> では相当低下しており、それぞれ 1 kg/cm<sup>2</sup> のその 0.7, 0.65, 0.5 に抑制されている。従つて高圧の肝細胞の呼吸に対する作用点は主としてコハク酸脱水素酵素系に存することがうかがえる。

(9) 次に肝組織ホモジェネートにつき Thunberg 法で methylene blue の脱色時間を測定し第9図及び第10図に示す様な成績を得た。基質としてグルコース、焦性ブドウ酸、コハク酸、乳酸、クエン酸、アスパラギン酸を用いた場合各基質によつて非常な差が認められた。第9図は対照の還元係数を10として各種基質を用いた場合の値を示したものである。即ちコハク酸は著明な促進傾向(褪色時間の短縮)を示し、グルコース、焦性ブドウ酸でも多少の促進を認めたが、乳酸、アスパラギン酸、クエン酸については対照と差を認め得なかつた。次にコハク酸、焦性ブドウ酸、グルコースの三基質を用いて1~1500 kg/cm<sup>2</sup> の範囲で各基質別脱水素酵素作用に対する高水圧の影響を検討したものが第10図で、加圧した

図9 各種基質による肝組織ホモジェネートの脱水素酵素作用

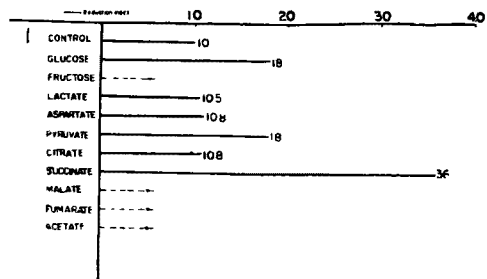
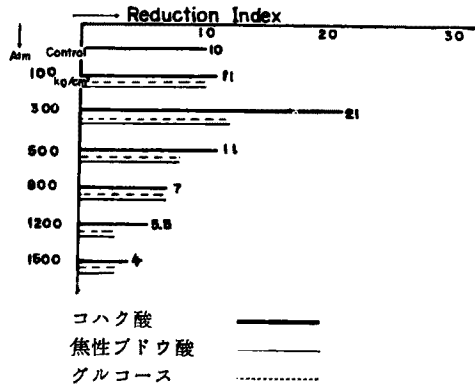


図10 肝組織ホモジェネートの各種基質別脱水素酵素作用に対する高水圧の影響



場合何れも脱色時間の遅延を認める。然し唯 300 kg/cm<sup>2</sup> においてコハク酸を基質として用いた場合のみ脱色時間が著しく短縮する。

(10) 肝組織スライスにつき(9)と同様にThunberg法により各基質の脱水素酵素活性に及ぼす影響を観察し、その成績は第11図に示す如くである。対照の還元係数 10 に対し係数値の大なるものはコハク酸 (18.3) 焦性ブドウ酸 (15.2) グルコース (15.2) で明らかに活性を示したが、醋酸 (8.5)、リンゴ酸 (8.5)、フマル酸 (8.5) ではいずれも抑制を示している。肝細胞はコハク酸、焦性ブドウ酸、グルコース、乳酸、クエン酸の脱水素酵素を有することが認められた。次に肝組織スライスの各基質別脱水素作用に及ぼす高水圧の影響については第2表に示してある如く、300kg/cm<sup>2</sup> ではいずれを基質とした場合でも脱水素作用が促進するが、100 kg/cm<sup>2</sup>, 500 kg/cm<sup>2</sup> ではグルコース、焦性ブドウ酸、コハク酸を基質とした場合のみ促進し、他の場合は阻害するのが認められた。

図11 肝組織スライスの各基質別脱水素酵素作用

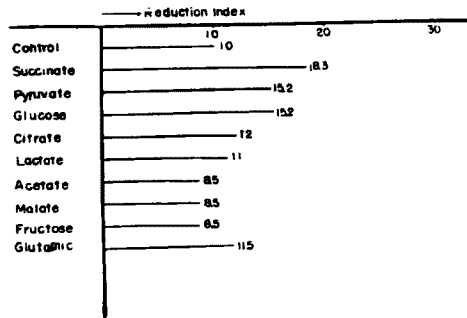


表2 肝組織スライスの各基質別脱水素酵素作用に対する高水圧の影響

Sub	Substrate								
	Glucose	Lactic a.	Glutamic a.	Pyruvic a.	Citric a.	Succinic a.	Acetic a.	Malic a.	Fumaric a.
100	105	97	93	109	83	157	81	80	85
300	140	123	112	157	102	217	101	105	101
500	101	86	93	102	85	136	81	82	83
800	90	79	83	90	75	95	70	72	72
1000	85	73	72	85	58	92	65	67	68
1500	67	62	50	72	40	85	50	40	44

$$\text{基質別脱水素酵素阻害度} = \frac{\text{加圧した場合のD.A}}{\text{加圧しない場合のD.A}} \times 100$$

(11) 肝組織スライスにつきコハク酸脱水素酵素に対する阻害物であるマロン酸の作用が高圧により如何に影響されるかをしらべるため、1.10<sup>-2</sup>M から1.10<sup>-6</sup>M迄の各種濃度のマロン酸溶液の阻害作用についてそれぞれ行なつた実験成績を第12, 13図に示した。第12図はコハク酸脱水素酵素作用に及ぼす1.10<sup>-2</sup>M マロン酸溶液の影響を示したもので著明に阻害され、endogenons reductionと同じ位になる。なお肝組織ホモジェネートの場合は1.10<sup>-6</sup>Mで8.7, 1.10<sup>-2</sup>Mで2.8の値を示し肝組織スライスと同様の阻害が認められる。第13図はマロン酸溶液

図12 コハク酸脱水素酵素作用に及ぼすマロン酸の影響

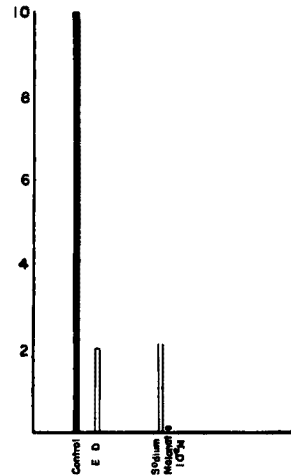
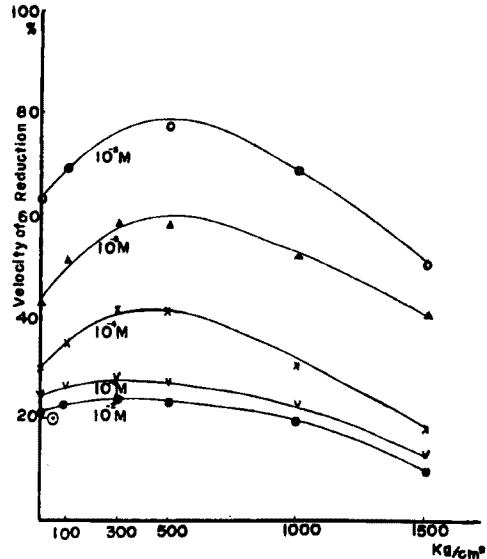


図13 コハク酸脱水素酵素作用に及ぼすマロン酸の作用に対する高圧の影響



の阻害作用に対する高圧の影響を検討したもので、常圧においてはマロン酸溶液の濃度に応じてコハク酸脱水素酵素作用を減弱する。100~500 kg/cm<sup>2</sup>では常に enzyme activity を促進させる方向へ働き、殊に 1.10<sup>-5</sup>M, 1.10<sup>-6</sup>M の低濃度ほど圧力によるマロン酸阻害作用の減少が著明に見られる。又 1000, 1500 kg/cm<sup>2</sup> の場合マロン酸の低濃度において高濃度に比し slope がやや急である。即ち 1.10<sup>-5</sup>M, 1.10<sup>-6</sup>M の低濃度ではマロン酸阻害作用の抑制が少なくなる様に見うけられる。

#### IV. 考 按

高水圧の各種生活組織の酸素消費量に及ぼす影響に関する研究は現在迄に数多くのがなされている。その多くの業績を概観すると、古くは 1928 年 Fontaine<sup>7)</sup> によつてなされており、それによると海棲動物の酸素消費量が水圧上昇と共に亢進し、常圧にすると一時抑制され、次いで元に復するといつてゐる。その後教室の大和<sup>25)</sup> はメダカを用いて 300 kg/cm<sup>2</sup> 迄の加圧下では、その酸素消費量が亢進することを認め、又剔出組織ではトノサマガエルの縫工筋においても 100~300 kg/cm<sup>2</sup> でその酸素消費量が圧の高さに比例して増大することを報告している。更に川岡<sup>14)</sup> は 2000 kg/cm<sup>2</sup> 迄の加圧下でトノサマガエルの剔出組織につき特に縫工筋、大脳、腎臓、及び坐骨神経について酸素消費量を測定し、何れの組織を用いても 300 kg/cm<sup>2</sup> 迄は圧の高さに比例して増大し、それ以上の圧では圧力の増加につれ漸次酸素消費の減少が現われてくるといつてゐる。長尾<sup>19)</sup> は蛙の口蓋粘膜の酸素消費を検べ、粘膜上皮の線毛運動を停止せしめる程度の高水圧では、その酸素消費が抑制され、更に圧力をますます酸素消費量が増加したと報告している。その後市橋<sup>9)</sup> は細菌を用いて、その酸素消費に対する圧力効果を追求しており、その結果普通の桿菌では 30 分加圧で 600 kg/cm<sup>2</sup> 迄影響なく 800~1600 kg/cm<sup>2</sup> で多少の阻害を見ている。又球菌では 1600 kg/cm<sup>2</sup> でも抑制されず却つて酸素消費の促進効果が認められたことを報告している。安田<sup>26)</sup> は緑膿菌において種々の基質を用いて高圧による酸素消費を観察し、クエン酸、酪酸等の基質を用いると却つて高圧による酸素消費が促進することを認めている。以上大和<sup>25)</sup>、川岡<sup>14)</sup>、長尾<sup>19)</sup> 等の成績は加圧中の酸素消費を除圧直後 Winkler 氏法により液体内酸素含量を以て測定したものであり、市橋、安田の成績は除圧後

Warburg 氏検圧法で測定したものである。河野<sup>16)</sup> は固定白金電極オキシグラフを用いて加圧中の各組織の酸素消費量を検べ、川岡と同様の成績を得ている。これら一連の各種組織呼吸に対する研究から各組織に圧力を加えると、その圧力効果はある程度の圧では細胞の呼吸作用を促進し、更に圧力の増加と共に抑制すること等が明らかになつた。肝組織ホモジュネート及び肝組織スライスを用いての著者の実験によると、300 kg/cm<sup>2</sup> の圧力でその酸素消費に促進効果が現われ、その結果も 300 kg/cm<sup>2</sup> 辺りに最も著しい促進が認められる。500 kg/cm<sup>2</sup> 位から抑制の徴を見せ 1000~1500 kg/cm<sup>2</sup> の高圧においては加圧によつて著明に抑制される。これは今迄教室で得られた結論と一致している。

大和<sup>25)</sup> の報告によると、細胞核のないヒトの赤血球を用いた場合、血球が 300 kg/cm<sup>2</sup> 辺りで溶血しやすくなること、血球から K イオンの脱出が増すこと、赤血球沈降速度が促進されること等を認め、高圧による血球の形状変化、血球形質膜の透過性の増加などを認めている。岡田<sup>21)</sup> は蛙筋肉及び上皮の静止電流が高圧の作用で減少すること、又蛙の上皮、腸間膜、膀胱、家兎及び山羊の血球等に高圧を作用せしめて、その電気伝導度の変化から細胞原形質膜の透過性が亢進することを認めている。又紫露草の葉柄裏面の表皮細胞を用い高水圧により原形質分離が起りにくくなることから原形質膜の透過性が増加したことを確認している。この様に圧力は細胞膜の透過性を高める性質があるから、肝組織ホモジュネートの場合でも 300 kg/cm<sup>2</sup> 辺りの圧力でミトコンドリアの形質膜透過性を亢めた結果酸素消費が増大し、更に圧力がますますミトコンドリア中の酵素群の配列が崩壊され酸素消費が低下するのではないかと思われる。これは biological whole として用いた肝組織スライスの場合にも推考される事である。

次いで肝組織ホモジュネートを用いて TCA-サイクルを中心とした諸種糖類、若干のアミノ酸、アルコールを基質として加えた時、各基質別酸化能に対する圧力効果は異なり、酪酸、クエン酸、グリセロリン酸、グルコサミンを添加した場合のみ、800 kg/cm<sup>2</sup> にても圧力により呼吸の促進することが認められた。これは先に述べた安田の緑膿菌についての実験の報告と同様の成績である。なお、グルコース、コハク酸、焦性ブドウ酸においては著明な抑制が認められたが、このことは基質の分解酵素そのものが圧によつて影響するのでなく、圧力により細胞

膜透過性の変化がおり、二次的に基質の適応酸化が影響されるものと考えられる。次に基質と呼吸の関連性を中心として酸素消費に及ぼす圧力作用について考察する目的で、前記肝組織ホモジェネートの呼吸作用で著明な抑制の認められたグルコース、焦性ブドウ酸、コハク酸の三基質を加え除圧後長時間酸素消費量を観察してみると、グルコースより焦性ブドウ酸への経路、あるいは焦性ブドウ酸から TCA-サイクルへの経路に圧力作用が最も大きく加わっているものと考えられる。そこで TCA-サイクルにおけるコハク酸脱水素酵素系に圧作用がどの様に働いているかを検討しようと思い、NT 塩を用いてコハク酸酸化酵素の活性度に対する圧作用を観察した。その成績からコハク酸酸化系に相違が見られ、この部に高水圧が作用していることがわかった。次いで Thunberg 法によつて脱水素酵素活性の観点からも圧力効果を検討すると、この場合にもグルコース、焦性ブドウ酸では余り差異が存在せず、焦性ブドウ酸以後の酸化系に相違があることが認められ、コハク酸酸化系に圧力が作用していることがみとめられた。以上の事実は肝組織スライスを用いた場合にも類似の成績が得られたが、肝組織スライスは肝組織ホモジェネートに比べて、後者が  $100 \text{ kg/cm}^2$ 、 $500 \text{ kg/cm}^2$  でわずかに抑制されるのに対し、前者即ち、肝組織スライスではいずれの基質を加えても促進傾向を示し、 $300 \text{ kg/cm}^2$  で最高となり  $500 \text{ kg/cm}^2$  でも促進がみられ、促進傾向の著明なことが認められる。そして  $1000 \sim 1500 \text{ kg/cm}^2$  においても肝組織ホモジェネートより抑制度が小である。これは肝組織スライスが肝組織ホモジェネートに比し矢張り圧作用に対する抵抗が大なることを示している。又基質との代謝においては大した差異が認められず大体同じ傾向の成績を得た。以上のことから肝組織ホモジェネートはホモジェナイザーによる機械的操作によつてある程度形質膜がこわされ、これに圧力が作用するとある程度以上の圧力では徐々に崩壊へと進み、形質膜の透過性が高まり、ある一定度以上になると極度に膜の透過性の増加した状態となり、その結果代謝速度の減退、ひいては酸素消費の低下をきたすものと推考される。それに比して、肝組織スライスは intact cell であり、同じ圧力が加わつてもホモジェネートと異なり、よしんば細胞呼吸が圧によつて抑制を受けたとしても酵素系相互の扶助のもとに賦活作用をきたし抑制からの回復が速いものと考えられる。このことはコハク酸、グルコース、焦性ブドウ酸の三基質を用い酸素消費量を

除圧後長時間にわたつて観察した場合、肝組織のスライスの方がホモジェネートのときより圧作用からの回復がすみやかであるという成績からもうなずかれることであり、又 NT 塩還元反応の実験成績についても同様のことがいえる。しかしスライス、ホモジェネートいずれの場合においても、NT 塩還元反応の成績からコハク酸酸化酵素へ高水圧が作用することが確認された。

脱水素酵素に及ぼす圧力効果に関しては 1945 年 Stadie と Haugarrd<sup>23)</sup> がネズミの組織を用いて空気圧による実験をなしているが、それに依ると  $7 \text{ kg/cm}^2$ 、 $2 \sim 4$  時間加圧で irreversible に不活性化したとの報告や、Haugarrd<sup>24)</sup> は 1946 年高圧による S-Hgroup の酸化によるものとの報告がある。これらの報告は一見著者の成績と異なる如く見えるが、これは空気圧と水圧とは根本的に異なるものだからである。1950 年に Borrowman<sup>25)</sup> は  $60^\circ\text{C}$ 、5 分間熱処理した大腸菌の蟻酸脱水素酵素が  $700 \text{ kg/cm}^2$  迄の水圧では何らの変化をうけなかつたと報告している。その後 1956 年 Morita と ZoBell<sup>16)</sup> はあらかじめ加圧した大腸菌を用いてコハク酸脱水素酵素系に及ぼす水圧効果を研究しており、その結果  $600 \text{ kg/cm}^2$  で不活性化したと報告している。次いで 1957 年 Morita<sup>17)</sup> は加圧中においても  $600 \text{ kg/cm}^2$  (moderate high pressure) 位の加圧で不活性化し、その脱水素酵素活性が加圧下では  $800 \text{ kg/cm}^2$ 、 $1000 \text{ kg/cm}^2$  と水圧が増すと共に次第に減ずると述べている。肝細胞を用いての除圧後のコハク酸脱水素酵素作用を探った著者の Thunberg 法による実験においては、大腸菌より低い  $500 \text{ kg/cm}^2$  で抑制効果をうけているが、呼吸酵素作用における場合と同じく  $300 \text{ kg/cm}^2$  では促進効果を示し、 $500 \text{ kg/cm}^2$  以上では圧の大きさに比例して抑制されると認められる成績を得た。Morita の成績では  $200 \text{ kg/cm}^2$  加圧により促進効果がみとめられていないのに反し著者の  $300 \text{ kg/cm}^2$  加圧による促進効果については次の様に考えられる。Morita は加圧中の酵素作用について測定したものであるが、著者は一定時間加圧後除圧してその直後に測定したもので、従つて  $300 \text{ kg/cm}^2$  (relative low pressure) 位の水圧ではコハク酸脱水素酵素作用が加圧中は抑制され除圧後一過性に亢進される加圧の後作用(after effect)によるものと考えられる。これは安田<sup>27)</sup> が心筋の興奮性変化を加圧中、除圧後連続してしらべ  $300 \text{ kg/cm}^2$  位の加圧中興奮性が漸次低下し除圧後一時亢進するという成績か



らも十分考えられることである。

Inhibitor に対する圧効果については 1945 年 Johnson<sup>13)</sup> が発光菌の発光光度に及ぼすアルコールの抑制作用に及ぼす高水圧の影響を観察し、低濃度では加圧でアルコールに依る発光抑制が減じ濃い濃度でも、その抑制が高圧で解け、ある一定以上の高圧では他の反応への高圧作用によるのだろう、抑制作用の軽減がなくなると報告している。Johnson<sup>10)-13)</sup> は酵素作用に対する圧効果を蛋白の可逆性変性に導く Inhibitor との関係において研究し、Johnson's theory とでもいうべき見解をとっている。即ち Inhibitor が存在する時、平衡は変性の方向に動き変性した分子の若干が Inhibitor と結びつき、残りのものは結びつかない。然るに圧力が増加すると変性反応平衡が反対方向に進み、native form が多くなり、その結合した阻害物の若干が enzyme より離れる。蛋白変性を抑制する高圧は Inhibitor の作用を弱くして結局 enzyme activity をたかめるといつている。その後村上<sup>18)</sup> は Inhibitor と圧との相互関係を ATP-ase について検討し ATP-ase に p-chloromercuribenzenate を作用させると殆んど enzyme activity は消失するが、PCMB と等量の Cysteine を作用させると元の活性値を取り戻す。しかし最初から過剰の Cysteine を加えれば却つて activity は低下することを認め、“圧力は enzyme と Inhibitor との結合を離す方向へ作用する”という Johnson の考え方に当てはまらない場合もあることを指摘している。然るに肝組織を用いてコハク酸脱水素酵素に及ぼすマロン酸の阻害作用に対する圧力効果についての著者の実験においては、100~500 kg/cm<sup>2</sup> の加圧で平圧時に比べてマロン酸の阻害作用を抑制し、殊に 1.10<sup>-5</sup>M, 1.10<sup>-6</sup>M の低濃度においてそれが著明である。徐圧後時間と共に元に復し、1000~1500 kg/cm<sup>2</sup> の加圧では反対にマロン酸の阻害作用が促進される。マロン酸の阻害作用が

100~500 kg/cm<sup>2</sup> の加圧により抑制される理由としては次の様に考えられる。即ち Morita<sup>17)</sup> や河野<sup>15)</sup> によれば加圧中に enzyme activity の低下、あるいは組織の酸素消費量の減少がみられるが、加圧中にコハク酸脱水素酵素活性や酸素消費が低下して、除圧後元に復そうとしている状態で、Inhibitor であるマロン酸を作用させたのでマロン酸の阻害作用を抑制する圧効果が著明に表われたものであらう。

## V. 結 論

肝細胞の呼吸作用に及ぼす高水圧の影響、特に基質との関連性をみる目的で、1~1500 kg/cm<sup>2</sup>, 30分高水圧を肝組織ホモジェネート及びスライスに加え、次の如き結果を得た。

1) 肝細胞の酸素消費に対する圧力効果は、300 kg/cm<sup>2</sup> 迄は圧の増加と共に亢進し、それ以上では圧が高くなる程抑制する。

2) 各基質別酸化能に対する圧力効果に就いては、クエン酸、醋酸、グリセロ磷酸を基質として用いた場合 800 kg/cm<sup>2</sup> 以上の高圧でも促進を示し、グルコース、焦性ブドウ酸では阻害を示した。

3) TCA-サイクル上のもものではコハク酸を基質とせる場合、高圧は著明な阻害を示す。

4) NT 塩を用いてコハク酸脱水素酵素作用を検べると 300 kg/cm<sup>2</sup> で亢進し、それ以上の圧では、圧が高くなる程抑制される。

5) 各基質別脱水素酵素に対する圧力作用では、グルコース、焦性ブドウ酸、コハク酸を基質とした場合、300 kg/cm<sup>2</sup> で促進が見られた。

6) コハク酸脱水素酵素におけるマロン酸阻害作用に対する圧力効果は、マロン酸の阻害作用を減弱する。

終りに臨み、終始御懇篤なる御指導と御校閲を賜わつた恩師林香苗名誉教授、西田勇教授に、衷心より謝意を表します。併せて安田助教授並びに教室諸先生の御指導と御援助に深謝致します。

## 文

- 1) Benthous, J: Biochem. Z., 311, 108, 1941 ~42.
- 2) Borrowman, S. R: Kinetics of the formic dehydrogenase system. Doctorate Dissertation, University of Utah. 1950.
- 3) Büchner, E: Ber. deutsche Chem. Ges. 30, 117, 1897.
- 4) Büchner, H: Münch. med. Wschr. 44, 297,

## 献

- 1897.
- 5) Certes, A: C.R. Soc. Biol., 36, 220, 1884. C.R. Ac. Sci., 99, 385, 1884.
- 6) Chlopin, u. Tamman: Z. Hyg. Infek. Kht., 45, 171, 1903.
- 7) Fontaine, M: C.R. Ac. Sci., 188, 460~461, 662~663, 1929.
- 8) Haugaard, N: J. Biol. Chem., 164, 265,

- 1946.
- 9) 市橋大：岡医誌，69, 1, 129, 1954.
- 10) Johnson, F. H., ZoBell, C. E: J. Bact., 57, 179, 1949.
- 11) Johnson, F. H., ZoBell, C. E: J. Bact., 57, 352, 1949.
- 12) Johnson, F. H., ZoBell, C. E: J. Bact., 57, 359, 1949.
- 13) Johnson, Erying a. Polissar: The Kinetic Basis of Molecular Biolgy, Wiley, New York, 1954.
- 14) 川岡曉美：岡医誌，64, 5, 964, 1952.
- 15) 河野育夫：岡医誌，70, 12, 4535, 1958.
- 16) Morita, R. Y., ZoBell, C. E: J. Bact., 71, 668, 1956.
- 17) Morita, R. Y: J. Bact., 74, 251~255, 1957.
- 18) 村上哲英：細胞化学シンポジウム，8, 71~77, 1958.
- 19) 長尾曉一：岡医誌，67, 3~4, 679, 1955.
- 20) 小田琢三：細胞化学シンポジウム，8, 157~172, 1958.
- 21) 岡田勝喜：岡医誌，66, 5, 2095, 1954.
- 22) Regnard, P: C. R. Ac. Sci., 98, 745, 1884. (Ebbecke; P: Pflüger's Archiv 157, 79, 1914. より引用)
- 23) Stadies, W. C. Haugaard, N: J. Biol. Chem., 161, 153, 1945.
- 24) Umbreit, W. W: Manometric Techniques and Tissue Metabolism., 1949.
- 25) 大和人士：岡医誌，64, 5, 900, 1952.
- 26) 安田浩士：岡医誌，71, 10の2, 6761, 1959.
- 27) 安田浩士：岡医誌，71, 9の2, 5863, 1959.

## Effects of High Hydrostatic Pressure on Respiration of Liver Tissue

By

Hiroyosi Tokumoto

1 st. Dept. of Physiol. Okayama Univ. Med. School

(Director: Prof. K. Hayasi, M. D.)  
(Director: Prof. I. Nisida, M. D.)

The author studied the effects of high hydrostatic pressure on respiration of liver tissue of frog (*Rana nigromaculata*).

The results were obtained as follows.

1) After exposure to 300 kg/cm<sup>2</sup> the oxygen consumption of liver tissue were accelerated and inhibited by 400—1500 kg/cm<sup>2</sup> in proportion to the strength of applied pressure.

2) The oxygen consumption of liver tissue in the presence of citrate, acetate and glycerophosphate was accelerated at various hydrostatic pressures.

3) The oxygen consumption of liver tissue in the presence of succinate, glucose and pyruvate was inhibited at various hydrostatic pressure.

4) At relatively low pressure (300 kg/cm<sup>2</sup>), succinic dehydrogenase activity increased, but at moderate high pressure (500—800 kg/cm<sup>2</sup>) and very high pressure (1000—1500 kg/cm<sup>2</sup>), it was decreased.

5) The effects of high hydrostatic pressure on the inhibitor of succinic dehydrogenase activity was discussed.