

高圧に関する生理学的研究補遺—水溶液の pH に就て

そ の 2

Neutral red に依る植物細胞生体染色

岡山大学医学部生理学教室 (主任: 林教授)

講 師 岡 田 勝 喜

[昭和29年9月17日受稿]

I 緒 論

著者¹⁾は先に brilliant cresyl blue による植物細胞の生体染色によつて測定した水溶液 (酸性) の pH は、高圧の作用で大になる事実を報告したが、今回は殆んど同様にして、塩基性色素 neutral red による植物細胞の生体染色によつて、高圧の作用による水溶液 pH の変化を調べた。

II 実験材料及び方法

実験材料及び方法は (その1)²⁾と同様で、紫露草の裏面表皮細胞、タマネギの鱗片内側表皮細胞、アオミドロ等植物細胞を neutral red (以下 N. R. と略記する) 水溶液に浸した儘加圧し³⁾、一方対照としてそれと同じ溶液に同じ時間、植物細胞を浸して置き、斯様にして得た加圧細胞 (以下 P と略記) と対照細胞 (以下 K と略記) とを同時に顕微鏡下に観察し、細胞膜、液胞等の染色状態その他を比較する。染色の濃淡その他の比較は程度に応じて +, - の記号で表した。

neutral red の変色域は pH 6.6~8.0 の間で赤から黄になる。

III 実験成績

A. 紫露草の裏面表皮細胞に就て

1. pH の異なる二つの N. R. 水溶液の比較

水道水及び蒸溜水の pH は、水素イオン濃度測定用東洋濾紙で測ると、夫々 6.6~6.8 及び 5.8~6.2 である。斯る pH の異なる二つの N. R. 水溶液は色調が相違し、勿論酸は赤、

塩基性に近い方は橙である。故に斯様な二液で細胞を染色すると、染色細胞の色調も違う事もあるが、生体染色では多くの場合区別し難い。斯る二液で細胞を染色して比較すると (第1表)、細胞膜は蒸溜水側が強く、液胞は水道水側が強く染る。又色素によつて生ずる細胞内の顆粒 (滴状染色) は水道水側が強い。

第1表 紫露草 水道水と蒸溜水との比較

時間 (分)	細胞膜		液 胞		顆 粒	
	水道水	蒸溜水	水道水	蒸溜水	水道水	蒸溜水
10	+	+	++	+	++	+
20	+	++	++	+	++	+
25	+	++	+	+	+++	+
30	+	++	++	+	++	+
80	+	++	++	+		

2. N. R. 蒸溜水溶液の加圧

細胞を 0.01% N. R. 蒸溜水溶液に入れて、500~1500 気圧、10~20 分間加圧し、対照と比較した (第2表)。

細胞膜、液胞共 K の方がよく染り、顆粒は

第2表 紫露草 N. R. 蒸溜水溶液加圧

圧 力 (気圧)	時間 (分)	細胞膜		液 胞		顆 粒	
		加圧 (P)	対照 (K)	加圧 (P)	対照 (K)	加圧 (P)	対照 (K)
1500	10	+	+	+	+(++)	+	±
1000	20	++	+++	+	++	++	+
1000	15	+	++	+	++	+++	+
1000	10	±	+	±	+		
1000	10	+	++	+	++	±	±
500	20	+	+(++)	+	++		
500	20	+	+(++)	-	+	±	±
500	10	++	++	+(++)	+	+	-

Pの方が多い。

B. タマネギ鱗片の内皮細胞に就て

1. pH の異なる二つの N. R. 水溶液の比較
0.01% N. R. の水道水溶液と蒸溜水溶液とを A. 1 と同様にして比較した (第 3 表)。即ち細胞膜は酸性の強い方 (蒸溜水) が濃く、液胞は塩基性に近い方 (水道水) が濃く染る。又トノプラスト分離 (以下 T 分離と略記) は水道水が強く起る。

第 3 表 タマネギ 水道水と蒸溜水との比較

時間 (分)	細胞膜		液胞		トノプラス ト分離	
	水道水	蒸溜水	水道水	蒸溜水	水道水	蒸溜水
10	+	+	+	+	+	±
20	+	+	+	-	+	+
30	+	+	+	±	+	+
40	+	+	+	-	+	±

同様に N. R. の水道水溶液と塩基性溶液 (pH 7.6~7.8) とを比較すると (第 4 表 A), 液胞で塩基性液側が少し濃く染る他、余り差がない。又 N. R. の水道水溶液と pH 8.0~8.8 の塩基性水溶液を比較すると (第 4 表 B), 細胞膜では差がないが、液胞は塩基性水溶液側が強く染り、T 分離も同じ側が稍強い。

第 4 表 A. タマネギ 水道水と塩基性液 (pH 7.6~7.8) との比較

時間 (分)	細胞膜		液胞		トノプラス ト分離	
	塩基性液	水道水	塩基性液	水道水	塩基性液	水道水
10	+	+	+	+	+	+
10	+	+	+	+	+	+
20	+	+	+	+	+	+
20	+	+	+	+	+	+
30	+	+	+	+	++(++)	+

第 4 表 B. タマネギ 水道水と塩基性液 (pH 8.2~8.8) との比較

時間 (分)	細胞膜		液胞		トノプラス ト分離	
	塩基性液	水道水	塩基性液	水道水	塩基性液	水道水
10	±	±	+	±	+(++)	+
20	+	+	+	+	+	+

2. N. R. 蒸溜水溶液の加圧

細胞を 0.01% N. R. 蒸溜水溶液に浸した儘

200~1500 気圧、10~30 分間加圧して対照と比較した (第 5 表 A)。即ち細胞膜は K が稍強く染り、液胞は 1000 気圧以上で P, K に殆んど差がないが、500 気圧以下では P が強く染る。T 分離も 500 気圧以下で P が強い。

第 5 表 A. タマネギ N. R. 蒸溜水溶液加圧

圧力 (気圧)	時間 (分)	細胞膜		液胞		トノプラス ト分離	
		加圧 (P)	対照 (K)	加圧 (P)	対照 (K)	加圧 (P)	対照 (K)
1500	10	+	+	+	+	±	+
1000	20	+	+	+	+	++	++
1000	10	+	+(++)	+	±(+)	++	+
500	30	+	+	+	+(++)	+	++
500	20	+	+(±)	+(++)	+	+(++)	++
500	10	+	+	+	±	++	+
200	30	+	++	+(++)	+	++	+
200	10	+	+	+(++)	±	++	±

加圧細胞をポンベから出して後、対照の細胞と同じ条件下に置き、10 分及び 20 分後両者を比較すると (後遺作用) (第 5 表 B), 細胞膜は K の方が濃く染り、液胞は 500~1000 気圧以下で P が濃く染る。T 分離は P が強い。

第 5 表 B. タマネギ 後遺作用

圧力 (気圧)	時間 (分)	細胞膜		液胞		トノプラス ト分離		
		加圧 (P)	対照 (K)	加圧 (P)	対照 (K)	加圧 (P)	対照 (K)	
1000 分 後	20	+	+	+	+	++	+	
	10	+	+(++)	+	+	+(++)	±	
	500	30	+	+	++	++	+	++
	500	20	+	+(++)	++	+	++	+(++)
	500	10	+	+(++)	+	±	++	+
	200	30	+	+(++)	+	±	+	±
200	10	+	+	+(++)	+	++	+	
500 分 後	1000	20	+	+(++)	+	+	++	+
	1000	10	+	+(++)	+	±	++	+
	500	30	++	++	++	+	+	+
	500	20	++	++(++)	++	±(+)	++	+
	500	10	+	+(++)	+	±(+)	++	+
	200	30	+	+(++)	+	±	++	+
200	10	+	+	+(++)	+	++	++	

3. N. R. 水道水溶液の加圧

0.01% N. R. 水道水溶液に細胞を浸した儘、

500~1500 気圧, 10~30 分間加圧し, 対照と比較した(第6表A). 即ち細胞膜はP, Kに差がないが, 液胞は500 気圧, 30分以上の加圧でKが稍強く染り, T分離は1000気圧以上でKが, 500 気圧以下でPが強い.

第6表A. タマネギ N. R. 水道水溶液加圧

圧力 (気圧)	時間 (分)	細胞膜		液胞		トノプラス ト分離	
		加圧 (P)	対照 (K)	加圧 (P)	対照 (K)	加圧 (P)	対照 (K)
1500	10	+	+	+	+	-	+
1000	20	+	+	+	+	+	+
1000	10	+	+	+	+(+)	+	+
500	30	+	+	+	+(+)	+(+)	+
500	20	+	+	+	+	+(+)	+
500	10	+	+	+	+	+	+

上記2.の場合と同様, 加圧後10及び20分経過して両者を比較すると(第6表B), 細

第6表B. タマネギ 後遺作用

圧力 (気圧)	時間 (分)	細胞膜		液胞		トノプラス ト分離	
		加圧 (P)	対照 (K)	加圧 (P)	対照 (K)	加圧 (P)	対照 (K)
10分 後	1500 10	+(+)	+	-	+	-	+
	1000 20	+	+	+	+	+	+(+)
	1000 10	+	+	+	+	+	+
	500 30	+	+	+	+	+	+
	500 20	+	+	+(+)	+	+	+
500 10	+	+	+	+	+	+	
20分 後	1000 20	+	+	+	+	+	+
	1000 10	+	+	+(+)	+	+	+
	500 30	+	+	+	+(+)	+	+
	500 20	+	+	+	+	+	+
	500 10	±	±	+(+)	+	+	+

第8表A. タマネギ 死後染色水道水と蒸溜水の比較

	時間 (分)	細胞膜		液胞		核		色調			
		水道水	蒸溜水	水道水	蒸溜水	水道水	蒸溜水	水道水	蒸溜水	水道水	蒸溜水
1%K.C.N.	10	±	±	+	+	±(+)	+				
	20	+	+	+	+(+)	±(+)	±(+)	稍	橙	稍	赤
	30	+	+	+	+	±	±	稍	橙	稍	赤
	40	+	+	+	+	+	+	稍	橙	稍	赤
熱湯	10	±(+)	±(+)	-	-	+	+				
	20	+	+	±(+)	±(+)	+	+	稍	橙	稍	赤
	30	+	+	+	+	+	+		橙		赤
	40	+	+	+	+	+	+		黄		赤

胞膜では差がないが, 液胞は1000気圧20分以上の加圧ではKが, 1000気圧, 10分以下ではPが濃く染る. 又T分離は, 1000気圧, 20分以上の加圧でKが強い.

4. N. R. 塩基性水溶液の加圧

細胞を N. R. 塩基性水溶液 (pH 8.2~8.8) に入れて 200~1000 気圧, 10~30分間加圧し, 対照の細胞と比較した(第7表). 細胞膜では両者の差がないが, 液胞は500 気圧以上でKが, 200 気圧ではPが濃く染る. T分離は1000 気圧でKが, 200 気圧ではPが強い.

第7表 タマネギ N. R. 塩基性水溶液 (pH 8.2~8.8) の加圧

圧力 (気圧)	時間 (分)	細胞膜		液胞		トノプラス ト分離	
		加圧 (P)	対照 (K)	加圧 (P)	対照 (K)	加圧 (P)	対照 (K)
1000	10	±	±	±	+	±	+
1000	10	±	±	+	+	+	+(+)
500	30	+	+	+(+)	+		
500	20	±	±	+	+		
500	10	±	±	+	+(+)	+	+
200	30	+	+	±(+)	±	+(+)	+
200	10	+	+	+(+)	±	+	±

5. 細胞の死後染色

上記実験条件下, P, Kは共に3%食塩水で原形質分離が起る. 即ち細胞は生きて居る. 今度は1% KCN 水溶液又は熱湯で処理して死滅させた細胞(3%食塩水で分離しない)で同様な実験を行つた. 斯る細胞を0.01% N. R. の水道水溶液と蒸溜水溶液とに浸して比較すると(第8表A), 染色の色調は水道

水が橙、蒸留水が赤で、かなり明確に区別出来る。此の色調の相違の為、染色の濃淡は比較し難いが、概してその濃淡には差が認められない。死滅細胞を0.01% N. R. 蒸留水溶液に浸して200~1500気圧、10~30分間加圧し、

対照と比較すると(第8表B)、染色の濃度には殆んど差がないが、色調はPが橙、Kが赤の傾向がある。但し其の差は必ずしも明確ではない。

第8表 B. タマネギ 死後染色 N. R. 蒸留水溶液の加圧

	圧 力 (気圧)	時 間 (分)	細 胞 膜		液 胞		核		色 調	
			加圧(P)	対照(K)	加圧(P)	対照(K)	加圧(P)	対照(K)	加圧(P)	対照(K)
1%K.C.N.	2000	10	+	+	+	+	±	±		
	1500	20	++	++	+	+(++)	+	+		
	1000	10	+	+	+	+	+	+		
	500	20	++	++	+(++)	+	+	+		
	200	15	++	++	+	+(++)	+	+	稍 橙	稍 赤
熱	1500	25	++	++	+	++	+	++	稍 橙	稍 赤
	1000	20	+	+	+	+	+	+	稍 橙	稍 赤
	1000	10	±	±	+	+				
寒	500	30	++	++	+	+(++)	++	++	稍 橙	稍 赤
	500	10	++	+(++)	+	+	+	+		
	200	30	++	++	+	+	++	++	稍 橙	稍 赤

C. アオミドロに就て

1. pHの異なる二つのN. R. 水溶液の比較

アオミドロを0.001% N. R. の蒸留水溶液と水道水溶液とに10~20分間浸して比較すると(第9表)、細胞膜は蒸留水側が濃く、液胞は水道水側が稍濃く染る。

第9表 アオミドロ 水道水と蒸留水との比較

時 間 (分)	細 胞 膜		液 胞	
	水道水	蒸留水	水道水	蒸留水
10	±	+	+	+
10	±	+	+	+(++)
20	±	+	+(++)	+
20	±	+	+(++)	+

2. N. R. 蒸留水溶液の加圧

アオミドロを0.001% N. R. 蒸留水溶液に浸した儘500~1500気圧、10~20分間加圧して対照と比較した(第10表)。

細胞膜では両者の差が殆んどないが、液胞はKが強く染る。特に1000気圧以上で著しい。

第10表 アオミドロ N. R. 蒸留水溶液の加圧

圧 力 (気圧)	時 間 (分)	細 胞 膜		液 胞	
		加圧(P)	対照(K)	加圧(P)	対照(K)
1500	10	+	+	±	+
1500	10	++	++	±	++
1000	20	++	++	+	++
1000	10	+	+	±	+(++)
1000	10	+	+	±	+
500	10	+	+	±(+)	+
500	10	++	++	+	+(++)

IV 考察並に総括

塩基性色素で植物細胞の生体染色を行う時、その色素溶液が酸性の時は細胞膜が、中性又は塩基性の時は液胞が染る⁽⁶⁾⁽⁸⁾。故に斯る色素溶液に植物細胞を浸した儘加圧すると、そのpHが高圧の作用で変化するなら、それに応じて植物細胞の細胞膜或は液胞の染色状態が違つて来る筈である。斯る方法で調べた結果(その1)⁽⁹⁾では、brilliant cresyl blue(塩基性色素)水溶液は高圧の作用により塩基性

に傾く事が明になった。

以下(その1)と同様にして行つた neutral red による本実験の成績を検討して見よう。先づ N. R. の蒸溜水溶液と水道水溶液とを比較すると、普通前者は酸性、後者は中性に近い。紫露草(第1表)、タマネギ(第3表)、アオミドロ(第9表)等凡て公式通り細胞膜は蒸溜水側、液胞は水道水側が強く染る。斯る方法でも二つの液体の pH の大小を比較する事は出来る。但し溶液が中性附近では、細胞膜が染色し難いので、細胞膜による二液の比較は困難になる(第4表, A, B)。尚色素による細胞内顆粒の発生(滴状染色)(紫露草)及びトノプラスト分離(タマネギ)は何れも水道水側が強い。併しその差が溶液 pH の相違に基づくか否かは明でない。

次に N. R. 蒸溜水溶液に加圧した成績を見ると、紫露草(第2表)、タマネギ(第5表)の場合、細胞膜では P は K に比し染色が弱く、液胞では圧作用が大きいと(500 気圧, 20 分以上) P は K に比し染色が弱いが、500 気圧, 10 分以下では P の方が稍強い。此の染色状態から見ると、高圧による水溶液 pH の変化の方向は決定出来ないが、次のように考えれば理解し易い。即ち液胞に比し細胞膜は生命的要素の少い組織であるから、高圧の二次的影響が小さいであろう。之に対し高圧による液胞の染色変化は、細胞自体が強く変化して表われた像であろう。液胞の加圧(500 気圧, 10 分以下)で、それが塩基性に傾く(P が K に比し強く染る)のは、此の程度の圧力では細胞自体の変化に基く影響が弱く、水溶液に対する加圧の直接作用—塩基性方向転換のみが表面に出たものであろう。アオミドロの場合(第10表)、細胞膜は P, K に殆んど差がなく、液胞は何れも P 側が染色し難い。之はアオミドロの細胞膜の染色状態がその厚さの微少なる為観察し難い事及び細胞自身が紫露草等に比し繊弱な為であろう。尚紫露草の顆粒発生及びタマネギのトノプラスト分離は、斯る現象の強弱が pH の差に基くとすれば、矢張り圧力の作用で溶液の pH は塩基性

に傾く事になる。但し此の現象は著者⁷⁾の研究から推察すると、一部は高圧による膜透過性の亢進によると思われるが、実験 A. 1 及び B. 1 を見ても一部は pH その他の相違に原因があろう。又 N. R. 蒸溜水溶液の加圧後遺作用を見ると(第5表 B)、細胞膜及び液胞染色(500 気圧, 20 分以下)又トノプラスト分離は何れも P 側が強度である。之を加圧直後の観察成績に比べると、P, K の差が液胞で大である(細胞膜は同程度である)。之は細胞膜が比較的物理化学的反応に近いものを現わすのに、液胞は生命的な複雑な現象を表現する事によるのであろう。

次に N. R. の水道水或は塩基性水溶液の加圧成績を見ると(第6表 A, 第7表)、細胞膜染色は P, K に殆んど差がなく、液胞染色は 500 気圧以上で P 側が弱く、以下では逆に P 側が強い。トノプラスト分離も液胞と略同様である。之等は前述のように水溶液が一層塩基性に傾いた事を示すと考えられる。尚 N. R. 水道水溶液の加圧後遺作用も(第6表 B)、上述の蒸溜水の場合(第5表 B)と同様に解釈される。

更に細胞の死後染色は色素が単に細胞内に拡散する事により起るのであるから、第8表 A のように細胞の染色濃度には差がない。併し色調は pH の相違により赤(酸性)、橙(塩基性)の差が認められる。死滅細胞に加圧しても(第8表 B) P, K に染色濃度の差がない事は上記理由で当然と思われるが、第8表 A 程色調の差が P, K 間に認められないのは、その変化が蒸溜水と水道水の差程もないのによるのか、或は除圧して(その瞬間高圧により変化した pH は復元すると考えられる⁴⁾)顕微鏡下に観察する迄に要する時間(5分内外)で色調の差がなくなるによるのか明らかでない。

以上のように考えると pH 5~9 位の N. R. 水溶液は圧作用で、pH は増加の方向へ移動すると思われる。著者⁴⁾の研究によると弱電解質は強電解質に比し、高圧の作用で解離度の増大が著しい。従つて塩基性色素 N. R. は

高压の作用で OH イオンを多量に遊離し (ROH → R⁺ + OH⁻), 而も多くの場合大気圧下, 水溶液が酸性を示す原因となる少量の強電解質の高压による H イオンの増加を上まわると推測されるので, 高压により N. R. 水溶液の pH は増大の方向へ移動すると理解される。故に高压による水溶液 pH の変化に対しては, 大気圧下の其の水溶液 pH よりも, 圧作用で解離すべき H 或は OH イオンの多寡が問題となる。而も弱電解質は強電解質に比し, 高压の作用で遙かに強く解離度を増すから, 一般的に見れば水溶液の pH の高压による変化は, 其の溶液中に含まれる弱電解質の量と質とにより決定されるであろう。

V 結 論

neutral red (塩基性色素) による植物細胞

の生体染色を利用して高压による水溶液 pH の変化を調べ次の結果を得た。

1. 細胞膜を指標とすると neutral red 水溶液の pH は高压により塩基性に傾く。
2. 液胞を指標とすると neutral red 水溶液の pH は圧作用が強いと酸性に傾き, 圧作用が弱いと塩基性に傾く。併し液胞は高压による影響が大きいから, 圧作用の強い時の液胞の染色変化は一次的 pH 変化の指標にならない。
3. 即ち neutral red 水溶液の pH は高压の作用で塩基性に傾く。
4. 一般に水溶液の pH の高压による変化は, 高压により解離すべき H 或は OH イオンの量により決定される。

摺筆するに当り終始御懇篤なる御指導と御校閲を賜つた恩師林教授に対し深く感謝の意を表す。

文 献

- 1) Ebbecke U. . pflüger Arch. 157 (1914) 79.
- 2) 大和 岡医誌. 64巻, 5号 (1952) 881.
- 3) 丹原: 岡医誌. 64巻, 5号 (1952) 955.
- 4) 著者: 本誌 (第四編).
- 5) 著者 本誌 (その一).
- 6) 相見: 細胞生理学研究法. 164.
- 7) 著者: 本誌. 第五編.
- 8) 北大植物生理学教室: 植物生理学実習. 32.

Department of 1 Physiology, Okayama University Medical School.
(Director Prof. Dr. K. Hayasi)

Physiological Studies of Hydrostatic High Pressure. Supplement II. On pH Found in a Neutral red Solution

By

Katuki Okada

In case any living staining of plant cell (*Tradescantia*, *Allium cepa*, *Spirogyra*) should be observed as pH-indicator, the pH of neutral red solution increases, owing to high pressure.
