

する、ロ) 6% 蔗糖溶液 ハ) 6~7% Alcohol-R 液 =) 10~25 K-R 液 ホ) 0.3% Chloreton-R 液に夫々浸漬すると、可逆的に電気刺戟に反応しない状態となる。此の様な状態となつた筋肉に就て次の様な実験成績を得た。

1. 縫工筋では電気刺戟に反応しなくなるより前既に叩打刺戟に反応しなくなつた。

2. 電気刺戟に反応しなくなつた縫工筋及び腓腹筋は尙圧及び Chloroform ガスには反応する。

3. 可逆的に電気刺戟に反応しなくなつた時の腓腹筋の圧閾値は正常時(300 気圧前後)に比べると

a. 湿室に保存した場合：—140 気圧閾値が上昇した。尙此の場合に限り閾下圧の下で電気刺戟に反応した。

b. 蔗糖溶液に浸した場合：—圧閾値の変動は見られなかつた。

c. Alcohol-R 液に浸した場合：—120 気圧低下が見られた。

d. 濃厚 K-R 液に浸した場合：—100 気圧上昇した。

e. Chloreton-R 液に浸した場合：—180 気圧の上昇を示した。

擲筆するに当り終始御懇篤な御指導と御校閲を賜つた恩師林教授に衷心から謝意を表す。

## 文 献

- 1) Cattell, McK. and D. J. Edwards, Am. J. Physiol., **86**, 371, 1928.
- 2) Ebbecke, U., Pflügers Arch., **157**, 79, 1914.
- 3) Ebbecke, U. und O. Hasenbling, Ibid., **236**, 405, 1935.
- 4) Ebbecke, U., Ibid., **236**, 662, 1935.
- 5) 橋田邦彦：医学中央雑誌, **36**, 735, 1932.
- 6) Horton, H. V., J. Physiol., **70**, 380, 1930.
- 7) 小西眞尙：岡医誌, **48**年, 132, 1936.
- 8) Lorente de Nó, A study of nerve Physiology, New York, 1947. (Fulton's Textbook of Physiol. 16 ed. p. 20 より).
- 9) Overton, E., Pflügers Arch., **92**, 346, 1901.
- 10) 高橋忠幸：日生理誌, **4**, 183, 1939.
- 11) 丹原英昌：本誌, 第1編.
- 12) Ibid., 第2編.
- 13) Ibid., 第4編.

## 高 壓 の 酵 素 作 用 に 及 ぼ す 影 響

岡山大学医学部生理学教室 (主任 林 香苗教授)

助 手 丹 原 英 昌

[昭和 27 年 4 月 15 日受稿]

### I 緒 言

下等な動物から細菌に至る迄の種々の動物に及ぼす高圧の作用に就ては或程度の研究がなされている。

大谷<sup>5)</sup>は 7~15 気圧の下でタカヂアスターゼの作用が抑制される事を見て居る。又 Basset と Macheboeuf<sup>1)</sup>は非常に高い圧を用ひて酵素と細菌毒素に及ぼす作用を調べた結果、

此の両者は非常によく似て居り 8000 気圧以下ではその作用は影響されず。圧が高くなればなる程又時間が長ければ長い程その作用は弱減し、12000 気圧以上に長く保つて居ると全くその作用を失ふと述べ居る。1940 年 Matthews<sup>4)</sup>等は Pepsin 並に rennin の作用が約 2000 気圧以上の範囲で圧力の高さと共に酵素作用減弱し、その減弱度は圧力の作用時間と共に強くなり、作用の原因の一は酵素の

denaturation に基くのであろうとしている。然し Basset 及び Matthews の実験は勿論被検酵素を加圧後取出して、その作用を調べたものの様である。

我々の教室に於ても 2000 気圧迄の圧を得る機械が出来た。Basset<sup>2)</sup> の用いた、機械のボムベは容積が甚だ小さいが、本教室のものは容積約 30c.c.、それに比べると余程大なるものである故、比較的多量の液を加圧する事が出来るので酵素作用が加圧中に如何なる影響を受けるかを知る為には本実験を行った。

## I 実験材料及び方法

酵素として粉末タカヂアスターゼ（三共製薬）を、基質には可溶性澱粉を用ひ、化学天秤で秤量し、溶液は毎日新調して使用した。

2 回分として作製した酵素基質溶液は次の如くである。可溶性澱粉 0.8g を蒸溜水 40c.c. に混じて煮沸し冷却して室温とする。ヂアスターゼ 0.1g は蒸溜水 10c.c. に溶解する。先づ澱粉溶液 15c.c. をビーカーに取り、それに N/10 塩酸又は N/10~N/100 苛性ソーダ若しくは緩衝液の適当な量と蒸溜水とを加へて 27c.c. となる様にし、ヂアスターゼ溶液 3c.c. を加へて速やかに混合して実験に供した。此の混合液中の濃度はヂアスターゼが 1%、澱粉は大体 1% である。

予め適当に塩酸又は苛性ソーダ液を加へた酵素基質の全混合液の pH を測定して、之等の液の量と全混合液の pH との関係をグラフに画いておき、その曲線から求める pH の混液を作るのに必要な塩酸又は苛性ソーダ液の量を知る様にした。

pH の測定には島津製作所製のアンチモン電極を用ひて電位差を測定し、電位差 -pH 曲線から pH を求めた。

実験順序を述べると、30c.c. の混合液のうち少量は pH 測定用に残しておき、残りの全部を小試験管に 2 分しその一方を加圧実験に、他方を対照実験とした（条件を同じくする為に上部にモビル油を重疊した）。一定時間経過後圧を去つて両試験管は氷冷した水につけ

て冷し、上部の油をよく拭き取つて定量に供した。

定量は Bertrand<sup>3)</sup> の氏糖定量法を簡便にした方法を用ひた。先づ内容 100c.c. の三角コルベンに鹵性酒石酸カリ溶液、被検液 5c.c.、硫酸銅溶液を入れて 3 分間弱く煮沸しよく振つて亜酸化銅の沈澱がガラス壁に附着しない様にし、コルベンを斜めに立て、放置する。亜酸化銅が完全に底に沈澱してから上清液を吸引し、蒸溜水を加へて沈澱を洗つて又斜めに静置する。3 回清浄後上清液を取り去つて残つた沈澱に原法の如く酸性鉄液を加へて溶解せしめ、過マンガン酸カリ液で滴定する。同一被検材料に就ては各 2 回定量を行つて平均して正確を期した。本実験に於ては生じた糖の絶対量は必要ではないので、以下に示した値は糖量に換算せず滴定に要した過マンガン酸カリ溶液の量 (cc) を以て澱粉分解の度を示す事とする。ボンベを一定の温度に保つ事が出来ないので加圧実験は総て室温で行つた。

## II 実験成績

### A 予備実験

先づ pH が異つた場合にヂアスターゼに依る澱粉分解作用が如何に変わるかを調べる為に、25° の下で 1 時間作用せしめて生成した糖量を測定した。pH の調節は HCl 及び NaOH を以てし、モビル油で空気と遮断した。その成績は第 1 図に於て実線で示したものである。此の曲線から使用したヂアスターゼの至適 pH は大体 4.8 であり、此の至適 pH の前後 (pH 4.0~6.0) では pH の少々の差異に因つては酵素作用は大して変化しない事、之に反して pH 2.0~3.0 の辺りでは pH の少々の差異で酵素作用が大いに影響される事が知られる。

### B 加圧実験

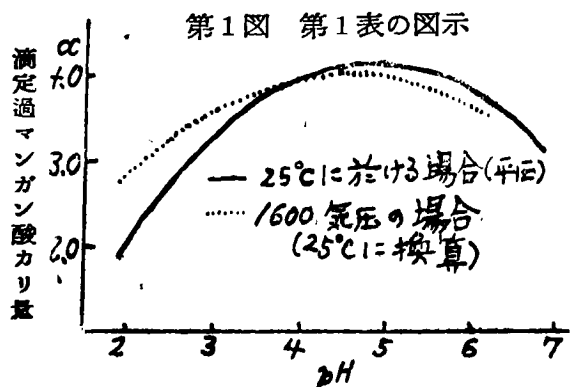
#### 1 塩酸を加へて酸性とした場合

加へる塩酸の量を加減して酵素基質混合液の pH を 1.9 から 6.3 迄の種々の液を作り、

1600 気圧の下で1時間澱粉分解を行はしめた。その成績は第1表に对照実験と並べて示した。同一実験に於て圧を加へたものと对照との間の関係は、pH 2.0 前後では圧を加へた方が对照に比して分解量の増加が著しいが、pH 3.4 ではその差が甚だ少なく、pH 5.1 から6.3 迄では反対に对照実験の方が多い成績を得た。各実験は行つた時の室温が異つて居

第1表 塩酸を加へて酸性とせるもの

| 1600 気圧 の 場 合 |       |                            |      |           |      |
|---------------|-------|----------------------------|------|-----------|------|
| pH            | 室 温   | 滴定 KMnO <sub>4</sub> 量(cc) |      | 25° に 換 算 |      |
|               |       | 加 圧                        | 対 照  | 加 圧       | 対 照  |
| 1.9           | 22.5° | 2.22                       | 1.55 | 2.71      | 1.88 |
|               | 22.3° | 2.21                       | 1.50 | 2.78      |      |
|               | 22.5° | 2.29                       | 1.56 | 2.77      |      |
|               | 23°   | 2.36                       | 1.64 | 2.72      |      |
|               | 24°   | 2.62                       | 1.84 | 2.69      |      |
| 2.2           | 16.5° | 2.61                       | 2.02 | 3.02      | 2.35 |
| 2.4           | 17°   | 3.02                       | 2.46 | 3.22      | 2.63 |
| 3.0           | 19.6° | 3.41                       | 3.26 | 3.45      | 3.30 |
| 3.4           | 19.5° | 3.62                       | 3.51 | 3.73      | 3.62 |
|               | 21.5° | 3.61                       | 3.48 | 3.76      |      |
| 3.8           | 21°   | 3.67                       | 3.66 | 3.88      | 3.87 |
| 5.1           | 24°   | 3.92                       | 4.02 | 3.97      | 4.07 |
|               | 24.5° | 3.93                       | 4.02 | 3.96      |      |
| 5.5           | 19°   | 3.64                       | 3.78 | 3.86      | 4.02 |
| 6.3           | 24°   | 3.52                       | 3.67 | 3.52      | 3.67 |
|               | 24.5  | 3.58                       | 3.76 | 3.48      |      |
| 500 気圧 の 場 合  |       |                            |      |           |      |
| 1.9           | 22.7° | 1.78                       | 1.67 | 2.10      | 1.88 |
|               | 21.5° | 1.59                       | 1.46 | 2.08      |      |



るので同一曲線を以て表はす事は出来ない。对照実験で得た値は pH が等しければ 25° では予備実験で得た値と等しくなり、且つ加圧実験値も亦 25° では此の对照の実験値の温度換算率に比例して増減するものと仮定して 25° に換算し(第1表)、その値につき第1図に点数を描いた。此の曲線は上記の成績の関係を明瞭に示している。

圧の効果が最も著明であつた pH 1.9 の場合に就て 500 気圧の作用をも調べ第1表の下部にその2例を記した。1600 気圧の場合に比べると圧の影響は少ないけれども、やはり对照に比べると圧により澱粉分解量の増加が認められる。

2 苛性ソーダを加へてアルカリ性とした場合

pH 7.0 を越えると澱粉分解量が急に減少する事及び室温が低下した事等の為に、多くの実験を行つたにかゝらず圧作用の効果は明瞭でなかつた。そこで pH 8.5 で実験を行ふに当り長時間酵素を作用せしめて分解量を多からしめる為、夕刻に 1600 気圧を加へた儘翌朝迄放置した。圧はその間自然に低下したが 1500 気圧以下とはならなかつた。对照実験は同時刻ボンベ外で施したことは言ふ迄もない。第2表の3例がその成績であるが、温度の項には実験を始めた時の室温を記した。3例共に生成糖量は僅少であつたが、何れも加圧値は对照に比して約 20 % の増加が見られた。

第2表 苛性ソーダを以て pH 8.5 とせるもの (1600 気圧)

| 温度  | 作用時間 (時間) | 滴定 KMnO <sub>4</sub> 量 (cc) |      | 加 圧 / 対 照 |
|-----|-----------|-----------------------------|------|-----------|
|     |           | 加 圧                         | 対 照  |           |
| 12° | 16        | 0.71                        | 0.59 | 1.2       |
| 13° | 17        | 0.84                        | 0.69 | 1.2       |
| 12° | 17        | 0.67                        | 0.58 | 1.2       |

3 緩衝液を用ひた場合

醋酸及び醋酸ソーダから成る pH 4.8 の緩衝液を用ひた。混合液の組成は酵素液 3c.c.

基質溶液 15c.c. 緩衝液 12c.c. で酵素の作用時間は 1 時間である。

a. 1600 気圧の場合

第 3 表の如く 5 例共に加圧値は平圧に於ける対照値に比し減少している。之等の差異は

第 3 表 緩衝液を以て pH 4.8 とせるもの (1600 気圧)

| 室 温   | 滴定 KMnO <sub>4</sub> 量 (cc) |      | 加 圧 / 対 照 |
|-------|-----------------------------|------|-----------|
|       | 加 圧                         | 対 照  |           |
| 25.5° | 4.66                        | 4.78 | 0.97      |
| 26.5° | 4.66                        | 4.76 | 0.98      |
| 27.2° | 4.63                        | 4.80 | 0.97      |
| 28.4° | 4.64                        | 4.83 | 0.96      |
| 27°   | 4.59                        | 4.76 | 0.96      |
| 平 均   |                             |      | 0.97      |

推計学的に検定すると 1% 以下の危険率を以て有意の差であると認められる。

b. 400 及び 150 気圧の場合

比較的低い圧として 400 及び 150 気圧を用ひて実験を行ひ第 4 表の A, B にその成績を記した。両気圧の場合共に加圧値と対照の間に有意の差は認められなかつた。

第 4 表 緩衝液を以て pH 4.8 とせるもの

| 室 温         | 滴定 KMnO <sub>4</sub> 量 (cc) |      |
|-------------|-----------------------------|------|
|             | 加 圧                         | 対 照  |
| A 400 気圧の場合 |                             |      |
| 27°         | 4.85                        | 4.85 |
| 25.5°       | 4.72                        | 4.70 |
| 25°         | 4.58                        | 4.60 |
| 25°         | 4.62                        | 4.60 |
| 23°         | 4.36                        | 4.38 |
| 22°         | 4.37                        | 4.33 |
| B 150 気圧の場合 |                             |      |
| 26.5°       | 4.67                        | 4.66 |
| 25°         | 4.47                        | 4.46 |
| 24.2°       | 4.43                        | 4.44 |
| 23°         | 4.34                        | 4.32 |
| 23.8°       | 4.42                        | 4.40 |
| 23.5°       | 4.40                        | 4.43 |

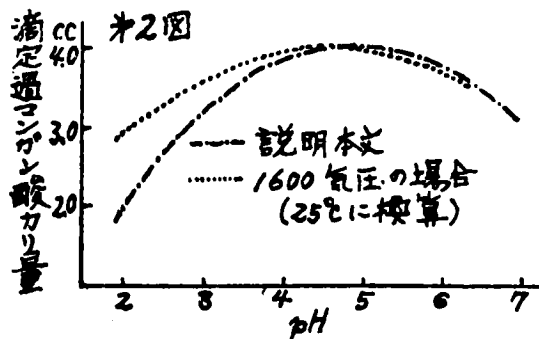
VI 考 察

塩酸を以て酸性とし 1600 気圧を加へ pH の広い範囲に亘つて酵素作用を調べた実験成績である第 1 図の点線で描いた曲線と、対照実験の実線とを比較して先づ気付く事は、1) 加圧実験の曲線の山の頂が対照実験のそれより低い事。2) 曲線の形が可成り相違する事である。

点線の曲線の最頂が実線の曲線のよりも低い事は 1600 気圧の作用に由つて酵素作用が抑制された事を示すものである。当教室の大和<sup>8)</sup>は 300 気圧の作用に由つて酸性液は中性に移動する事を推定した。それ故に圧力の酵素作用に及ぼす影響は pH の移動による二次的作用を考へなければならぬであらう。然し緩衝液を用ひて pH 4.8 として行つた第 3 表の成績は明かに加圧が酵素作用を抑制することを示すものだろう。元より本実験に於ては 1600 気圧と云ふ高い圧であるから或程度 pH の移動が起る事は理論的にも当然である(後の論文に取扱つた)。然しながら pH 4.8 は至適 pH であるだけでなく此の pH の前後では曲線は比較的平坦であるから、少々の pH の相違が有つても生成糖量の減少は極く僅かである。之等の理由から pH 4.8 の緩衝液を用ひて行つた 1600 気圧の加圧作用の成績である加圧値の約 3% の減少は、その大部分が酵素作用を抑制した圧の作用であると考へて間違ひないと思ふ。

稍低目の圧を筋肉や運動神経に作用せしめると、標本の興奮性が亢進するに反して、高い圧の作用に由つて之等標本の興奮性は低下する<sup>9)</sup>。酵素作用に対しても加へる圧が異つた場合には或ひは異つた態度を取ると云ふ事が有るのではないかと考へて、緩衝液を用ひて 1600 気圧の作用を調べた外 150 及び 400 気圧を用ひて実験を行つた。その結果 400 気圧でも亦 150 気圧でも全く対照と同じで、圧の作用は認められなかつた。従つて圧は酵素作用に対して抑制的にのみ働くものであらう。

次に両曲線の形の非常に相違している事、殊に pH 2.0 前後では圧迫した方が対照に比して澱粉分解量が著しく増加して居る事に就て述べる。既に述べた様に圧は酵素作用に対して抑制的にのみ働くと云ふのであるから、圧の作用に由つて溶液の pH が変わるものと考へねばならない。従つて点線で示した加圧値の曲線は圧の作用に由つて酵素作用が抑制され且つその時の pH が移動しているといふ2つの環境の下で澱粉分解が行はれたものと考へねばならない。そうであるならば pH の移動を見る場合には対照実験である実線の曲線と直接比較する事は出来ない。そこで緩衝液を用いた実験成績(第3表)の知見から今 1600 気圧の作用に由つてヂアスターゼの澱粉分解作用が対照値の約 3% 抑制されるものと仮定して、単に抑制作用のみを受けると斯うであらうと思はるゝ対照曲線として第2



図に断続線を以つて記し、此の曲線と加圧実験値とを比較する。対照に比して最も加圧実験値が多い pH 1.9 に就て見ると、此の値と等しい断続線上の点は pH 2.6 となる。即ち 1600 気圧の圧が加はつた為に pH 1.9 で行つた実験は恰も pH 2.6 で澱粉分解を行はしめた結果となつて居る。従つて pH 1.9 の混合液は圧の作用に由つて pH にして 0.7 だけ中性の方に移動させられたと考へなければならぬ。同じ pH の液でも 500 気圧の場合に

は pH 約 0.2 の移動しか起つていない。此の様な pH の変動の度は第 2 図から明らかな様に pH の数が増す程少なくなつて居る。pH 3.0 を見ると pH で約 0.4 中性の方に移動しているが、pH 6.0 を越えると殆んど変動が見られない。

図には表はしてないがアルカリ性の側では如何かを知る為に行つたのが pH 8.5 の実験である。加圧値の方が対照実験より大なる値を得た事は pH が中性の方に傾いた事を示す成績に外ならない。アルカリ性に於ける実験は pH 8.5 だけであるが、酸性液同様 pH の移動の度は中性をアルカリ側へと隔たる程大となるであらう。

尙加圧した際酵素自身が変性するか否か上述実験と同じ様な方法で酵素溶液(緩衝液にて pH 4.8 とする)のみを加圧して復圧後基質溶液に作用せしめ検査した処、1600 気圧数時間の作用でも対照と差異は認められなかつた。故に前述の抑制は酵素作用に対してであらう。

## V 結 論

1600 気圧迄の高圧の下でヂアスターゼを用ひて澱粉を分解せしめた結果、次の成績を得た。

1) チアスターゼの澱粉分解は 1600 気圧で約 3% 程度抑制されるが、150, 400 気圧下では圧の影響は見られなかつた。

2) 酸性及びアルカリ性液の pH は圧に由つて中性の方に移動する。その移動の度は酸又はアルカリの度が強い程大である。1600 気圧の加圧に由り pH 1.9 の液は 0.7, pH 3.0 では 0.4, pH 1.9 の液は 500 気圧に由つて 0.2 その pH の数が増した事となる。

擧筆するに当り終始御懇篤な御指導と御校閲を賜つた恩師林教授に衷心から謝意を表する。

## 献

- 1) Basset, J. et M. A. Macheboeuf, Compt. rend. Acad., 195, 1431, 1932.
- 2) Basset, J., Ibid., 191, 928, 1930.
- 3) Ebbecke, U., 157, 79, 1914.
- 4) Matthews, J. E., R. B. Dow and A. K. An-

- derson, J. Biol. Chem., 135, 697, 1940.
- 5) 大谷頭三：岡医誌，41年，4巻，1929.
- 6) 須藤憲三：生化学実験法.
- 7) 丹原英昌：本誌，第1編.
- 8) 大和人士：本誌.