解説

高圧力下の微生物活性

—圧力ショック酵母の熱測定とレーザーの生体刺激効果—

Microbial Activities under High Pressure: Calorimetry of Pressure-Shocked Yeast and Biostimulation Effect of Laser Irradiation

田村勝弘 宮下充雄

Tamura, Katsuhiko Miyashita, Mitsuo

Biocalorimetry is one of the powerful and convenient tools to evaluate microbial activities under high pressure. The method is mainly based on the fact that the heat evolved is strictly proportional to the metabolic activity, and the magnitude of calorimetric signal is employed as an index to express the biological activities. This method was adopted in order to investigate the thermotolerance of heat- and pressure-shocked yeast. The effects of non-reducing disaccharide trehalose on the stress response of yeast were also studied by a colony counting method and calorimetry. The biostimulation effect of a He-Ne laser was used for the recovery of yeast activity under high pressure up to 100 MPa. At 50 MPa and 30°C, the growth of unirradiated yeasts was inhibited entirely, however, the viable cell numbers of irradiated ones were increased and the rate of the increase in number of viable cells corresponded to that of the irradiated ones at 0.1 MPa.

[calorimetry, yeast, pressure shock, laser, thermotolerance, trehalose, microbial activity, heat shock]

1. はじめに

微生物の圧力応答に関する研究は、19世紀半ばの深海微生物の探索に始まり、1940年代から50年代にはJohnsonらにより生理・生態の研究が活発に行われた[1]。本邦では近年、京大の林により食品加工への高圧力利用が提唱され[2]、高圧力下の微生物挙動についても基礎・応用の両面にわたって研究が開始された。

生物細胞を適度なストレス環境下に放置すると環境の変化に素早く応答し、生物細胞内にストレス応答物質が誘導、合成される。これらの物質が誘導されると生物細胞は致死領域の二次的なストレス、たとえば高温や高圧力に対する耐性を獲得する[3]。ストレスを加えることにより、生物細胞内に熱ショックタンパク質(heat shock protein, hsp)と呼ばれる一連のタンパク質や二糖類の一種であるトレハロースなどが蓄積される。これらの誘導物質と生物細胞の二次的なストレスに対する耐性の間には良い相関関係があることから、生物細胞の環境的なストレスに対する耐性を強化するため

にストレス応答物質が合成されと考えられている[4]。

筆者らはこれまでに色々な観点から高圧力下における微生物の挙動を調べてきた[5-22]。本稿ではストレスとして圧力に力点をおき、酵母に圧力ショック加え、ストレス応答物質の合成や付随する二次的なストレスに対する耐性付与の概要をまず解説する。ついで、マイクロ熱量計を微生物活性測定に利用して、酵母のストレス応答を調べた結果について言及する。

ストレス誘導物質の1つであるトレハロースは、最近酵素法により安価に製造できるようになったことから[23]、食品、化粧品、医療などの分野で用途が拡大している。タンパク質の変性の抑制、保水性、組織の安定化などの効果が利用されているのであるが、そのメカニズムは実のところよく分かっていない[24, 25]。特に生体を用いた研究例は少ない。そこで、微生物の生育に及ぼすトレハロースの影響を調べた。培地にトレハロースを添加してストレス環境下の酵母の挙動を様々な視点から調べた結果についても言及する。

熱ショックタンパク質やトレハロースの誘導で、加圧

Fig. 1. Stress tolerance of pressure-shocked yeast cells.
○: thermotolerance (51°C, 10 min); ●: barotolerance (150 MPa, 60 min); □: ethanol tolerance ((14% w/w) ethanol, 60 min).

下でも酵母は生存が可能になるが、He-Neレーザーのような低出力レーザー照射によっても微生物活性が増大することから[26, 27]、加圧による微生物の失活をレーザー照射で押さえる方法を検討した。この分野の研究例についても併せて述べる。

2. 微生物の圧力ショック応答

一次的ストレスとして生理学的に熱と同様な働きをする高圧力下に一定時間放置して、圧力ショックを加えた酵母 (*Saccharomyces cerevisiae* IFO10149) を致死領域の高温、高圧力、高濃度エタノールにさらし、これらの二次的ストレスに対する耐性を比較した。また、圧力ショック酵母から抽出したタンパク質およびトレハロースを定量し、熱ショックを加えた酵母細胞と比較した[15]。

Fig. 1 に、30°Cで125 MPa までの圧力下に30分間放置して圧力ショックを加えた酵母の熱耐性、圧力耐性、エタノール耐性を示す。これらの結果より、圧力ショックを加えると酵母細胞は二次的なストレスに対する耐性を獲得することが分る。各ストレス耐性を誘導する最適圧力は、熱耐性が 75 MPa、圧力耐性が 50 MPa、エタノール耐性が60 MPaであった。最適圧力が異なることから、高温、高圧力および高濃度エタノールのストレスとしての程度の差あるいは作用の違いが示差される。

つぎに、75 MPa、30°Cで30分間圧力ショックを加えた酵母から抽出したタンパク質を電気泳動法により分析した結果をFig. 2 に示す。Fig. 2 (II) は熱ショックタンパク質 (hsp 104) を分離したバンドである。レーン A、B および C は、それぞれコントロール、熱ショッ

Fig. 2. Induction of hsp104 protein by pressure shock treatment. Lanes A (control, 30°C, 30 min), B (heat shock, 43°C, 30 min) and C (pressure shock, 75 MPa, 30°C, 30 min) are normalized for the protein concentrations.

Table 1 Induction of heat shock protein (hsp104)

	control (30°C)	heat shock (43°C)	pressure shock (75 MPa, 30°C)
Area	25	128	88
Percentage(%)	3.1	15.3	10.6

Table 2 Induction of trehalose

	control (30°C)	heat shock (43°C)	pressure shock (75 MPa, 30°C)
HLC method	ND	53.8	ND
Enzyme method	ND	40	ND

ND: not detected

μg / mg of proteins

ク、圧力ショックを加えた酵母のタンパク質電気泳動図である。Table 1 に誘導された hsp104 量を示してある。圧力ショックにより酵母細胞に誘導された hsp104 トレスを加えていないコントロールの 3.4 倍であり、熱ショックの 0.69 倍であった。一方、酵母の熱耐性の獲得に必要であることが報告されているトレハロースを定量した結果 (Table 2)、圧力ショック酵母からは全く検出されなかった。従来、熱と圧力は微生物に対して生理学的には似た影響を及ぼすといわれてきた[3]。しかし、耐性物質であるトレハロースの蓄積に関しては今回明瞭な違いが見いだされた。

3. 微生物活性の熱測定

生きた細胞や組織の生物活性を表す 1 つの指標として代謝熱が挙げられる。これは発熱量が厳密に代謝活動に比例するという事実に基づく。したがって、熱測定により微生物の増殖過程や代謝活動全般にわたる活

性を正確かつ総合的に見積もることができ、常圧下では多くの研究がなされている[28-30]。常圧同様、高圧力下の微生物活性を調べる上でも熱測定は役立つと容易に推察できるが、装置上の問題点が多く試みはほとんどなされていない。多くの観測結果より、生物細胞一個が放出する熱量は1～100 pWであることがわかっている[31]。マイクロ熱量計の使用により1 cm³以下の菌懸濁液試料でも代謝熱の測定が可能となることから、高圧力下の微生物の挙動を調べる上で熱測定は1つの強力な手段になりうる。そこで、今回新たに40 MPaまでの静水圧下で熱測定が可能な高圧力ラインを製作し、市販の熱量計に連結して高圧力下における酵母の増殖サーモグラムを求めた。酵母や大腸菌などの微生物は、約50 MPaでその増殖はほぼ停止する。したがって、加圧下で微生物活性を測定する熱量計の耐圧は50 MPaが1つの目安となる。

断熱法で熱容量(C)を得る基本式は次式で与えられる[32]。

$$C(\text{サンプル}) = dQ/dT - C(\text{耐圧試料容器}) - C(\text{圧媒体})$$

高圧熱量計の問題点は、より高い圧力下で測定しようとすればするほど、装置の耐圧試料容器は肉厚になり、C(耐圧試料容器)が非常に大きくなることである。サンプル量にもよるが、常圧装置ではC(試料容器)/C(サンプル)比は室温で1程度であるのに対し、高圧装置では10以上になることが多い。したがって、 dQ/dT が大きくなるため、加熱時間・熱平衡到達時間が長くなる。これらはともに測定精度の大幅な低下をもたらす。微生物活性測定実験にマイクロ熱量計を用いると0.3 cm³程度の

菌懸濁液(10⁵ cells/cm³)で測定が十分可能であるので、試料容器の熱容量は小さく抑えることができる。

酵母の熱、圧力、薬物などのストレスによる応答、熱ショック酵母の熱耐性、熱耐性におけるトレハロースの影響などをこれまでコロニーカウント法などで調べてきた。これらの問題を微生物活性の熱測定という別の観点から得られる情報をもとに再検討を試みた。トレハロースは酵母などの微生物に熱、乾燥あるいは凍結などのストレスがかかると細胞内に合成され、生命活動を保護する働きがある。これは糖の水酸基が水の代理機能を果たすためであると考えられており[24]、合成される糖の量は乾燥菌体重量の20%にも及ぶこともある[33]。熱ストレスに関する研究は熱ショックタンパク質の合成も含め広範になされているが、圧力をストレスとしてとらえた圧力ショックに関する研究例は非常に少ない[15,34]。

本実験で使用した高圧熱量計の概要をFig. 3に示した。高圧力の発生は、ガスボンベから直接加圧気体をスクリュー型の手動高圧ポンプに取り込み、圧縮する方法で行った。熱量計本体はCalorimetry Science Corporation製のCSC 4100である。Fig. 4で示した熱量計の試料容器は、容量が約0.3 cm³、耐圧が30 MPa程度のステンレス製で、1/16 インチのステンレスチューブにより高圧力ラインと連結している。このような連結式を採用すると熱もれが常に問題となる。しかし、試料容器が小さく微生物培養のように室温に近い温度での測定が多い場合はクランプ式よりも精度のよいデータが得られる。本装置の

Fig. 3. High-pressure calorimeter system.

1. Microcalorimeter (CSC 4100). 2. Cooling bath.
3. High pressure pump. 4. Digital pressure gauge.
5. N₂ gas cylinder. 6. N₂ or O₂ gas cylinder.

Samples in ampoule were pressurized using N₂ or O₂ gas compressed by high pressure pump.

Fig. 4. High-pressure sample container.

Fig. 5. Growth thermograms of yeast treated for 30 min at various temperatures and at atmospheric pressure. Logarithmic phase cells suspended in YPD medium with and without trehalose were put in the ampoules of the calorimeter. Yeast was incubated according to the following temperature programs in a microcalorimeter: $t^{\circ}\text{C}$ (30 min) - 51°C (10 min) - 30°C (about 2 days), where t is 20, 30, 43, or 46.

Trehalose concentration: A, 0 mol/dm³; B, 0.5 mol/dm³; C, 1.0 mol/dm³.

Temperature treated: ———, 20°C ; — — —, 30°C ; - - - - -, 43°C ; ······, 46°C .

Sample: 0.8 cm³.

試料容器は一度に4個セット可能である。その内の1個は参照として水を入れるので、一度に測定できるサンプルは3種類ということになる。微生物の培養実験には数日間を要するので、実験の効率をあげるためにもマルチセル型の熱量計が望ましい。

圧力ショックの効果と比較するため、まず常圧で熱ショックの実験を行った(常圧熱量計を使用)。酵母に熱ショックを加えたのち、どの程度熱耐性が酵母に付与されるか調べた[21]。温度プログラムは以下の通りである。 $t^{\circ}\text{C}$ (30分) - 51°C (10分) - 30°C (約2日)。ここで、 t は20、30、43、 46°C である。使用した酵母については、 43°C で熱ショックを加えるとストレス応答が最も大きいことが知られている[3]。そこで、 43°C を含む以上のような処理温度で30分間置いたのち致死温度である 51°C で10分間放置して熱耐性を調べ、さらに 30°C で約2日間培養した。酵母細胞が熱ストレスにさらされたさい、細胞内にトレハロースが蓄積され外的ストレスから身を守る機能を発現することから、培地にストレス保護剤としてトレハロースを加えた実験も同時に行った。トレハロースは、酵母にストレス耐性付与の働きをする以外に細胞安定化のためにさまざまな働きをする。最近では肺などの臓器の保存材として注目されている[35]。Fig. 5は上述の温度プログラムで得られた酵母の増殖サーモグラムである。トレハロースを含まない培地(A)では酵母の熱耐性獲得は20から 46°C までの処理温度に大きく依存しており、増殖開始の時間差がみられる。処理温度が 43°C (最適熱ショック温度)では熱量曲線の立ち上がりが最も早く、ついで30、20、 46°C の順になった。 0.5 mol/dm^3 のトレハロースを含む培地(B)では、全体に増殖による立ち上がりが早くなっている。 1.0 mol/dm^3 加えると(C)前処

Fig. 6. Thermotolerance of pressure-shocked yeast. Yeast was incubated according to the following temperature programs in a microcalorimeter: 30°C (P MPa, 30 min) - 51°C (0.1 MPa, 10 min) - 30°C (0.1 MPa, about 2 days), where P is 0.1 or 25.

Trehalose concentration:

———, 0 mol/dm³; — — —, 0.5 mol/dm³; - - - - -, 1.0 mol/dm³.

Sample: 0.3 cm³.

理温度の影響はほとんどなくなり、いずれも高い熱耐性が付与された。これらの結果より、トレハロースを培地に加えることにより酵母にストレス耐性が付与されることが確認できた。

熱ショックの代わりに圧力ショックを加えた結果をFig. 6に示す。高压試料容器に菌懸濁液を入れ熱量計にセットしたのち、30℃で25 MPaの圧力ショックを30分間加え、51℃まで昇温して10分間放置し、再度30℃までもどして培養した増殖サーモグラムである。これは先に述べた熱ショック処理の代わりに圧ショックを加えた実験で、試料容器に常圧用と高压用の別のものを用いた以外は同じ熱耐性実験をしている。25 MPaの圧ショックを加えることで、トレハロースを加えていない培地では0.1 MPaの場合よりも明らかに増殖の立ち上がりが早くなっており、熱耐性が付与されていることがわかる。トレハロース濃度を上げていくと0.1と25 MPaの両圧力とも次第に発熱量の立ち上がりが早くなり、1.0 mol/dm³添加すると、圧ショック処理の有無に関係なく高い熱耐性を示した。熱耐性に関しては圧力ショックの効果はFig. 5で示した熱ショック処理の効果とよく似ているといえる。

従来、熱や圧力ショックを加えた酵母の熱耐性の見積もりはコロニーカウント法で行っていたが、高压熱量計を用い、適当な温度プログラムを組むことで、正確かつ簡便に熱や圧力ショック酵母の熱耐性を調べることができるようになった。熱と圧力ストレスの組み合わせも容易に行うことができる。

4. レーザー照射の生体刺激効果

近年、低出力レーザー（ソフトレーザー）の生体刺激

効果が注目されている。高出力レーザーは生物細胞組織を破壊し、周囲の組織にも凝結や壊死を引き起こす。これに対して、低出力のレーザーは細胞の代謝機構を刺激し、その増殖を促進する効果があるため[26, 27, 36-38]創傷治療や床ずれ、関節炎、火傷などの治療に用いられて成果が得られている[37, 39]。

低出力レーザーの生体刺激効果を利用して、高压力下の微生物の成長阻害をレーザー照射により緩和あるいは克服する方法を酵母を用いて検討した。酵母細胞をさまざまな圧力、温度の条件下で、低出力 He-Ne レーザー（ $\lambda = 632.8 \text{ nm}$ ）を照射しながら生育させて、その生菌数を測定することにより生体刺激効果を調べた[16, 18-20]。

使用したレーザー照射用高压容器の概要をFig. 7で示した。He-Ne レーザーの光源には日本電気社製 GLG5260 型（5 mW）を使用した。サファイア製の光学窓を有する高压容器の一方からレーザー光を照射すると、容器内にセットした細胞懸濁液の入ったシリンダー状の内部サンプルセル（注射器の両端を切って作製したスライド式ガラスセル、容量は約0.7 cm³）を通過してもう一方の光学窓に至る。レーザー光源の反対側には光量計（アドバンテス製、Q8221, Q82214）を設置し、レーザー照射の間連続して光量を測定した。高压容器の周囲にジャケットを取り付け、恒温水を循環させることにより所定の温度に保った。圧力媒体には *n*-ヘキサンを用いた。

約2日間YPD培地で前培養したのち4時間本培養した対数期の酵母（*Saccharomyces cerevisiae* IFO 10149、菌密度： $1 \times 10^7 \text{ cells/ml}$ ）を上述のサンプルセルに入れ、高压容器に充填したのち、温度と圧力を変えてレーザー照射下で培養した酵母懸濁液を適当な濃度まで希釈し、コロニーカウント法で生菌数を計数した（N）。実験操作

Fig. 7. High pressure system for laser irradiation. 1. High pressure pump. 2. Bourdon gauge. 3. High pressure vessel. 4. Inner sample glass cell. 5. Sapphire window. 6. Water bath. 7. Optical power meter. 8. He-Ne laser system.

Fig. 8. Effects of low-power He-Ne laser irradiation on the growth of yeast cells at various temperatures and pressures.

Applied pressure: A, 0.1 MPa; B, 50 MPa; C, 100 MPa.

Irradiation time: △, 0 min (unirradiated); ◇, 60 min; ○, 120 min (full time).

Pressure and temperature were applied for 120 min.

を行う前の初発菌数 (N_0) との比 (N/N_0) より生存率を求めた。

Fig. 8 は 15 ~ 43°C、0.1、50、100 MPa の条件下で、無照射、最初の 60 分照射、120 分照射を行い酵母の生菌数をみたものである。高压容器内での培養時間は全て 120 分である。いずれの加圧、照射条件でも、最適生育温度である 30°C 付近で極大となる。0.1 MPa では(Fig. 8A)、レーザー照射した酵母の生菌数は無照射のものよりもいづれも高い。50 MPa の加圧下では(Fig. 8B)、レーザー照射の効果が最も大きく現れた。特に、25 ~ 30°C の温度範囲では、照射した酵母の生菌数は無照射の約 2 倍に達した。50 MPa は酵母の生育限界圧力であるため(室温)、無照射では酵母は増殖しないが、120 分間レーザーを照射すると常圧で無照射の場合に匹敵する生菌数の増加がみられた(初発菌数の約 2.2 倍まで増殖)。100 MPa でも(Fig. 8C)、他の圧力と同様に 25 ~ 30°C の温度範囲でレーザー照射の効果が現れたが、それ以外の温度では大差なく、また、全体的に生菌数は初発菌数 (N_0) よりもかなり減少した。

これらの結果をみると、レーザー照射を止めると増殖は低下あるいは停止しているように見える。そこで、確認のため照射の効果が最も大きい 50 MPa について、照射時間と生存率の関係を調べた(Fig. 9)。酵母は大腸菌同

Fig. 9. Effects of low-power He-Ne laser irradiation on the growth of yeast cells at 50 MPa and at room temperature (25°C).

Irradiation time: ●, 0 min (unirradiated); △, 20 min; ▽, 40 min; ◇, 60 min; ○, 120 min (full time).

——, irradiated; — — —, unirradiated.

様、約 50 MPa で増殖は止まり、静菌状態にある。しかし、レーザー照射を続けると実線で示したように 120 分まではほぼ直線的に生存率は増加した。一方、照射を途中で打ち切ると、照射している間には実線に沿って増殖するものの、照射が止まると同時に増殖もほぼ停止することが確認できた。

以上のように、He-Ne レーザーの照射は酵母の生育阻害の要因となる圧力や温度の影響を緩和あるいは打ち消す効果のあることがわかる。Karu は数種類の酵母に He-Ne レーザーを照射すると、タンパク質合成が $4 \times 10 \sim 3 \times 10^3 \text{ J/m}^2$ の照射線量で最も大きくなったと報告している[27]。今回の実験ではこれよりも 10～100 倍の線量を照射しているにもかかわらず、酵母細胞に対する生体刺激効果はいずれの条件下でも確認できた。

低出力レーザーの生体刺激効果を別の視点から調べるために、微生物活性測定の一つの有力な手段である熱測定を利用した。Fig. 10 は常圧で 5 分および 30 分間 He-Ne レーザーを照射した酵母懸濁液を熱測定した結果を示したものである。増殖サーモグラムの積分曲線は明らかに、レーザー照射による微生物活性の増進を示している。

低出力レーザーの生体刺激効果の応用例として創傷治療がある。ネズミの創傷にレーザーを照射することによって治癒が促進される例や[39]、治癒のプロセスに重要なヒトの線維芽細胞の増殖促進、コラーゲン生産の増加効果等も報告されている[40]。一方、刺激を与える低出力照射でも、患部組織に増感剤を添加することによって細菌を死滅させることができるという報告例もある[41]。このような現象が起こる明確なメカニズムの解明

Fig. 10. Effects of laser irradiation on the growth thermograms of yeast at atmospheric pressure.

— — —, 5 min irradiation; - - - - -, 30 min irradiation; ———, unirradiation.

はまだなされていないが、説明の 1 つは呼吸鎖 (電子伝達系) のある特定の成分が光を吸収し、系内の酸化還元反応特性が変化して、光化学的变化に結びつくとするものである[41]。また、細胞中の光を捕捉する発色団と、これを支えるタンパク質への影響も可能性として考えられる。

レーザー治療を含む臨床レベルでは He-Ne レーザーなどのソフトレーザーの生体刺激効果を疑問視する報告もある。ヒト細胞は増殖速度が今回使用した酵母と比べて遅く、また、生物全体の増殖の制御は 1 つの細胞培養に比べてはるかに複雑な過程であることなどを考慮すると、一概に刺激効果の有無を断定することはできない。今後さまざまな観点よりさらに詳細な検討を加える必要がある。

参考文献

- [1] A. M. Zimmerman: *High Pressure Effects on Cellular Processes*, Academic Press, New York, 1970.
- [2] 林力丸: 「食品への高圧利用」, さんえい出版, 1989.
- [3] H. Iwahashi, S. C. Kaul, K. Obuchi, Y. Komatsu: *FEMS Microbiol. Lett.*, **80**, 325-328 (1991), "Induction of barotolerance by heat shock treatment in yeast."
- [4] P. W. Piper: *FEMS Microbiol. Rev.*, **11**, 339-356 (1993), "Molecular events associated with acquisition of heat tolerance by the yeast *Saccharomyces cerevisiae*."
- [5] K. Tamura, T. Watanabe, H. Kourai: *Chem. Express*, **6**, 105-108 (1991), "Pressure enhancement of alcohol tolerance of yeast on alcohol fermentation: Application of pressure reversal of anesthesia."
- [6] K. Tamura, N. Otani, S. Fukumura: *High Pressure and Biotechnology*, C. Balny, R. Hayashi, K. Heremans, P. Masson, Eds., John Libbey, 1992, pp. 309-313.
- [7] K. Tamura, T. Shimizu, H. Kourai: *FEMS Microbiol. Lett.*, **99**, 321-324 (1992), "Effects of ethanol on the growth and elongation of *Escherichia coli* under high pressure up to 40 MPa."
- [8] K. Tamura, Y. Muramoto, H. Kourai: *Biotech. Lett.*, **15**, 1189-1194 (1993), "Hydrophobicity of the cell surface and drug susceptibility of *Escherichia coli* cultivated at high pressures up to 30 MPa."
- [9] 田村勝弘, 新田有里, 金品昌志: 麻酔と蘇生, **29**, 361-363 (1993), "熱ショック酵母の生育に及ぼす高圧力とエタノールの影響."
- [10] 田村勝弘: 「生物と食品の高圧科学」, 林力丸編, さんえい出版, 1993年, pp. 157-162.
- [11] 田村勝弘: 高圧力の科学と技術, **3**, 142-149 (1994), "大腸菌と酵母の圧力応答 — 非致死高圧力領域における挙動 —."

- [12] 田村勝弘:「高圧バイオサイエンス」, 林力丸編, さんえい出版, 1994年, pp. 144-151.
- [13] K. Tamura, M. Miyashita, H. Iwahashi: Progress in Anesthetic Mechanism, **3**, 491-495 (1995), "Effects of pressure and ethanol on the growth of yeast."
- [14] M. Miyashita, K. Tamura, H. Iwahashi: Progress in Anesthetic Mechanism, **3**, 422-426 (1995), "Induction of alcohol tolerance by pressure shock treatment in yeast."
- [15] M. Miyashita, K. Tamura, H. Iwahashi, *High Pressure Bioscience and Biotechnology, Progress in Biotechnology Vol. 13*, R. Hayashi, C. Balny, Eds., Elsevier, 1996, pp. 101-104.
- [16] K. Tamura, S. Kishioka, M. Miyashita, K. Iijima: Biotech. Techniques, **10**, 339-340 (1996), "Stimulating effects of low-power He-Ne laser on growth of *Saccharomyces cerevisiae* under high pressure."
- [17] 田村勝弘, 宮下充雄: 麻酔と蘇生, **32**, 157-160 (1996), "酵母細胞のアルコールと圧力によるショック応答."
- [18] S. Kishioka, K. Tamura, M. Miyashita: *High Pressure Bioscience and Biotechnology, Progress in Biotechnology Vol. 13*, R. Hayashi, C. Balny, Eds., Elsevier, 1996, pp. 113-116.
- [19] 岸岡進介, 田村勝弘:「高圧生物科学と高圧技術」, 鈴木敦史, 林力丸編, さんえい出版, 1997, pp. 9-14.
- [20] K. Tamura, S. Kishioka: Rev. High Press. Sci. Tech., **7**, 1324-1326 (1998), "Effects of low-power He-Ne laser on the growth of yeast under high pressure."
- [21] M. Miyashita, K. Tamura: Rev. High Press. Sci. Tech., **7**, 1327-1329 (1998), "Effect of stresses on the growth thermogram of yeast."
- [22] T. Yumura, K. Tsunano, K. Tamura, T. Maeda, H. Kourai: Rev. High Press. Sci. Tech., **7**, 1330-1332 (1998), "Response of *Bacillus subtilis* and *Klebsiella pneumoniae* to high pressure."
- [23] 杉本利行: 食品工業, **38**, 34-39 (1995), "酵素を用いた澱粉糖化法によるトレハロースの生産とその利用."
- [24] 櫻井実, 井上義夫: 表面, **34**, 213-219 (1996), "細胞のストレス耐性と糖の役割 —トレハロースは特異な保護材か—."
- [25] 櫻井実, 井上義夫: 生物物理, **37**, 326-330 (1997), "糖の水和とトレハロースの生理機能."
- [26] T. I. Karu: IEEE J. Quantum Electronics, QE-**23**, 1703-1717 (1987), "Photobiological fundamentals of low-power laser therapy."
- [27] T. I. Karu: *Photobiology of Low-Power Laser Therapy*, Harwood Academic Publishers, 1989.
- [28] A. E. Beezer, T. Fujita, K. Nunomura, R. Brettel, B. Schaarschmidt, A. I. Zotin: *Application of Calorimetry in Life Sciences*, I. Lamprecht, B. Schaarschmidt, Eds., Walter de Gruyter, 1977, pp. 107-156.
- [29] J. P. Belaich: *Biological Microcalorimetry*, A. E. Beezer, Ed., Academic Press, 1980, pp. 1-42.
- [30] I. Lamprecht: *Biological Microcalorimetry*, A. E. Beezer, Ed., Academic Press, 1980, pp. 43-112.
- [31] 高橋克忠:「実験化学講座 No.4 熱・圧力」, 日本化学会編, 丸善, 1992, pp. 340-350.
- [32] 山室修:「実験化学講座 No.4 熱・圧力」, 日本化学会編, 丸善, 1992, pp. 311-317.
- [33] J. H. Crowe, J. F. Carpenter, L. M. Crowe, T. J. Anchordoguy: Cryobiology, **27**, 219-231 (1990).
- [34] T. J. Welch, A. Farewell, F. C. Neidhardt, D. H. Bartlett: J. Bacteriol., **175**, 7170-7177 (1993), "Stress response of *Escherichia coli* to elevated hydrostatic pressure."
- [35] T. Hirata, H. Yokomise, T. Hukuse, K. Muro, K. Inui, K. Yagi, S. Hitomi, H. Wada: Thorac. Cardiovasc. Surgeon, **41**, 59-63 (1993), "Effects of trehalose in preservation of canine lung for transplants."
- [36] T. I. Karu, Health Phys., **56**, 691-704 (1989), "Photobiology of low-power laser effects."
- [37] O. Tiphlova, T. I. Karu, Photochem. Photobiol., **48**, 467-471 (1988), "Stimulation of *Escherichia coli* division by low-intensity monochromatic visible light."
- [38] T. I. Karu, O. Tiphlova, R. Esenaliev, V. Letokhov, J. Photochem. Photobiol. B; Biol., **24**, 155-164 (1994), "Two different mechanisms of low-intensity laser photobiological effects on *Escherichia coli*."
- [39] J. S. Kana, G. Hutschenreiter, D. Haina, W. Waidelich: Arch. Surg., **116**, 293-296 (1981), "Effect of low-power density laser radiation on healing of open skin wounds in rats."
- [40] M. Hrnjak, N. K. Kapulica, A. Budisin, A. Giser, Vojnosanit Pregl, **52**, 539-546 (1995), "Stimulatory effect of low-power density He-Ne laser radiation on human fibroblasts in vitro."
- [41] M. Willson, N. Mia, J. Oral Pathol Med., **22**, 345-347 (1993), "Sensitisation of *Candida albicans* to killing by low-power laser light."

[1998年7月30日受理]