

放射線照射家兎肝より抽出せる細胞毒のウニの 受精及び卵割に与える影響について

岡山大学医学部病理学教室
岡山大学医学部癌研究所
岡山大学医学部放射線医学教室
岡山大学医学部陣内外科教室

妹尾左知丸
山本道夫
内海耕慥
塩飽緑
赤木瑩子
井口与志子
小林淳一
上乃寿子

〔昭和35年5月23日受稿〕

緒 言

先に著者等は放射線生物作用に関する一連の研究としてX線被照射家兎肝より抽出せる不飽和脂肪酸分画¹⁾(OXと仮称する)のウニ卵及び精子に対する作用を追求し、さらに精子の運動阻害、受精卵の卵割阻害が見られる事を明らかにし、かつその卵割阻害は核の形態学的観察より核分裂中期で中止する事による結果である事を明らかにした²⁾。本編ではさらに本物質の精細胞に与える影響を追及せんとして助精前の精子をOXにて処理し正常卵との助精による受精膜形成を観察し、これより作用濃度及び作用時間と受精膜形成率の関係を求め、卵細胞に対する影響は助精前に本物質で卵を処理し、正常精子の助精にともなう受精膜形成率、卵割の度合を求め、さらに受精後卵割までの各時期の本物質に対する感受性のテストを行い、その作用機序の一端を明らかにせんとして本実験を試み、得られた結果について報告する。

材料及び方法

実験材料は前編²⁾に述べたと同様でパフンウニの卵及び精子を使用した。方法は第1に精細胞に対する作用を見るため0.002~0.01%のOXにて5分、8分、10分の3グループに分けて作用せしめ、作用せしめた精子を正常卵細胞に助精し、20分後にブアン氏液にて固定し、卵細胞の受精膜形成率を観察した。第2に卵細胞に対するOXの作用を観察するた

めには0.002~0.01% OXにて30分間正常卵を処理し、正常海水にて2回洗滌した後、正常精子にて助精し、助精後3分、5分にブアン氏液で固定し、卵細胞の受精膜形成率を観察し、さらに助精後100分、110分、130分にブアン氏液にて固定し、卵割の度合を観察した。又第3に受精後より第1回卵割までの各時期のOXに対する感受性をテストするために助精後98%の受精率を確かめ、助精後5分、20分、40分、60分、80分、90分、100分の各時期に0.05% OXにて各々10分間作用せしめ(この時、作用後2回正常海水にて洗滌する)、助精後100分、110分、160分にブアン氏液にて固定し、卵割の度合を観察した。なお総べての観察に於て受精膜形成率、卵割の度合の観察には500個の卵を観察測定し、その値を百分率にて示した。又核の形態はFeulgen反応を行い観察した。

実験結果

1. OXの精子に与える影響

0.002%OXを10分間精子に作用せしめても受精膜形成が23%低下し、0.01%では95%の低下を示した。然し5分間処理では0.006%OXまでは阻害効果はなく、0.008%で急激に阻害効果が示される。即ち作用時間の延長、作用濃度の上昇に従つて受精膜形成の阻害は大きくなる。勿論この値は助精後20分に観察したものであるが、助精後5分に観察するとさらに高い阻害効果が示される(Fig. 1)。この場合精子は卵の表面に集り時に受精膜形成を示さず分裂

を起すのが認められる。このような効果は精子に原

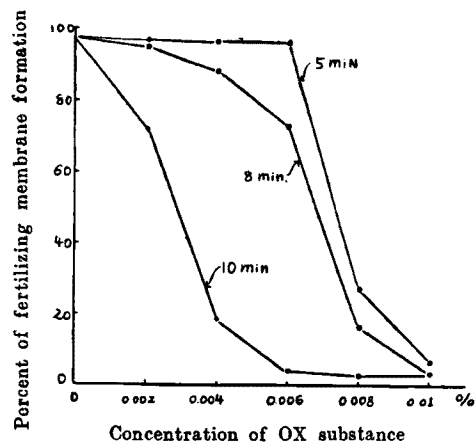


Fig. 1. 正常ウニ精子を種々濃度の OX にて 5 分, 8 分, 10 分間処理し正常ウニ卵と混合し助精後 20 分に示された受精膜形成の百分率を示す。

因するものか或いは精子と共に導入される OX (この精子処理時間が短いため OX を洗滌し除去出来なかつたため) の卵に対する直接の作用であるかを明らかにするため, 次に OX を作用させた卵に正常の精子を助精させて観察した。

2. OX の卵細胞に与える影響

0.002~0.01% OX を卵に 30 分間作用せしめた時, 正常精子との助精による卵の受精膜形成率は Fig. 2

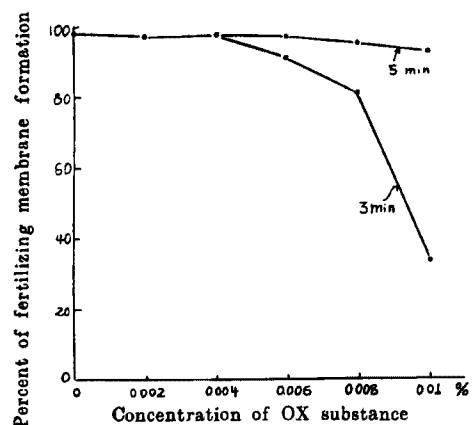


Fig. 2. 正常ウニ卵を種々濃度の OX にて 30 分間処理し, 正常精子と混合し, 助精後 3 分, 5 分に示された受精膜形成の百分率を示す。

の如くである。即ち助精後 3 分にブアン氏液で固定したものでは 0.004% OX までは受精膜形成阻害は認められず, 0.01% では 71% の阻害を示した。然しこの場合精子に対する OX の作用で示された受精膜

形成率が助精後の時間的過程で大して上昇しないのに反し, 卵に対する OX の処理では助精後の時間的過程につれて受精膜形成率は上昇し, 20 分後では無処理のものとの間には差を認めない。即ち卵に対する OX の作用は受精膜形成の速度を遅延せしめる作用がある。次に同様な処理卵の助精後 100 分, 110 分, 130 分に於ける卵割の度合を観察すれば Fig. 3 の如

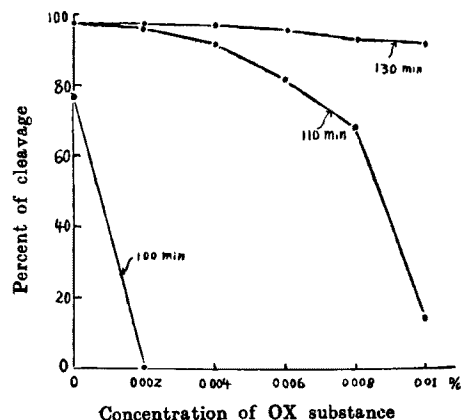


Fig. 3. 正常ウニ卵を種々濃度の OX 物質にて 30 分間処理し正常精子との助精により助精後 100 分, 110 分, 130 分に示された第 1 卵割の百分率を示す。

くである。即ち 0.002% の低濃度 OX についても無処理群が 75% の卵割を示す助精後 100 分に於て, 全く卵割が認められない。然し助精後 110 分では無処理群が 98% 卵割を示すのに対し 0.01% OX 処理群に於ても 25% の卵割が示される。即ち卵割に於ても受精膜形成の場合と同様 OX は卵割速度の遅延効果を示す。

次に前編²⁾で OX が分裂中期で阻害効果を示す事を観察し, 又上記の実験で卵割の遅延が起る事を明らかにしたが, はたして OX が分裂サイクルのどの時期で最も強く作用するかを明らかにするため受精直後から卵割までの各時期の OX に対する感受性のテストを行った。

3. 受精卵の受精直後から第 1 回卵割までの各時期に於ける OX に対する感受性

先ず受精より第 1 回卵割までの各時期を示せば, 受精直後 (5 分) は精子頭部の侵入があり, 受精後 10~20 分では星状体の出現があり, 40 分では雄雌核の融合が見られ, 60 分後には星状体の 2 分が起り, 80 分で分裂中期となり 95~100 分で分裂終期となる。

これ等の各時期に0.05% OX (単時間の処理を行うため高濃度を使用した)を10分間作用せしめ、受精後100分に於ける卵割の割合を観察すれば Fig. 4 (100 min) の如くである。即ち受精直後及び80分後では高い感受性が示され、Feulgen 反応での観察からすれば雄雌核融合、分裂中期に相当するもので、核融合が正常に進まないこと、中期の複雑な変化に対して強い影響を示す事が窺われる。さらに又60分後に於ても無処理群に比して著しい感受性が示され、40分後が最も感受性が低い。然しこれ等すべての処理群は無処理群に比してかなりの影響が示されるのは Fig. 4 の如くである。然し受精後110分、160分と時間の経過に従つてこれ等感受性の割合は減じて来ることから卵割速度の遅延効果として働くことが明らかである。

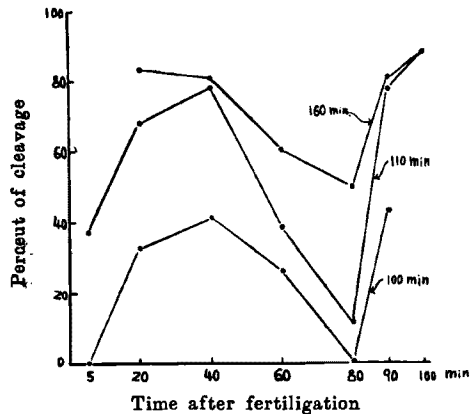


Fig. 4. 正常ウニ受精卵の受精直後より第1卵割迄の各時期に対する0.05% OXの受精後100分、110分、160分後に示される卵割百分率に与える影響を示す。

- 20分：星状体の出現
- 40分：雄雌核融合
- 60分：星状体の2分、DNA合成
- 80分：分裂中期
- 90分：分裂後期

考 察

以上の実験結果から明らかなように、OXは明らかに精子に作用し、その正常卵に対する受精膜形成率を低下せしめる作用がある。これはOXによる精子運動の低下と、そのために起る卵表面に与える刺激能の低下が原因であると考えられるが精子の先体に障害が起るためかも知れない。一方卵細胞に対してもOXは作用し、受精膜形成は阻害されるが受精

の起る事は確実である。然し精子の場合に比して著しく長時間(6倍)のOX処理により始めて明確な効果が認められる。受精後の卵割速度の遅延はFarrow formationの遅延によるものであるが、この場合は有糸分裂に遅延が起るので、むしろ後者の作用が卵割の阻害に重要な役割を演じているものと考えられる。特に卵をOXを含む液に受精後30分から入れたままにしておくことと分裂中期に於て核分裂が停止する点から見てもmitotic apparatusの形成阻害乃至は遅延に大きい原因が存在すると解する方が妥当ではないかと考える。OXはDNA合成を可成り阻害することが他の細胞で示されているが、ウニ卵に於ても同様の現象は当然考慮されねばならない。然し他の細胞と異り、ウニ卵では細胞質に多量のDNA(低分子)或いはDNAの前駆物質がある³⁾⁴⁾⁵⁾⁶⁾⁷⁾点で他の細胞とおもむきを異にするかも知れない。然し受精卵の感受性テストから見れば、明らかに分裂阻害は中期が強く、又受精直後も強い。而もそれについて受精後60分のDNA合成期も相当強い感受性を示し、これがDNA合成の阻害を意味するものと考えられる。又受精直後の強い感受性は受精直後よりOXを含む海水に入れたままにしておいたもので雄雌核融合の起らない事が観察され、雄雌核融合の阻害に基く感受性と考えられる。又中期の強い感受性はmitotic apparatusの形成或いは配列に影響を与えるものと考えられる。然しそのヘマトキシリン染色による形態学的観察ではSpindle fiberのわずかな短縮、或いは不整列を認めただけで、これに対する説明は今後残された問題の1つである。

扱今これ等OXの作用をX線生物作用と比較すると、X線直接照射による分裂各時期の感受性は上記OXの結果とやや類似している。即ちHolthusen⁸⁾は蛔虫卵に於て中期に高い感受性を認め、Seide⁹⁾はラジウムによつても中期強い感受性を示すことを報告している。又Vintemberger¹⁰⁾はX線照射を受けた蛙卵は中期に於て分裂阻害が起ることを主張している。即ち核分裂中期は一般に短波長の線に感受性が高いことが窺われるが、ウニ卵に関してはややその実験結果がまちまちである。即ちLangendorff¹¹⁾は受精直後及び終期に高い感受性を認め、Sparrow¹²⁾及び奥¹³⁾は前期、中期にそれを認めている。勿論OXはX線照射によつて生じた一つの産物であり、X線を受けた生体は、この外に種々の異常物質が作用し必ずしもX線照射効果の総べての点で同様であるとはいえないことは明

らからである。例えばX線照射時にはリゾレシチンの発生が認められ、照射時の高度の溶血は多分にこの物質に起因すると思われる¹¹⁾¹⁵⁾が、リゾレシチンの卵割に対する作用は前期が最も感受性が低く、後期、末期に高い感受性が認められる。従つてX線照射時に見られる変化は照射によつて発生する種々の有毒物質の総合作用によると考えられる。然しX線照射は前期、中期に於て分裂を中止せしめるという報告が多い点から見て、少なくとも細胞分裂に対してはOX或いは類似物質が主体を演じているものとする事は許されるものと思う。

結 論

バフンウニの精子、卵細胞、受精卵を用いて、それ等に対するOX物質(X線被照射家兎肝より抽出した細胞毒)の影響を追及し、次の結果を得た。

1. OXの作用を受けたウニ精子に受精膜形成能の低下を起し、運動の低下と共に生体反応の低下を示唆する結果を与えた。

2. OXの作用を受けたウニ未受精卵は受精可能であり、受精膜形成能力を有するが、その速度は遅延し、卵割に至るまでの時間が遅延する。

3. 受精後、卵割までの各時期にOXを作用させた結果は受精直後及び分裂中期にあるものが最も高い感受性を示し、前者では雄雌核の融合が阻止され、後者では分裂の行進が阻まれる。

4. 以上の事実とX線照射による卵割障害に関する諸家の報告を比較検討し、X線照射による細胞分裂の阻害にはOXの発生が重要な役割を果しているものと結論した。

文 献

- 1) 山本道夫：細胞化学シンポジウム, 9, 141 (1959).
- 2) 妹尾, 山本, 内海 外：岡山医学会雑誌, 投稿中.
- 3) Marshah, A. and C. Marshak: *Exptl. Cell Res.* 10, 246 (1955).
- 4) Marshak, A. and C. Marshak: *Exptl. Cell Res.* 5, 288 (1953).
- 5) 内海, 妹尾：細胞化学シンポジウム, 10, 投稿中.
- 6) Sugino, Y., L. Okazaki, and R. Okazaki: *Biochim. Biophys. Acta.* 26, 453 (1957).
- 7) 杉野, 岡崎：蛋白質, 核酸, 酵素, 2, 20 (1957).
- 8) Holthusen, H.: *Arch. ges. physiol.* 187, 1 (1921).
- 9) Seide, J.: *Z. Wissensch. Zoöl.* 124, 252 (1925).
- 10) Vintemberger, P.: *Compt. rend. des seanc. de la Soc. de biol.* 98 (1928).
- 11) Langendorff, H., M. Langendorff: *Strahlenther.* 40, 97 (1931).
- 12) Sparrow, A. M.: *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 151, 1508 (1951).
- 13) 奥孝行：日本放射線学会雑誌, 17, 32 (1957).
- 14) 山本道夫：岡山医学会雑誌, 投稿中.
- 15) 赤木瑩子：岡山医学会雑誌, 投稿中.

The Effects of OX (Unsaturated Fatty Acid Fraction From the Irradiated Rabbit Liver) on the Fertilization and Cleavage of Sea Urchin Egg

By

Satimaru SENO, Michio YAMAMOTO, Kozo UTSUMI,
Midori SHIWAKU, Eiko AKAGI, Yoshiko IGUCHI,
Junichi KOBAYASHI and Hisako UENO

Department of Pathology, Okayama University Medical School Department
of Radiation Medicine, Okayama University Medical School

The effects of the OX substance, which was extracted from the liver of irradiated rabbits, on the sperm and egg, unfertilized and fertilized eggs of sea urchin (*Hemicentrotus pulcherrimus*) have been observed.

1. The sperms exposed to OX showed a decreased mortality and lost the ability to stimulate the egg to raise up fertilizing membrane suggesting the inability of giving physical shock to the egg surface or the damage of acrosome.

2. The unfertilized eggs exposed to OX retain the ability of the formation of fertilizing membrane and cleavage but showed remarkable delay in both the length of time for the membrane formation and cleavage.

3. The most sensitive effects on the fertilized eggs have been observed on the initial stage of fusion of sperm and egg nuclei and the metaphase. Immediately after the fertilization in the egg exposed to OX the fusion of sperm and egg nuclei was inhibited and in the cells on metaphase the cleavage was delayed by the prolonged period of transition from metaphase to telophase.

4. From the results with the consideration of the effects of X-rays on cleavage appearing in the past report the authors concluded the OX will be the essential substance representing the effects of X-rays on the cell cleavage.
