

放射線照射家兎肝より抽出せる細胞毒のウニ卵 及び精子に与える影響について

岡山大学医学部病理学教室（指導：妹尾教授）

岡山大学医学部放射線医学教室（指導：武田教授）

妹	尾	左	知
山	本	道	夫
内	海	耕	慥
塩	飽		緑
赤	木	瑩	子
井	口	与	志
上	乃	寿	子

〔昭和 35 年 4 月 23 日受稿〕

放射線の生物作用に関してはすでに数多くの実験があり作用の本質に就ても理論的の二三の見解がある。然し臨床的な観察結果は直接的作用の他に一定の特殊化合物の産生を思わせるものがあり、この点に関し著者等は放射線照射家兎肝の観察を行い、得られた不飽和脂肪酸分画に X 線被照射動物が示す症状その他の生物作用と類似した作用の有る事を明らかにした¹⁾²⁾。これ等の分画が特に分裂細胞に対して著明な影響を与え精母細胞、組織培養細胞等の分裂を著明に阻害し又核酸合成、呼吸酵素活性、mitotic apparatus 形成等を阻害する事は既に報告した如くである³⁾⁴⁾⁵⁾⁶⁾⁷⁾。これ等の中、細胞分裂阻害作用の機構を明らかにする目的で同調分裂を起させたウニ卵の卵割、分裂に与える本物質の作用を観察した。本編では主として形態学的観察結果について報告する。

材料及び方法

材料には岡山県滋川臨海実験所近辺及び岡山県邑久町虫明地区海岸にて採集した新鮮なバフンウニ *Hemicentrotus tulcherrimus* を用いた。方法は成熟ウニ卵及び精子を別にシャーレに取りあらかじめその受精率を検し受精率が 100~96% であるものを選び又同卵の卵割に用する時間も測定した後実験に供した。

作用物質としては X 線照射家兎肝より抽出された不飽和脂肪酸分画¹⁾²⁾（妹尾、山本その他、以下 OX と云う）及びその peroxid を除いた物及び之等を Ca 塩としたものを用いた。これ等の各 0.2cc を海水にて 20 cc に稀釈し、tween 80 の 0.005 cc を加え金属ホモゲナイザーにて攪拌しそれ等を原液とした。使用

に際しては原液を 100 倍、200 倍、400 倍、600 倍、800 倍、1,000 倍に稀釈し、之等の各々に卵及び精子を入れて観察した。即ち第 1 に同稀釈液に卵及び精子を別々に入れて 5 分間後に之等及び正常水中の卵及び精子を種々の組合せに於て混じ受精せしめ、受精膜形成を観察した。第二に未処理卵及び精子を受精せしめた後種々の分裂時期に上述の各段階の稀釈液に入れ卵割の進行状態を位相差顕微鏡下に観察した。又卵割時の核の形態の観察には一定時間（30 分以上）本物質（0.01%）を作用せしめた物を Acetic-Alcohol（1 3）にて固定し、Feulgen 反応を施して核の形態を観察した。

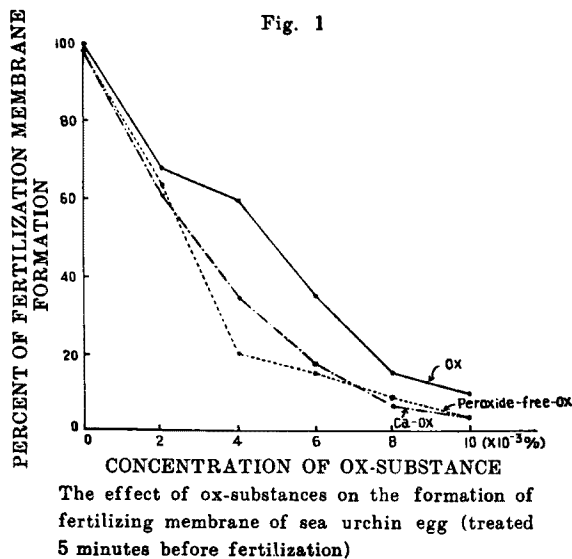
実験結果

1. 精子に対する OX 物質の作用

0.001% の OX 物質を 5 分間作用させた精子を正常の卵細胞と接触せしめた場合には受精膜形成を起さない。之等の精子はその運動が非常にゆるやかであり卵表面に達するも受精膜形成を起さしめない。

2. 卵細胞に対する OX 物質の作用

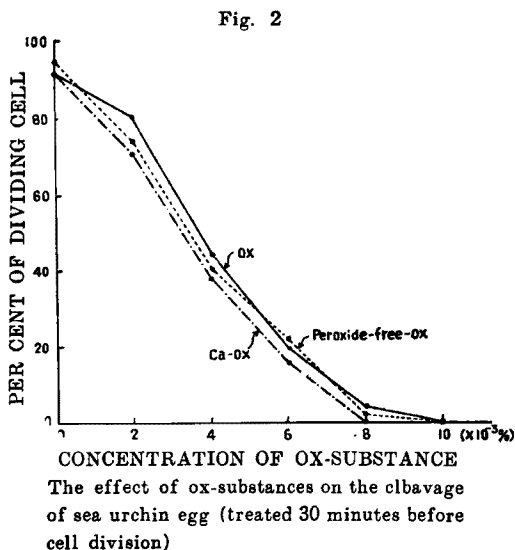
0.001~0.01% の OX 物質で 5 分間卵を処理し、その処理液中にて正常精子と混合した時受精膜形成は阻害される写真 1. A, B（図 1）即ち図 1 の如く OX, Peroxide free-ox, ca-ox の三者に於て観察された全ての濃度に於て略同程度に受精膜形成阻害が見られる。一方上述の液で 5 分処理後の卵を正常海水にて洗滌したものに就ての同様な観察結果では受精膜形成は 100~95% 迄恢復し又多量の精子と混ざれば受精膜形成率も増大する。即ち 5 分処理に於ては卵はほとんど作用を受けず OX 物質中での受精



膜形成率の低下は OX に依る精子の活性低下に帰因するものと考えられる。然し 0.01% 液で 30 分間処理した卵では洗滌後に於ても受精膜形成率は著しく低下する。

3. 卵細胞分割に対する OX 物質の作用

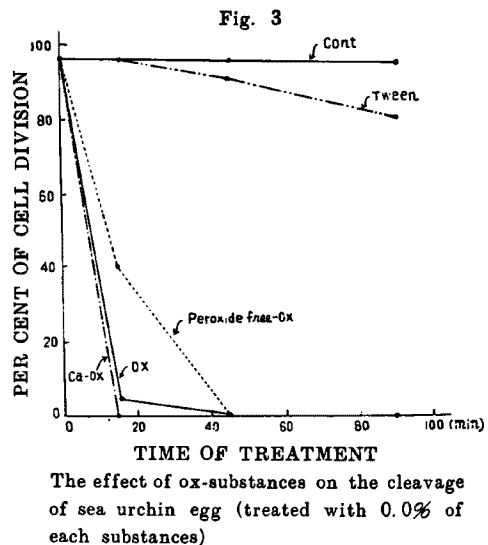
先づ予備実験として温度と卵割の時期との関係を観察した結果では 98% の受精膜形成を示した卵に就ては 18°C に於て第 1 回卵割は受精膜形成後約 95 分で起り、第 2 回分裂は 150 分で起つた。この様な卵を受精 30 分後に 0.01~0.001% の各 OX 物質中に入れて観察した結果は第 2 図 (写真 2. AB) の如くである。即ち第 1 回卵割の百分率は OX 物質の濃度の増加



につれて低下する。次に受精卵を各々受精 15 分、60 分、90 分後に OX 物質を作用せしめた結果では 0.01% の濃度のものに 30 分以上作用させると卵割は完全に阻害され、15 分間の作用でも既に著明な抑制効果が見られ、その作用は Ca-OX, OX, peroxide free-OX の順に弱くなる。この時溶媒に用いられた tween 80 のみを含む海水中での観察では 90 分後にわずかな分裂低下 (16%) を見たすにすぎない。

4. 卵割阻害時に見られる核の形態

2 分割後 5 分の卵を 0.01% OX に処理し受精後 180 分にこれ等処理卵を Acetic-Alcohol 中に投入し DNA 以外の Feulgen 反応陽性の物質を除き Feulgen 反応を施したものでは赤道板上に並んだ染色体が認められたが無処理の対称では既に 4 つの核の形成が認められた (写真 3. AB)。従つて OX の作用に依つて分裂は中期に於て停止乃至は遅延したものと考えられる。



考 察

ウニ卵卵割に対する X-線 の作用に関する研究は多い⁹⁾⁻¹⁶⁾ がそれ等のほとんどは X-線照射の直接効果に関するものであり染色体の変化、spindle 形成の阻害、核酸合成阻害、呼吸酸素活性の変動等が認められている⁹⁾⁻¹⁶⁾。之等の中 X 線に依る spindle 形成阻害作用は SH 基の酸化説に依つて一般的に説明されている。然し一方又紫外線照射ウニ卵のホモゲネートは X 線と同様に Spindle 形成の阻害作用がある事が示され¹⁷⁾ その作用は Lipid peroxide によ

ると説明されている。従つてこの効果は lipid peroxide が SH の酸化を起す様に作用し結果的に Spindle 形成阻害を起すとも考えられるが上述の実験結果は被照射動物肝からのリビッドは Peroxide free にしても尚その不飽和脂肪酸分画に同様な分裂阻害作用がある事を示している。之が spindle 形成阻害に依るものかどうかは現在の所では明らかでない。

一方又実験結果は OX 物質が精子細胞に対し卵細胞に対するよりも更に著しい作用を与える事を示している。即ち OX の作用を受けた精子は受精能を失い運動の低下を示す。これがどの様な機構に依るものかは不明であるが細胞の運動低下と一定の関係があると思はれ OX 物質に関する一連の実験から明らかにされた呼吸酵素活性に対する本物質の阻害効果²⁷⁾に依るものかも知れない。本物質は家兎精細胞に対し DNA 合成阻害を起す事が明らかにされているが²⁸⁾本物質の精子 DNA に及ぼす作用は不明であり、従つてこの様な作用がどの程度上述の現象に関係しているかも知全く不明であるし、本実験結果は OX 物質がウニ卵の受精及び卵割に対し

て X 線と極めて類似的作用をもつ事を明らかに示している。

結 論

X 線被照射家兎肝より抽出した不飽和脂肪酸分画がウニ卵の精子及び卵細胞に与える影響を受精と卵割に於ける形態学的観察に依つて追求し次の結果を得た。

1. 精子を 0.001% の OX 物質によつて 5 分処理すると精子は正常卵に対して受精膜形成を起させる作用を失う。

2. OX 物質は卵割に対して阻害作用を有しその作用は濃度の増加又は作用時間の増加に伴い強くなる。尚卵割は本物質の作用に依りその分裂中期に於て停止乃至は遅延する。

3. OX 物質はその中に含まれる Peroxide を除いてもその作用に殆んど変化はない。

文 献

- 1) 山本道夫：細胞化学シンポジウム，9；141，1959。
- 2) 山本道夫：岡山医学雑誌，投稿中
- 3) Yamamoto, M. et al. Acta. Med. Ohayama 14；1960。
- 4) Yamamoto, M., K. Utsumi et al. Acta Med. Ohayama 14；1960。
- 5) 金政：癌学会報告（第2回癌シンポジウム）。
- 6) 伊丹：岡山医学会雑誌，投稿中
- 7) 塩飽：岡山医学会雑誌，投稿中
- 8) 妹尾左知丸：細胞化学シンポジウム，1；55，1953。
- 9) Henshaw, P.S.：Amer. J. Roentgenol. 43；899，1940。
- 10) Evans T. C., Slaughtner J. C., Little E. P and Failla, G.；Radiology. 39；663，1942。
- 11) Evans T. C.：Biol. Bull. 92；99，1947。
- 12) Barron, E. S. G.：Oberlin Symp. Radiobiol. Wiley, New York, 216，1952。
- 13) Barron, E. S. G., and Seki, S. L.：J. Gen. Physiol. 35；865，1952。
- 14) Baco, Z. M.：Fundamental of Radiobiology Butterworths scientific Pub. London 1955。
- 15) Barron E. G., Flood, V. and Gasvada, B.；Biol. Bull., Wood's Hole, 97；51，1949。
- 16) Brachet J.：Biochemical Cytology, Academic press. Inc. New York 1957。
- 17) Wilbur, K. M.：Exptl. Cell Res. 13；303，1957。

写 真 第 一 明

- 写 真 1. 正常バフンウニ卵を0.01% OX 物質にて5分処理し下液中にて正常種子と助精した時の受精膜形成阻害を示す。Aは対称群，Bは実験群で受精膜形成が阻害されている。
- 写 真 2. 正常卵及び精子を助精し，30分後に0.01% OX 物質中に入れ130分後に見られた受精卵で，Aは対称，Bは実験群で全く卵割を起していない。
- 写 真 3. 受精卵第一回卵割後5分の時0.01% OX 物質中に入れ180分後に酢酸アルコールで固定し

Feulgen 反応を行つて核染色体の染色を行つたものであり、Aは対称ですでに4細胞期に入り、Bは実験群で、2細胞の各核は核分裂中期と考える所で分裂を中止しているのを示す。

The Effect of the Unsaturated Fatty Acid Fraction from the Liver of Irradiated Rabbit on the Fertilization and Cell Division

By

Satimaru SENO
Michio YAMAMOTO
Kozo UTSUMI
Midori SHIAKU
Keiko AKAGI
Yoshico IGUCHI
and
Hisako UENO

Department of Pathology, Okayama University Medical School
(Director Prof. S. Seno)

Department of Radiology, Okayama University Medical School
(Director Prof. T. Takeda)

Author's Abstract

The effect of unsaturated fatty acid fraction from the liver of irradiated animal on fertilization and cell division of sea urchin egg (*Hemicentrotus tulcherrimus*) have been observed.

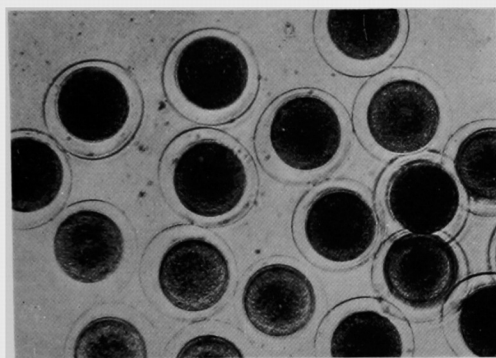
The sperms exposed to the substance for 5 minutes decrease in their motility and lost the fertilization activity resulting in the loss of their ability for the formation of fertilizing membrane in eggs. The eggs exposed to this substance after fertilization present the stop or the delay in their cleavage. Such an action on eggs becomes marked when the concentration of this substance increases. The most susceptible stage seems to be the metaphase at which the chromosomes are arrested on the equatorial plate losing the tendency to move toward the poles.

These effects of this substance can be seen even after removing the peroxide as equally in the original substance.

妹尾 他 5 名 論 文 附 図

写真 1

A



B

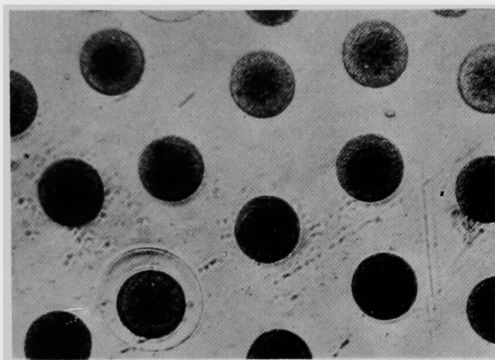
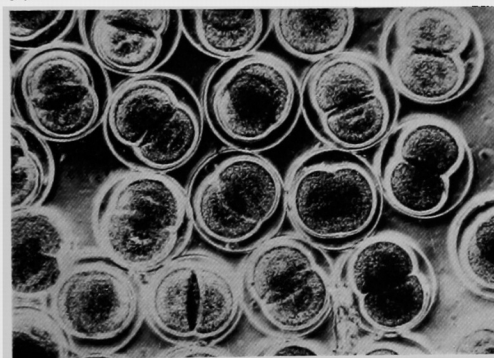


写真 2

A



B

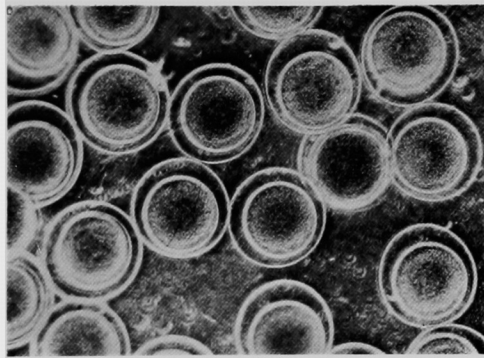
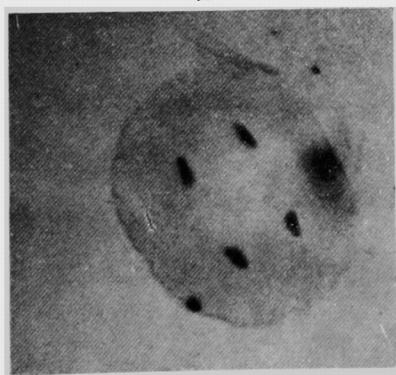


写真 3

A



B

