

細胞分裂に及ぼす高水圧の影響

岡山大学医学部第一生理学教室 (指導: 林 香苗教授)

安 田 浩 士
村 上 哲 英
三 木 福 治 郎

〔昭和35年8月26日受稿〕

I. 緒 言

細胞分裂に及ぼす高水圧の影響については Marsland²⁾及び Pease³⁾が *Arbacia* や *Urechis* の受精卵を用いて割球溝の後戻り現象を観ており、村上⁴⁾は加圧によつてサンショオウニ卵が1→2→4細胞の型を経過せずに直接1→4細胞の型をとり、然も4細胞になる迄の時間的差異は1→2→4細胞と殆んど変わらないこと、及び受精後第一分裂前期に加圧して固定、それを顕微分光測定法により一細胞当りのDNA量を算出して、1→4細胞型機構の解析を試みている。

著者らは同じくサンショオウニ卵を用いて未受精卵及び受精卵に一定時間、一定高水圧を負荷し、除圧後分割卵の分布を調べると共に、一細胞期から二細胞期を経ずに直接四細胞期に進行する機構を形態学的に検討した。

また、安田¹²⁾が蛙受精卵を500 kg/cm²前後で加圧してオタジャクシの形態異常を観察している。そこでウニ卵に於いても、畸形の現われる可能性があると考え本実験を試みた。

II. 実験材料及び実験方法

試料としては昭和35年7月中旬、岡山県玉野市波川海岸沖で採取したサンショオウニを用い、岡山大学附属臨海実験所に於いて実験を行った。

ウニ卵は KCl によつて排卵させたもので、精子は所謂 dry sperm を用いた。

未受精卵及び受精卵に加えた高水圧は100~500 kg/cm²、加圧時間は10~80分とした。未受精卵に就いては同種卵が受精せば受精膜形成率が90~100%のものを用い、未受精卵のみを加圧し、受精膜形成率及び細胞分裂像の分布を算定した。受精卵は安田の観察及び実験から、最も影響の受け易い分

裂前~後期に一定時間、一定圧力の下に曝らされた。除圧後、高水圧装置より取り出して各時期に於ける全数100~200卵を観測して分割卵の百分比を調べ、更に pluteus まで飼育して観察畸形の有無を調べた。

III. 実験成績

A) 未受精卵

未受精卵に100, 300及び500気圧をそれぞれ10分, 15分, 30分及び60分間作用させた後、受精させた場合の受精膜形成及び卵分割に関して調べ、その成績は第1表の通りである。

これによると、高水圧によつて影響のあらわれるのは300 kg/cm²を15分乃至30分作用させた材料からであつて、300 kg/cm²、15分間加圧では受精膜形成率は89%となるが、2細胞期には対照群と殆んど差異がなくなつている。又、300 kg/cm²、30分間加圧では受精膜形成率87%、2細胞期91%であるが、4細胞期では対照群と差がなくなつている。即ち、加圧することによつて初期の発生速度の遅らされた事がうかがえるのみである。100 kg/cm²を60分作用したものは桑実期で、500 kg/cm²を30分作用したものは blastulae 期でそれぞれ対照群と差異がなくなつている。然し、300 kg/cm²を60分作用したものは約50時間後、pluteus 型幼生期に対照群では100%に達しているのに対し、実験群では約91%に達しているにすぎなかつた。但し畸形はこのとき認められなかつた。

B) 受精卵

1) 分裂前期に加圧

a) 加圧の大きさによる影響

加圧時間を一定にして、加える高水圧を100, 300及び500 kg/cm²について調べた結果は第2表に示す通りである。

第 1 表 未 受 精 卵

高水压 加压 時間	100 kg/cm ²				300 kg/cm ²				500 kg/cm ²					
	受精膜		2細胞		Morula		8細胞		Blastulae		Pluteus		Blastulae	
	K	E/K	K	E/K	K	E/K	K	E/K	K	E	K	E/K	K	E/K
10 min.	97%	100%			97%	100%						97%	96%	
15 "			100%	100%	97%	89%						100%	100%	85%
30 "			100%	91%	96%	87%						100%	86%	100%
60 "	100%	100%	100%	81%	95%	83%						90%	100%	100%
				92%	85%	Non. Sw. b.						100%		

30時間後 (授精後) ← 50時間後 (授精後)

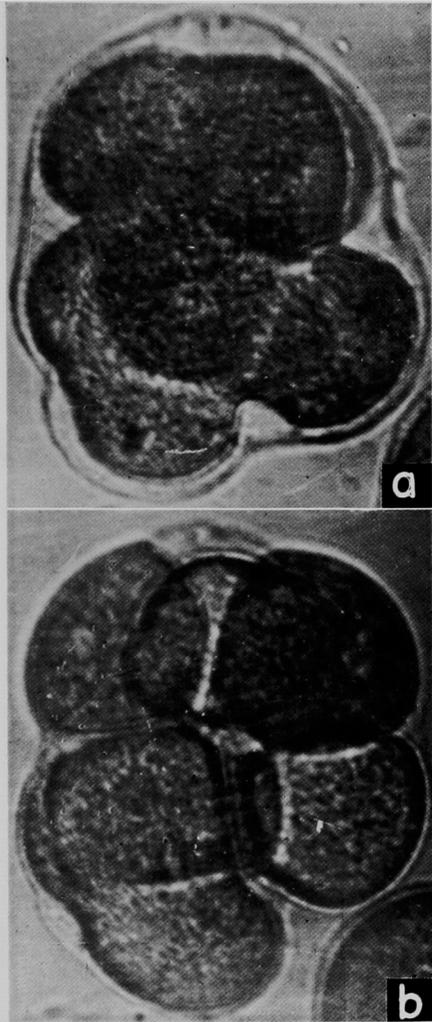
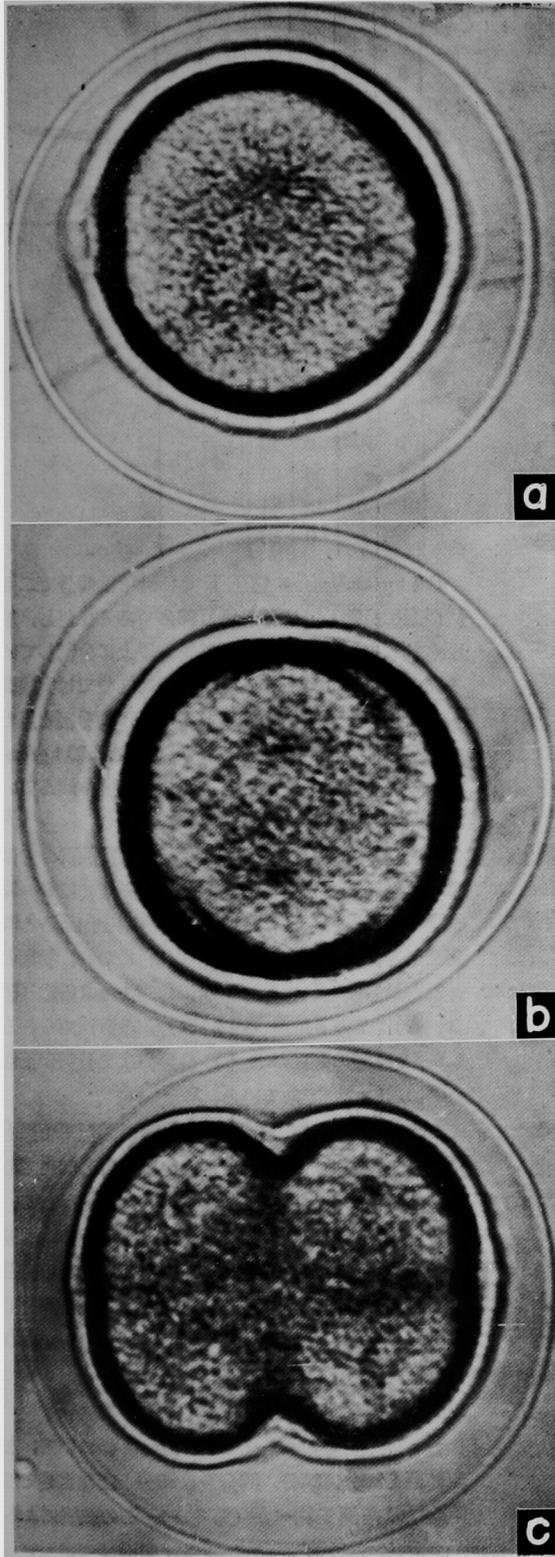
(註) K: 対照群 Sw. b.: Swimming blastula
E: 実験群 Non. S.: Non swimming blastula

第 2 表 受精卵 (分裂前期加压)

100 kg/cm ² 10分加压						
		対照群 (C)	実験群 (E)	E/C	E/C	備考
45' 後	受精膜		87%			
	未分割卵	13	36			
	2細胞	185	136	88		
	3 "	0	1			
	4 "	2	0			
計	200	200				
1°30'	未分割卵	20	7			
	2細胞	1	2			
	3 "	1	1			
	4 "	27	11			
	8 "	84	26			
	16 "	67	149	179/151	190/178	Daal 凍結
	不同割又は盤割	0	4			
計	200	200				
300 kg/cm ² 10分加压						
		対照群 (C)	実験群 (E)	E/C	E/C	備考
1°30' 後	受精膜		93%			
	未分割卵	28	200			
	2細胞	171	0			
	4 "	1	0			
	計	200	200			
2° 後	未分割卵	0	3			
	2細胞	0	3			
	3 "	0	6			
	4 "	0	5			
	8 "	2	23	44%	92%	
	16 "	3	37			
	32 "	95	28			
不同割又は盤割		95				
計	100	200				
500 kg/cm ² 10分加压						
		対照群 (C)	実験群 (E)	E/C	E/C	備考
1° 後	受精膜		94%			
	未分割卵	59	143			実験群に Haya- cytia を含む
	2細胞	99	57	58%		
	3 "	3	0			
	4 "	37	0			
	8 "	2	0			
計	200	200				

第一図 (1→4細胞)

第二図(A) (1→8細胞)



300 kg/cm² 10分加圧 ↑

a: 除圧後 1時間30分

b: " 1時間37分

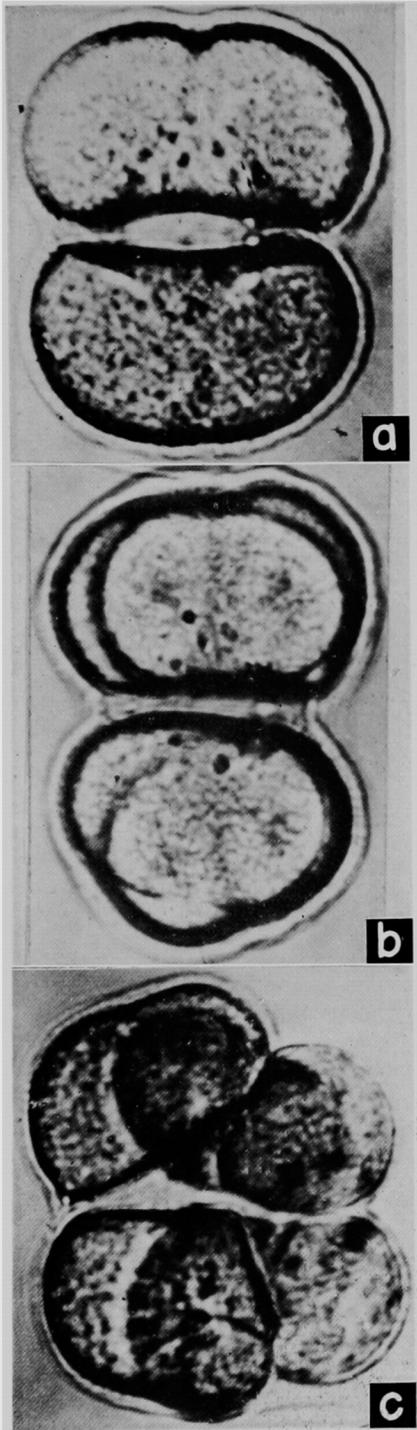
← 300 kg/cm² 10分加圧

a: 除圧後 5分

b: " 7分

c: " 10分

第二図 (B) (2→8細胞)



300 kg/cm² 10分加圧
 a: 除圧後 30分
 b: " 35分
 c: " 40分

2'30'後	未分割卵	5	15	} 84%	} 69/68	} 57%
	2細胞	26	11			
	3 "	1	5			
	4 "	13	20			
	8 "	14	23			
	16 "	41	14			
	不同割又は盤割	0	12			
	計	100	100			
3'30'後	未分割卵	0	8	} 84%		
	2細胞		1			
	3 "	0	1			
	4 "	6	3			
	8 "	4	8			
	16 "	9	10			
	32 "	20	30			
	Blastula	49	21			
	不同割又は盤割	0	18			

100 kg/cm²加圧：常圧下では受精後45分で二細胞以上に分割している細胞は93%であるに対し、加圧されると受精後50分では二細胞以上に分割している卵の比率は68%である。然し1.5時間後では実験群の方が幾分多く分割が観られる。尚、不同分割と思われる分割卵が認められ、これが300及び500 kg/cm²加圧では可成り多くみられ、1→4細胞へ進んでいるのも認められた(図1)。

300 kg/cm²加圧：受精後1.5時間で実験群の方は未だ分裂後期のままであるが、2時間後には8~32細胞が対照群の44%になり、不同分割を加えると92%である。この期に分割が急速に行なわれ、初期の遅れが取り戻された形である。又、1→8細胞(図2, A), 2→8細胞(図2, B)が多数認められる。1.5→2時間の間にかような分裂方式で分裂が正常分裂に追いついて来ている。

500 kg/cm²加圧：受精後1時間の対照群で最も多い2細胞の数は実験群に於いて対照群の58%である。然し、2.5時間後、対照群の大部が進行している4~16細胞の比率は84%となり、更に3.5時間後の8細胞~blastulaeの比率は84%で、初期の遅れを次第に取り戻している。尚、除圧後20分で核分裂のみ起り、細胞分裂を伴わないものが観られることがある。

b) 加圧時間の影響

最も効果的とみられる300 kg/cm²について、加圧時間を10分、30分、50分及び80分と変化させて加圧効果の差異を調べた(第3表)。この成績による

第3表 受精卵 300 kg/cm² 加圧

30分加圧						
		対照群 (C)	実験群 (E)	E/C	E/C	備考
8'	受精膜	98%	84%	87%		
50'	2細胞	84%	78%	91%		

分割の時間的遅れは認められるが、形態的には特筆すべき変化はない。

50分加圧						
		対照群 (C)	実験群 (E)	E/C	E/C	備考
1'43'	受精膜		85%			0.5%
	未分割卵	4	73			
	2細胞	2	126			
	3 "	0	1			
	4 "	59	0			
	8 "	135	0			
	計	200	200			
3'13'後	未分割卵	2	5			87%
	2細胞	0	6			
	3 "	1	4			
	4 "	1	15			
	8 "	6	19			
	16 "	2	36			
	32 "	0	108			
	Blastula	188	7	0.4%		
38'50'	Nou. sw. blast	9	0			実験群には非分割が多いが更に分割が進むとこれがなくなっている。
	sw. blast	0	13			
	Pluteus	91	87	93%		
	計	100	100			

80分加圧						
		対照群 (C)	実験群 (E)	E/C	E/C	備考
2'後	受精膜					2'15'後核が著明に大 ↓ 核消失 ↓ 35'後 Syncytia
	未分割卵	3	131			
	2細胞	14	67			
	3 "	2	2			
	4 "	50	0			
	8 "	49	0			
	16 "	82	0			
	計	200	200			

3'後	未分割卵	0	56	49%	21%
	2細胞	2	36		
	3 "	0	12		
	4 "	2	55		
	8 "	12	35		
	16 "	24	6		
	Blastulae	160	0		
	計	200	200		

と、加圧時間が長くなる程分割は遅れる。だが、加圧80分でも受精後約33時間すると、blastulaeの数は対照群とほぼ同じになってくる。但し、実験群のblastulaeは対照群のそれに比して運動性が鈍い。これは対照群の方で発生が更に進んでおり、所謂swimming blastulaeとなつているためと考えられる。加圧群では2, 4, 8細胞期に不同分割となり、発生が途中で進行しなくなつているものが多くみられたのも、分割が進むと正常な発生を辿る様になつている。又、80分加圧で、2時間後に稀にはあるが、核分裂のみ起り、細胞分裂のみられないものが観察された。尚、2細胞から4細胞を経ずに直接8細胞期へ進行する細胞も観察された。pluteus型の畸形は認められなかつた。

2) Swimming Blastulae で加圧

受精後約20時間を経て、swimming blastulaeの時期で、300 kg/cm²、30分加圧した。blastulaeの運動が最初著しく促進され、のち時間と共に次第に鈍くなり、除圧すると一過性に停止し、又次第に運動し始める様になる。更に時間を経ると、殆んど対象群と同程度に運動する様になる。この現象はイガイの繊毛運動及びミヂヅコの心搏数に及ぼす高水圧の影響¹³⁾等と同型である。

IV. 考 按

分裂前～後期の受精卵に高水圧を短時間加えた場合(多くは10分)、除圧直後分裂が遅れているが、その後時間の経過と共に対照群に追いつている。これは加圧した事によつて、加圧中星状体が崩れ、更に分割溝のあつた位置に水泡状のblisterが出来る。この様に急激な形態学的な変化が生じると云う事は分裂細胞の原形質に少くとも物理化学的な変化があつた事が推察される。然し圧力を正常に戻すと再び分裂が進行している。この場合にはblisterの方向と直角の位置、即ち加圧前に中心体の存在した位置に再び中心体が発現し、星状体も形成されてい

る。この事は加圧による原形質の物理化学的变化は原形質の細胞器官を可成り粗く変化させたものであつて、崩された細胞器官を再建するには大した時間も、エネルギーも要しない程度のもと考えられる。その為、除圧後たやすく分割の遅れを取り戻し、細胞分裂サイクルが早くなつたり、或いは多相分裂によつて正常卵のそれに近く遅れが恢復していくものと思われる。

この多相分裂が起るのは、放射線処理、ある種の制癌剤処理、高温処理、低温処理、或いは単に NaCl の高調液処理でも生じる等、多くの報告がある。村上はウニ卵を分裂前期に 300 kg/cm^2 の下で10分処理すると、一細胞当りの DNA 量が $4n$ 以上の値をもつた細胞が現われ、この事が次の分裂に際して多相分裂の要因となるのであろうと述べている¹⁰⁾。又細菌類や原生動物に於いては、Fulcone等¹⁾、Zeuthenら¹¹⁾の報告によると、 $4n$ 相当以上の DNA をもつた細胞が現われた場合、次には synchronous の分裂を繰り返して行くのみであつて、多相分裂に就いての記述はない。又同じウニ卵でも *Arbacia* やサンショオウニでは多相分裂は起り易く、*Paracentrotus* では起り難い。多相分裂の生じる要因は先づ DNA が $4n$ 相当量以上合成され、次に分裂装置がこれに伴わなければならない。その為には星状体が2つに分かれるのではなく、多相に分かれる必要がある。

圧力の作用は DNA 合成を抑制することなく、且つ中心体の出現をも促すものなのであろうか。中心体の出現の機構が現在のところ未だ理解されるに十分な成績や説明を得ていない状態なので、今後の興味ある課題として追求してゆきたい。

不同分割が存在したが、*pluteus* に於いては何ら畸形が認められず、加圧による分裂の遅れは大抵の

場合、*morula* 或いは *blastulae* 期で対照群に追いついている。不同分割も時間を経ると、まだ分割していない方の割球の分裂が早まるか、或いは多相分裂により正常発生に近かずくものと考えられる。

未受精卵を加圧した場合、受精膜形成が阻害されるが、これに就いては精子濃度、或いは卵細胞の表層顆粒の変化等、未だ吟味しなければならない多くの問題を残しているの、稿を改めて論じたい。

V. 結 論

サンショオウニ卵を用いて、未受精卵及び受精卵に高水圧を加えて卵分割に於ける分割卵の分類、更に *pluteus* まで飼育して高水圧の卵分割に及ぼす影響をくらべて次の結論を得た。

1) 未受精卵では 300 kg/cm^2 、15分加圧によつて、受精膜形成が阻害される。その程度は圧の大きさ及び加圧時間によるも、除圧後、細胞分裂には影響しない。

2) 受精卵では $100\sim 500 \text{ kg/cm}^2$ 、 $10\sim 80$ 分加圧で卵分割が遅れる。その遅れは加圧の大きさ及び加圧時間の異なる程大きい、*blastulae* に達する迄には対照群に追いつく。

3) 未受精卵及び受精卵ともに加圧によつて *pluteus* の畸形は出現しない。

稿を終るに臨み、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し、併せて種々御便誼を賜つた岡山大学理学部附属臨海実験所に対し深く感謝の意を表します。

参 考 文 献

- 1) F. Fulcone and W. Szybalski: *Exper. Cell. Res.*, 11, 486, 1956.
- 2) D. A. Marsland: *J. Cell. Comp. Physiol.*, 13, 15, 1939.
- 3) D. A. Marsland: *The structure of Protoplasm, Monograph of the society of plant physiologist, Ames. Iowa*, p.127, 1942.
- 4) D. A. Marsland: *J. Cell. Comp. Physiol.*, 36, 205, 1950.
- 5) D. A. Marsland: *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 51, 1327, 1950.
- 6) D. A. Marsland: *Intern. Rev. Cytol.*, 5, 199, 1956.
- 7) D. A. Marsland: *Biol. Bull.*, 115, 356, 1958.
- 8) D. A. Marsland: *Anat. Rec.*, 132, 473, 1958.
- 9) D. C. Pease: *J. Morph.*, 69, 400, 1941.
- 10) 村上哲英: 細胞化学シンポジウム, 10, (印刷中).
- 11) E. Zeuthen and O. Scherbaum: *Recent Devel. Cell Physiol.*, Ed. J. A. Kitching, Academic Press Inc., N. Y. 141, 1954.
- 12) 安田浩士: 岡山医学会雑誌, 71, 6767, 1959.

13) 三木福治郎：岡山医学会雑誌，72巻，1960（印刷中）。

Effect of High Hydrostatic Pressure on Cell Division

By

Hiroshi Yasuda
Tetsu-Hide Murakami
and
Hukuziro Miki

1st Dept. of Physiology, Okayama Univ. Med. School
(Director; K. Hayasi, M. D.)

In order to study the influence of pressure effects on the cell division of sea urchin eggs we have performed a series of experiments to enable us to understand the meaning and the importance of morphogenesis of the embryo. Sea urchin eggs used are of *Temnopleurus tereumatics*, in the stages of unfertilization to early blastulae. The experimental results can be summarized as follows.

1) In unfertilized eggs the elevation of fertilization membrane is delayed by high pressure of 300 kg/cm² applied for 15 minutes. The delay is in proportion to the pressure intensity and duration. Nevertheless, furrowing process of the egg does proceed after the pressure is withdrawn.

2) Likewise, in fertilized eggs, the furrowing are retarded under high pressure, in fertilized eggs, the furrowing are retarded under high pressure, in proportion to the pressure intensity and duration. In most cases, however, the rate of the cell division catches up with that of the control before reaching the stages of blastulae.

3) The deformities of pluteus can be observed in applying the pressure neither to unfertilized, nor to fertilized eggs in all stages.
