



Title	Über die Wasserabsorption des Salamandereies (Mit 5 Tabellen und 3 Abbildungen)
Author(s)	AOKI, Kiyoshi
Citation	北海道帝國大學理學部紀要, 7(4), 381-398
Issue Date	1941-03
Doc URL	http://hdl.handle.net/2115/27033
Type	bulletin (article)
File Information	7(4)_P381-398.pdf



[Instructions for use](#)

Über die Wasserabsorption des Salamandereies*

von

Kiyoshi Aoki

Zoologisches Institut, Naturwissenschaftliche Fakultät,
Kaiserliche Universität zu Sapporo

(Mit 5 Tabellen und 3 Abbildungen)

I

Es ist eine bekannte Tatsache, dass Seewasser nach der Befruchtung oder Aktivierung bei Echinodermeiern in den Perivitellinraum aufgesaugt wird, und dann die Abhebung der Befruchtungsmembran in Erscheinung tritt. Nach den Untersuchungen von Loeb ('08), Robertson ('12), Hobson ('27), Runström ('28) u. a. wird im allgemeinen angenommen, dass der kolloidosmotische Druck an dem Ei diese Wasserabsorption veranlässt.

Wenn das Salamanderei mit Wasser in Berührung kommt, absorbiert es allmählich auch Wasser, unabhängig von der Befruchtung, und infolgedessen hebt sich die es umhüllende Eikapsel ab. Hierbei ist die Menge des wirklich in das Ei selbst eingedrungenen Wassers gegen die des aufgenommenen Wassers sehr klein, so dass sich der grössere Teil des absorbierten Wassers in Kapselflüssigkeit verwandelt.¹⁾

Aber bis jetzt ist der Mechanismus der Wasserabsorption an den Uroderen-Eiern niemals behandelt worden. Seit 1937 ist der Verfasser an Eiern vom Salamander (*Hynobius retardatus*)²⁾ auf dieses Problem eingegangen und zu der Schlussfolgerung gelangt, dass die Wasserabsorption infolge des kolloidosmotischen Druckes der Kapselflüssigkeit vor sich geht. Darüber möchte er im folgenden näher berichten.

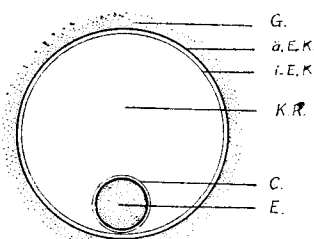
*) Contribution No. 146 from the Zoological Institute, Faculty of Science, Hokkaido Imperial University, Sapporo.

1) Über die physikochemischen Eigenschaften der Kapselflüssigkeit des Eies liegen einige Angaben bei *Megalobatrachus maximus* (Tomita und Fujiwara '33) und bei *Hynobius noburosus* (Takamatsu '35) vor, aber sie sind sehr kurz und skizzenhaft. Neuerdings ist von Richards ('40) die Kapselflüssigkeit des Eies von *Ambrystoma punctatum* physikochemisch und auch chemisch näher untersucht worden.

II

Die folgenden Experimente wurden hauptsächlich an befruchteten Eiern³⁾ von *Hynobius retardatus* angestellt, die nach der Ablage 9–11 Stunden lang schon in Wasser gelegen hatten. Deshalb haben die Eier schon vor dem Versuch Wasser in verschiedenem Grad aufgenommen, also die nachherige Aufnahmefähigkeit für Wasser ist nach dem Eisack verschieden. Daher wurden in den Versuchen nur die Eier, die demselben Weibchen entstammten, zur Untersuchung herangezogen.

Nun wurde jedes Ei mit der Kapsel zusammen getrennt abgeschnitten und dann wurde die an der Oberfläche der äusseren Eikapsel anhaftende Gallert vorsichtig mit Nadel und Messer so weit wie möglich abgeschnitten.⁴⁾ Wird ein solches gallertfreies Ei in Wasser eingetaucht, so nimmt es allmählich Wasser auf, und der Kapselraum, der zwischen der Eikapsel und dem Chorion liegt,



Schematische Darstellung eines *Hynobius*-Eies. G. Gallert, ä.E. K. äussere Eikapsel, i.E.K. ... innere Eikapsel, K.R. der mit der Kapselflüssigkeit ausgefüllte Kapselraum, C. Chorion, E. Ei.

2) Die Eikapsel des Eies von *Hynobius retardatus* besteht aus doppel-schichtig kugelig weichen Membranen, und die dichte Gallertmasse haftet an der Oberfläche der äusseren Kapsel, an welcher nach Innen zu mit dünnerer Gallertsschicht die innere Kapsel fest klebt. An den reifenden Eiern im Oviduct oder an den Eiern gleich nach der Ablage, die noch nicht Wasser aufgenommen haben, liegt die Eikapsel locker an der Oberfläche des Chorions an, und der Raum zwischen beiden (Kapselraum) ist mit granulreicher dünner Gallert vollgestopft. Wenn das Ei in Wasser eingetaucht wird, absorbiert es Wasser, der Kapselraum vergrössert sich allmählich und von der Oberfläche des Chorions hebt sich die Eikapsel ab.

3) Da nur sehr schwer schwangere Tiere zu bekommen sind, hat der Verfasser hauptsächlich befruchtete Eier zu den Experimenten verwendet, die jeden morgen aus einem freien Tümpel gesammelt worden waren. Überdies ist in der Umgebung von Sapporo, die Frist, während der man solche Eier in genügender Menge sammeln kann, nur auf ungefähr 2 Wochen in der Mitte April beschränkt, so dass die Experimente über mehrere Legeperioden durchgeführt werden mussten. Deshalb ist es unvermeidlich, dass die Ergebnisse eventuell von einander abweichen.

4) Hier bedeutet "Ei" nicht nur das Ei selbst, sondern das Ei, das mit der Kapsel umhüllt ist.

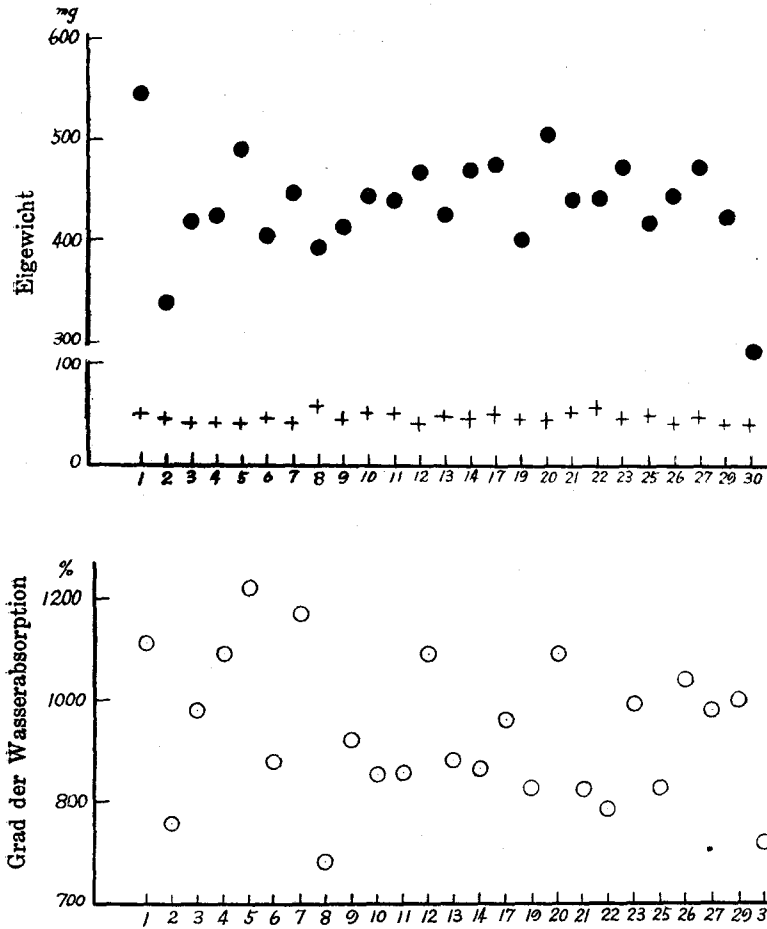


Abb. 1 Die Variation des Gewichts der Eier aus demselben Eisack nach 48 Stuneeen in Leitungswasser. ●Gewicht der Eier in mg nach 48 Stunden; ○Eigewicht gegen initiales Gewicht in Prozenten; +Initiales Eigewicht in mg. Zahlen auf der Abszisse zeigen die Einummer vom freien Ende des Eiscks.

vergrössert sich, dementsprechend nimmt das Eigewicht Schritt um Schritt zu. Die Wasserabsorption dieses garelltfreien Eies gelangt in den meisten Fällen in 80–90 Stunden ins Gleichgewicht. Unter natürlichen Bedingungen, unter denen die Eier in der dichten Gallertmasse eingeschlossen sind und des weiteren die Garelltmasse noch mit einem grossen Eisack umhüllt ist, sind selbstverständlich

noch mehrere Stunden bis zur Erreichung des Gleichgewichts nötig. Aber in den folgenden Experimenten wurde meistens der Grad der Wasserabsorption nach 48 Stunden bestimmt.

Noch unter den Eieren aus demselben Eisack, mit anderen Worten unter den Eiern, die vor dem Versuche unter denselben Bedingungen gestanden hatten, wird deutlich ein gewisse Variation in dem Grad der Wasserabsorption⁵⁾ beobachtet. In Abb. 1 und Tabelle 1 ist ein Beispiel aus den Versuchen gegeben. Wie in dem Ergebnis klar wird, zeigt das Ei, dessen Gewicht ursprünglich grösser ist, nicht immer einen höheren Grad der Wasseraufnahme oder grösseres Gewicht. Verursacht ist ein Teil dieser Variation, ohne Zweifel, durch die unvollständige Beseitigung der Gallert, die an der Oberfläche der äusseren Kapsel klebt, und weiter dadurch, dass die Menge des absorbierten Wassers schon am Anfang des

Tabelle 1

A. Eigewicht in demselben Eisack. (Tem. 10.5°C±0.5)

Ei Nr.	Init. Gew. in mg	Gew. nach 48 St. in Leitungswasser	
		in mg	in % gegen init. Gew.
25	46.8±0.67	435.3±6.62	929±18.5

B. Relative Werte der Eikapsel und der Kapsel Flüssigkeit gegen Gesamteigewicht.

Ei Nr.	Gesamteigewicht	Kapselgewicht	Gewicht der Kapsel Flüssigkeit
23	100.0	11.3±0.41	86.5±0.43

Versuches je nach dem Ei verschieden war. Aber der grössere Teil dieser Variation der Wasserabsorption beruht hauptsächlich auf den individuellen Unterschieden. Das Gewicht der Eikapsel selbst nimmt infolge ihrer Quellung zu, der grössere Teil des zusätzlichen Gewichts des Eies ist aber auf die Vermehrung der Kapsel Flüssigkeit zurückzuführen.

5) Der Grad der Wasserabsorption wird durch die prozentige Gewichtszunahme, bezogen auf das initiale Eigewicht, dargestellt.

Bei den Eiern, die nur ein wenig Wasser aufgenommen haben (am Anfang des Experimentes), in Gesamtgewicht 56 mg (Durchschnittswerte von 5 Bestimmungen) beträgt das Gewicht der Eikapsel 18.5 mg, das des Eies 9.0 mg und das der Kapsel­flüssigkeit 28.5 mg und dagegen bei den Eiern, die 48 Stunden Wasser aufgenommen haben, beträgt das Gesamtgewicht 435.3 mg, das der Eikapsel 49.2 mg, das des Eies 9.5 mg, das der Kapsel­flüssigkeit 376.5 mg, d. h. bei diesen Eiern nimmt die Kapsel­flüssigkeit 86.5% vom Gesamtgewicht ein.

III

Die Wasserabsorption des Eies wird durch Salzlösung (physiolo-

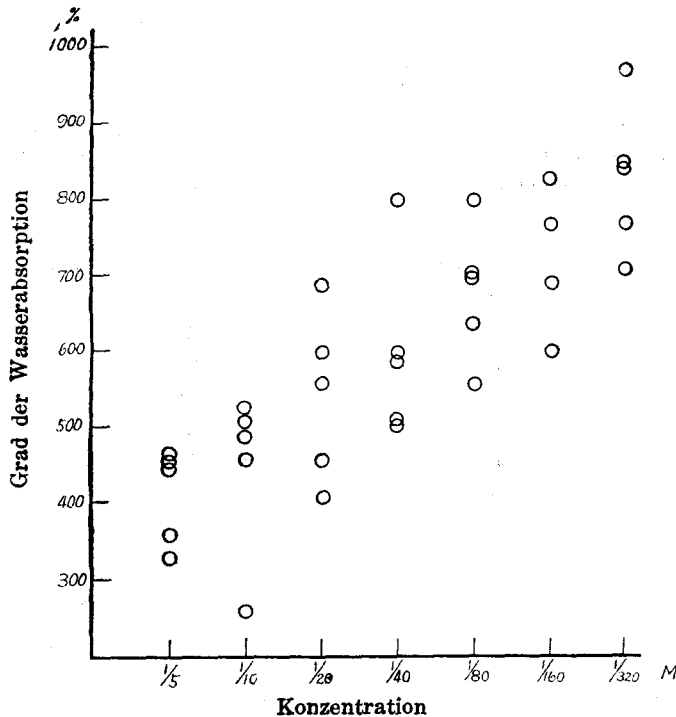


Abb. 2 Die Wasserabsorption der Eier in der Salzlösung (physiologisch äquilibrierte Salzlösung). Die Wasserabsorption wird durch die prozentige Gewichtszunahme, bezogen auf das initiale Eigewicht, dargestellt. Die Eier liess man 48 Stunden lang in den Salzlösungen Wasser aufnehmen.

gisch äquilibrierte Salzlösung = *p. ä. S.*⁶⁾) wie bei der Lachseiern stark beeinflusst. Man liess die Eier in verschiedenen Konzentrationen von *p. ä. S.* (1/5–1/320 M) 48 Stunden Wasser aufnehmen. In diesem Versuche, dessen Ergebnis in der beigefügten Abb. 2 dargestellt ist, wurden in jeder Konzentration je 5 Eier von demselben Weibchen gemessen. Wie aus der Abb. 2 klar wird, ist die individuelle Variabilität ziemlich gross, aber der Grad der Wasserabsorption steigt deutlich mit abnehmender Konzentration an. Diese Beobachtung hat der Verfasser an Eiern von verschiedenen Stämmen oft gemacht, und in jedem Falle trat immer das gleiche Ergebnis auf.

Im Gegensatz zu der wesentliche Wirkung der Elektrolytlösung, zeigt der Grad der Wasserabsorption bei Saccharoselösung in allen Konzentrationen beinahe gleiche Werte (Tabelle 2). Nämlich die

Tabelle 2

Wasserabsorption der Eier in der Saccharoselösung. Die Wasserabsorption wird durch die prozentige Gewichtszunahme, bezogen auf das initiale Eigewicht, dargestellt. (Temp. 10.5°C ± 0.5)

Konz. in M.	Ei Nr.	Grad der Wasserabsorption (%)
1/5	9	2193 ± 96.5
1/10	9	2194 ± 107.4
1/20	10	2227 ± 64.6
1/40	8	2116 ± 70.1
1/80	9	2123 ± 54.9
1/160	10	2254 ± 84.7
1/320	8	2140 ± 79.4

Konzentrationsänderung der Saccharoselösung übt keinen Einfluss auf die Wasserabsorption aus. Daraus unterliegt es keinem Zweifel, dass die Saccharose-Moleküle durch die Eikapsel ungehindert permeieren und sich die Saccharose nicht direkt an dem Mechanismus

6) Die physiologisch äquilibrierte Salzlösung enthält die Salze in demselben Verhältnis wie in der Ringerschen Lösung. Von 1 M NaCl-Lösung 100 Teile, 1 M KCl-Lösung 2.4 Teile und 2/3 M CaCl₂-Lösung 2.5 Teile wird die Stammlösung zusammengesetzt, die mit 1 M NaCl-Lösung praktisch isotonisch ist. Nach Bedürfnis wurde die Stammlösung mit redestilliertem Wasser verdünnt und durch Hinzufügung einiger Mengen von 0.1 M NaHCO₃-Lösung wurde pH um 7.0 reguliert.

der Wasserabsorption beteiligt. In diesem Falle ist der absolute Grad der Wasseraufnahme sehr viel höher als der in der Salzlösung oder im Leitungswasser.

IV

Wie oben erwähnt, wird in der Salzlösung die Wasserabsorption von der Konzentration deutlich beeinflusst, wobei der osmotische Druck der Salzlösung abhängig von ihrer Konzentration verschieden ist. Um festzustellen, ob die Wirkung der Konzentration nur auf Unterschiede des osmotischen Druckes der Salzlösungen beruht oder nicht, müssen wir zuerst die Permeabilität der Eikapsel für die verschiedenen Salze messen. Da das Ei, das Wasser bis zur Sättigung aufgenommen hat, in der konzentrierten *p.ä.S.* sein Gewicht nicht mehr ändert (Tabelle 4), worauf später wieder zurückzukommen sein wird, ist vorausgesetzt, dass die Eikapsel für die Salze auch höhere Permeabilität hat.

Die Richtigkeit dieser Voraussetzung wurde klar bewiesen durch das folgende Experiment. Man brachte die Eier, die im Leitungswasser schon gesättigt waren, in Salzlösung und bestimmte dann nach bestimmter Zeitdauer den Ionengehalt sowohl in der Kapselflüssigkeit als auch in der Lösung quantitativ. Die benutzten Salzlösungen waren 1/10 M NaCl-, 1/10 M CaCl₂- und 1/10 M Na₂SO₄-Lösungen.

Am Anfang wurden die Kation und die Anion der Kapselflüssigkeit der Eier, die schon im Leitungswasser bis zur Sättigung Wasser aufgenommen hatten, und die der Lösung (obengenannten Salzlösungen) bestimmt. Dann wurden 10–12 Eier aus demselben Eisack mit redest. Wasser gut gewaschen, danach in 200–240 cc Salzlösung eingetaucht. Nach je 1, 2, 3 und 5 Stunden wurde die Kapselflüssigkeit von 2–3 Eiern gesammelt, und die Konzentration der Kationen und Anionen bestimmt.⁷⁾ Gleichzeitig wurden auch immer die Ionen der Salzlösung bestimmt.

7) Die Bestimmungsmethode ist folgende.

Na⁺ wird als Natriumpyroantimonat ausgefällt, und dann das Antimon im Niederschlag jodmetrisch bestimmt.

Ca⁺⁺ wird zuerst als Oxalat ausgefällt, mit verdünnter Schwefelsäure wieder aufgelöst, und überschüssige Kaliumpermanganatlösung hinzugefügt, dann der Überschuss von KMnO₄ jodmetrisch bestimmt.

Cl⁻ wird in gewöhnlicher Weise mit Silberchloridlösung titriert.

SO₄⁼⁼ wird mit überschüssiger Bariumchloridlösung gefällt und der BaCl₂-Überschuss unter Verwendung von Na-Rodizonat als Indikator zurücktitriert.

Die analytischen Resultate sind in Tabelle 3. A zusammengefasst. In allen Salzlösungen stimmte die Konzentration der Kationen (Na^+ und Ca^{++}) und der Anionen (Cl^- und SO_4^{--}) der Kapselflüssig-

Tabelle 3

Permeabilität der Kapsel für die Ionen.

A.

Tem.	Zeitdauer in St.	Das äusser. Med.	Na. in mg per cc		Cl in mg per cc	
			im äusser. Med.	in d. Kapsel- flüss.	im äusser. Med.	in d. Kapsel- flüss.
19-20°C	0	M/10 NaCl- Lös.		0.09		0.03
	1	„	2.25	2.10	3.37	3.05
	2	„	2.28	2.35	3.37	3.35
	3	„	2.27	2.27	3.42	3.39
	5	„	2.23	2.23	3.40	3.35

			Ca in mg per cc		Cl in mg per cc	
			im äusser. Med.	in d. Kapsel- flüss.	im äusser. Med.	in d. Kapsel- flüss.
19-20°C	0	M/10 CaCl_2 - Lös.		0.04		0.02
	1	„	3.54	3.10	6.48	5.56
	2	„	3.53	3.45	6.48	6.18
	5	„	3.54	3.54	6.42	6.42

			Na in mg per cc		SO_4 in mg per cc	
			im äusser. Med.	in d. Kapsel- flüss.	im äusser. Med.	in d. Kapsel- flüss.
18-19°C	0	M/10 Na_2SO_4 - Lös.		0.07		0.38
	1	„	4.73	4.17	9.36	7.94
	2	„	4.72	4.54	9.37	9.22
	5	„	4.69	4.68	9.56	9.56

Die Werte sind Durchschnitte von den drei Bestimmungen.

B.

Temp.	Zeitdauer in St.	Init. äusser. Med.	Anionen u. Kationen in mg per cc	
			im äusser. Med.	In d. Kapselflüss.
18-22°C	15	M/10 NaCl- Lös.	0.55 mg Na	0.52 mg Na
			0.83 mg Cl	0.85 mg Cl
"	"	M/10 CaCl ₂ - Lös.	1.16 mg Ca	1.33 mg Ca
			1.88 mg Cl	1.88 mg Cl
"	"	M/10 Na ₂ SO ₄ - Lös.	0.65 mg Na	0.68 mg Na
			1.57 mg SO ₄	1.50 mg SO ₄

Die Werte sind Durchschnitte von den drei Bestimmungen.

keit mit der des Milieus wenigstens nach 5 Stunden fast vollkommen überein. Diese Tatsache zeigt deutlich, dass die Ionen fast ungehindert durch die Eikapsel hinein diffundieren. Dass die Ionen mit gleicher Leichtigkeit auch in der entgegengesetzten Richtung, d.h. vom innen nach aussen, die Eikapsel durchdringen können, wurde durch das folgende Experiment klar bewiesen. Man liess in 200 cc redest. Wasser 10 Eier eintauchen, die zuvor in 200 cc Salzlösung 6 Stunden lang eingetaucht worden waren, und nach 15 Stunden wurden die Ionen in der Kapselflüssigkeit und im Milieu quantitativ bestimmt. Wie das Ergebnis in Tabelle 3 B zeigt, ist nach 15 Stunden die Konzentration der Ionen der Kapselflüssigkeit fast gleich mit der im Milieu.

Die Permeabilität der Eikapsel für die Farbstoffe Congorot (sauer), Congorubin (sauer) und Methylenblau (basisch) wurde auch studiert. Alle diese Farbstoffe permeieren auch leicht durch die Eikapsel.

Aus den oben beschriebenen Tatsachen können wir uns vorstellen, dass die Eikapsel eine ziemlich grobmaschige Membran ist und das Wasser nicht infolge der osmotischen Druckdifferenz zwischen der Kapselflüssigkeit und dem Milieu in den Kapselraum hinein diffundiert.

V

Ogleich die Eier, die schon bis zur Äquilibration Wasser aufgenommen haben, in die konzentrierte *p. ä. S.* (1/5 M) eingetaucht

wurden, fand noch nach 50 Stunden kaum eine Veränderung an dem Eigewicht statt. Dagegen wurde beim Eintauchen in dünne Albuminlösung (Serumalbumin) eine deutliche Erniedrigung des Eigewichts beobachtet (Tabelle 4), und die Eikapsel dieser Eier

Tabelle 4

Der Einfluss der Salz- und der Albuminlösungen auf das Gewicht der Eier, die bis zum Maximum Wasser aufgenommen haben. (Temp. 18-15°C)

Ei Nr.	Med.	Init. Gewicht in g	Gewicht nach 50 St. in g
10	1/5 p. ä. S.	1.92±0.038	1.86±0.036
10	Alb. Lös.	1.93±0.015	1.08±0.009

schrumpfte zusammen. Das ist natürlich nur in dem Falle möglich, dass die Eikapsel für Protein ein höhere Impermeabilität hat. In diesem Falle wird der Kapsel Flüssigkeit Wasser durch den höheren kolloidosmotischen Druck der Albuminlösung entzogen. Infolgedessen muss eine Gewichtsabnahme des Eies in dieser Albuminlösung stattfinden. Nach dieser Annahme ist die oben erwähnte Tatsache selbstverständlich. Daraus ist vorauszusehen, dass die Kapsel Flüssigkeit eine nicht diffundierbare osmotisch aktive, kolloidale Substanz, vielleicht Protein, enthält.

Sodann hat der Verfasser einige Proteinreaktionen an der Kapsel Flüssigkeit unternommen. Als Farbreaktion wurden Xanthoprotein-, Biuret-, Sulphur- und Molischreaktionen ausgeführt. In dem Resultat gaben alle Reaktionen deutlich positive Ergebnisse. Je frischer die Eier sind, desto deutlicher tritt diese Farbreaktion auf. Weiterhin wurden die Fällungsreaktionen parallel geprüft. Bleiacetat und Ammonsulfat riefen Niederschlag in der Kapsel Flüssigkeit hervor. Und durch Hinzufügung einer grossen Menge von Äthylalkohol trat die Fällung auf. Weiter entstand auf Zusatz von Essigsäure eine Trübung, die beim Überschuss der Essigsäure wieder gelöst wurde.

Aus diesen Resultaten der Proteinreaktionen geht ohne Zweifel das Vorhandensein von Protein in der Kapsel Flüssigkeit hervor.

Neulich hat Richards (40) durch qualitative Prüfung bewiesen, dass das in der Kapsel Flüssigkeit des Eies von *Ambrystoma punc-*

tatum enthaltene Protein, Musin ist. Aber durch meine einfache Prüfung wird die Art des Proteins nicht bestimmt. Jedoch daraus, dass das Protein in der Kapselflüssigkeit des *Hynobius*-Eies in der Kälte durch Essigsäure ausgefällt wird und beim Überschuss der Essigsäure der Niederschlag löslich ist, ist wenigstens zu vermuten, dass das Protein ein Glycoproteide ist.

VI

Wie in dem letzten Paragraph klar ersichtlich ist, nimmt das Ei Wasser auf, trotzdem die Eikapsel eine höhere Permeabilität für die Krystalloide hat, und zwar ist an den Eiern, die schon bis zur Sättigung Wasser aufgenommen haben, die Eikapsel ziemlich straff gespannt. Wird ein Loch künstlich in eine solche gespannte Eikapsel gebohrt, so fließt die Kapselflüssigkeit schnell durch das Loch aus, und dabei schrumpft die Kapsel infolge ihrer Elastizität zusammen.

Daraus geht schon hervor, dass die Eikapsel gegen ihre Elastizität, durch eine Kraft vom Innen erweitert wird, und dass an dem mit Wasser gesättigten Ei die Elastizität der Kapsel und die innere Kraft einander das Gleichgewicht halten. Aus der obigen Tatsache, nämlich, dass Protein in der Kapselflüssigkeit enthalten ist, das nicht imstande ist, durch die Kapsel zu diffundieren, wurde vorausgesehen, dass Wasser von der osmotischen Kraft der Kapselflüssigkeit, die auf die Proteine hauptsächlich zurückzuführen ist, aus der äusseren Umgebung aufgesaugt wird. Wenn das der Fall ist, muss zwischen dem Grad der Wasserabsorption und der Grösse des kolloidosmotischen Druckes der Kapselflüssigkeit eine Beziehung bestehen.

Darum hat der Verfasser direkt untersucht, wie der kolloidosmotische Druck der Kapselflüssigkeit von den in obigen Experimenten gebrauchten Lösungen beeinflusst wird.

Für die Bestimmung des kolloidosmotischen Druckes wurde die erste Methode von Krogh und Nakazawa angewandt, in welcher die Kollodiummembran als Diaphragma benutzt wird.⁸⁾

8) Wenn die Eikapsel als Diaphragma im Osmometer benutzt werden könnte, so wäre das ideal. Das ist aber unmöglich, da sie zu zart ist. Natürlich ist die Eigenschaft der Eikapsel von der der Kollodiummembran verschieden. Aber die benutzte Kollodiumtasche und die Eikapsel haben das Gemeinsame, dass beide Membranen für Krystalloide und Wasser sehr durchlässig sind und nur Protein durch sie nicht permeieren kann. Deshalb sind wir sicher, dass wenigstens in Bezug auf die kolloidgelösten Stoffe die beiden Membranen als Diaphragmen ganz gleich wirken.

Das Osmometer ist sehr einfach gebaut. Es besteht aus einer Glaskapillare (170 mm lang, ca. 4 mm äusserer Durchmesser, 0,5 mm lichte Weite), einer Kollodiumtasche (reagenzglasförmig), einem kleinen Reagenzglas, dessen Durchmesser ein wenig grösser als der der Kollodiumtasche ist, und einem Schutzreagenzglas. Bei der Bestimmung wird die Kollodiumtasche mit der Kapsel­flüssigkeit ganz ausgefüllt und mit dem unteren Ende der Kapillarröhre durch einen kurzen Gummischlauch verbunden, wodurch die Kapsel­flüssigkeit in der Kapillare aufsteigt. Die Kollodiumtasche wird dann völlig in die Lösung (*p.ä.S.* oder Saccharose-Lösung) eingetaucht, die in das kleine Reagenzglas gefüllt ist, wobei die Kapillarröhre in einer bestimmter Lage am Schutzreagenzglas durch einen Gummipropf senkrecht gehalten wird. Gleich nach dieser Behandlung wird der Gummischlauch am oberen Ende der Kapillarröhre mit einer Klemme fest geschlossen und dann wird das Osmometer in das Wasserbad (bei Zimmertemperatur 18–16°C) eingehängt. Nach bestimmter Zeitdauer wird das obere Ende der Kapillarröhre durch einen dicken Gummischlauch mit dem Wassermanometer verbunden, und die Klemme wird geöffnet. Nach Öffnung der Klemme reguliert man vorsichtig das Manometer, damit der Meniskus in der Kapillare an der ursprünglichen Stelle stationär bleibt. Die Ablesung der Bewegung des Meniskus wird mit Hilfe eines Mikroskops vorgenommen. Dann können wir den kolloidosmotischen Druck folgendermassen berechnen.

Manometer-Wert in mm + (Länge der Wassersäule in der Kapillare in mm – Kapillarität in mm) = kolloidosmotischer Druck in mm H₂O.

Die Kollodiumtasche wird nach der Krogh'schen Methode aus 8% Kollodiumlösung in einem Gemisch, das aus Alkohol und Äther zu gleichen Teilen hergestellt ist, gemacht.⁹⁾ Die Trocknungsdauer bei der Herstellung war genau 5 Minuten unter 15,5°C.

Für die gebrauchbare Kollodiumtasche sind die folgenden Bedingungen absolut nötig: Wasser und Krystalloide permeieren ungehindert durch die Membran, aber für Proteine in der Kapsel­flüssigkeit ist sie ganz impermeabel. Bei der von uns gebrauchten

9) Über die Technik der Herstellung der Kollodiumtasche gab mir Herr Dr. F. Nakazawa, von der Universität zu Sendai, erschöpfende Auskunft. Hier möchte ich meinen persönlichen Dank für seine Freundlichkeit ausdrücken.

Kollodiumtasche waren diese Bedingungen praktisch erfüllt. Die Bestimmung der Undurchlässigkeit für Protein wurde derart durchgeführt, dass die Kollodiumtasche mit der frischen Kapsel­flüssigkeit ganz gefüllt und am unteren Ende der Glaskapillare mit einem Gummischlauch verbunden wird und dann unter 400 mm Wasser­druck für 90 Minuten in dest. Wasser stehen gelassen wird. Danach werden die Proteinreaktionen der Innenflüssigkeit (Kapsel­flüssigkeit) und die der Aussenflüssigkeit (dest. Wasser) geprüft. Die Permeabilität für Salze wurde folgendermassen durchgeführt. Man tauchte eine Kollodiumtasche, die mit redest. Wasser ausgefüllt und dann mit dem unteren Ende der Kapillare durch einen kurzen Gummischlauch verbunden worden war, in die Salzlösung ein. Und nach einigen Stunden wurde die Salzkonzentration der inneren Flüssigkeit bestimmt. Damit sich weiter in derselben Zeitdauer das Gleichgewicht einstellt, muss man die Wasserpermeabilität der Kollodiumtasche auf einem bestimmten Grad festhalten. Immer wurden die Kollodiumtaschen unter den gleichen äusseren Bedingungen präpariert, ihre Wasserpermeabilität aber zeigte eine ziemliche Variation. Daher wurden die geeigneten Taschen unter vielen ausgewählt. Die Wasserpermeabilität wird durch diejenige Zeit (in Minuten) bestimmt, die 100 cc Wasser brauchen, um durch 100 qcm Filterfläche bei 1 Atm Druckdifferenz zu filtrieren. In dieser Untersuchung wurden nur Kollodiumtaschen mit Minutenzahlen von ca. 40 gebraucht. Das Gleichgewicht wird gewöhnlich in 6–7 Stunden erreicht, aber in praktischen Bestimmungen wurde der Druckwert nach 20 Stunden genommen.

Die Kollodiumtasche ist so klein, dass wir für eine Bestimmung ca. 0.25 cc Innenflüssigkeit (Kapsel­flüssigkeit) und etwa 0.1–0.12 cc Aussenflüssigkeit benötigen. Die Menge der Kapsel­flüssigkeit, die von einem frischen Ei aufgenommen werden kann, beträgt nur 0.02–0.03 cc, so dass, um eine genügende Menge für eine Reihe von Bestimmungen zu bekommen, die Kapsel­flüssigkeit von vielen Eiern gesammelt werden muss. Zum Vergleich der Werte untereinander, wurde wenigstens für eine Reihe von Experimenten immer dasselbe Gemisch von Kapsel­flüssigkeit benutzt. Infolgedessen können wir individuelle Unterschiede nicht finden.

In Tabelle 5 werden die Werte des kolloidosmotischen Druckes der Kapsel­flüssigkeit unter verschiedenen Bedingungen zusammen­gestellt. Bei der Salzlösung wird er deutlich grösser mit abnehmen-

Tabelle 5.

Der Einfluss der Salz- und der Saccharoselösung auf den kolloidosmotischen Druck der Kapsel Flüssigkeit. (Temp. 18–16°C)

A. gegen *p. ä. S.*

K. O. D. in mm Wasser	Konz. in M.	1/5	1/20	1/80	1/320
	Ser.				
	I	217	287	423	623
	II	237	301	428	559
	III	157	190	266	356
	D. S.	204	259	374	513

B. gegen Saccharoselösung¹⁰⁾

Konz. in M.	1/5	1/20	1/80	1/320
K. O. D. in mm Wasser	258	275	265	283
	292	267	299	266
D. S.	275	271	282	275

der Konzentration, wobei der Wert in jeder Serie noch in derselben Konzentration verschieden ist (A in Tabelle). Diese Verschiedenheit nach der Serie beruht darauf, dass das gebrauchte Gemisch von Kapsel Flüssigkeit in jeder Serie von den Eiern eines anderen Weibchens stammt. Dagegen, in dem Falle, in welchem die Saccharoselösung als Aussen Flüssigkeit verwandt wurde, wurde der kolloidosmotische Druck keiner Veränderung unterworfen. Also, von der physiologisch äquilibrierten Salzlösung und von der Saccharoselösung wird der kolloidosmotische Druck in derselben Weise wie die Wasserabsorption des Eies beeinflusst. Nämlich es ergibt

10) Der Unterschied der Werte des kolloidosmotischen Druckes bei Saccharose-Lösung gegen die bei *p. ä. S.* beruht darauf, dass die Kapsel Flüssigkeit vor der Messung mit redest. Wasser zweifach verdünnt worden ist.

sich, dass der Grad der Wasserabsorption immer in Proportion zu der Grösse des kolloidosmotischen Druckes der Kapselflüssigkeit steht.

VII

Die Eikapsel des *Hynobius*-Eies hat eine hohe Permeabilität für Wasser und auch für Krystalloide, dennoch ist die Kapsel des Eies, das eine genügende Menge von Wasser aufgenommen hat, ziemlich gespannt. Wird ein solches Ei in konzentrierte Salzlösung eingetaucht, so tritt kaum eine Veränderung im Gewicht ein, aber in der Albuminlösung nimmt das Gewicht deutlich ab. Das lässt sich darauf zurückführen, dass durch den höheren kolloidosmotischen Druck der Albuminlösung Wasser der Kapselflüssigkeit abgezogen wird, da die Kapsel für Protein ganz impermeabel ist. Durch diese Tatsachen wird der Gedanke nahe gelegt, dass in der Kapselflüssigkeit eine durch die Kapsel nicht diffundierbare osmotisch aktive Substanz vorhanden ist, und infolgedessen die Kapselflüssigkeit einen gewissen auf dieser Substanz beruhenden kolloidosmotischen Druck besitzt, und weiter, dass Wasser durch den kolloidosmotischen Druck in den Kapselraum hinein diffundiert. Diese Ansicht wird durch das folgende klar bewiesen. Einerseits übt die Salzlösung auf die Wasserabsorption des Eies mit steigender Konzentration eine deutlich hemmende Wirkung aus, jedoch erfährt die Wasserabsorption durch die Saccharoselösung keine Beeinflussung. Andererseits erniedrigt sich der kolloidosmotische Druck der Kapselflüssigkeit solcher Eier in der Salzlösung mit steigender Konzentration, dagegen erscheint bei der Saccharoselösung in allen Konzentration immer fast der gleiche Druckwert. Nämlich der kolloidosmotische Druck der Kapselflüssigkeit und die Wasserabsorption des Eies werden durch Salz- und Saccharoselösungen in ganz gleicher Weise parallel beeinflusst. In anderen Worten ist der Grad der Wasserabsorption abhängig von der Grösse des kolloidosmotischen Druckes der Kapselflüssigkeit. Aus diesen Tatsachen wird der Schluss gezogen, dass die Wasserabsorption eine Folge von der kolloidosmotischen Kraft der Kapselflüssigkeit ist. Bis die Elastizität der Kapsel dieser osmotischen Kraft das Gleichgewicht hält, wird von dieser Kraft Wasser von der Umgebung durch die Eikapsel in den Kapselraum aufgesaugt.

Nach meiner einfachen Untersuchung ist die Eigenschaft der kolloidalen Substanz in der Kapselflüssigkeit, auf der der kolloid-osmotische Druck beruht, noch unbekannt. Die Substanz ist jedoch vermutlich eine Art Protein (vielleicht Proteide).

Andrerseits sind über die Abhebung der Befruchtungsmembran des Seeigeleies viele Untersuchungen schon gemacht worden (Loeb '08, Robertson '12, Hobson '27 und Runström '28 u.a.). Aus diesen Ergebnissen ist festgestellt worden, dass in dem Perivitellinraum eine osmotisch aktive, kolloidale Substanz vorhanden ist, infolgedessen Wasser von der Umgebung durch den kolloidosmotischen Druck aufgenommen wird und dann die Membranabhebung von der Eioberfläche folgt. Auch an dem Fischei (*Oryzias*) ist von Yamamoto ('39b) bewiesen worden, dass das Chorion (Eimembran) auch durch denselben Mechanismus abgehoben wird. Über den Ort im Ei, von dem diese kolloidale Substanz in den Perivitellinraum geliefert wird, wird jetzt noch diskutiert, doch stimmt man allgemein darin überein, dass diese Kolloide erst nach der Befruchtung oder Aktivierung des Eies in den Perivitellinraum geliefert oder frei gemacht werden.

An den oben erwähnten Eiern findet gleich nach der Befruchtung oder Aktivierung eine Änderung am Eicortex statt, und dieser Änderung folgt gleich die Membranabhebung (Runström '28, Moser '39a, '39b, '40 und Yamamoto '39a). Jedoch ist es noch ganz unklar, ob an dem *Hynobius*-Ei diese Veränderung an dem Eicortex nach der Befruchtung auftritt oder nicht. Aber das unbefruchtete Ei absorbiert Wasser ganz ähnlich wie das befruchtete. Wegen dieser Tatsache ist zu bedenken, dass die Abhebung der Kapsel von der Veränderung an dem Eicortex ganz unabhängig ist. Zwischen dem Chorion und der Kapsel des Oviducteies von *Hynobius* gibt es eine granulreiche dünne Gallert, aber wenn das Ei Wasser absorbiert, löst sich diese Gallert allmählich auf und wird schliesslich unsichtbar. Deshalb wird die osmotisch aktive, kolloidale Substanz nach der Befruchtung oder Aktivierung vom Ei selbst im Kapselraum nicht erst frei gemacht, sondern muss schon vor der Ablage vielleicht im Gallertzustande in dem Kapselraum vorhanden sein. Also in dieser Beziehung ist das *Hynobius*-Ei deutlich von den Eiern von Seeigel und *Oryzias* verschieden.

Die physiologisch äquilibrierte Salzlösung hat deutlich eine hemmende Wirkung bei grösserer Konzentration auf die Wasser-

absorption des Eies, welches noch nicht Wasser genug aufgesaugt hat, aber keine Wirkung auf den Wassergehalt des Eies, das bis zum Maximum Wasser schon aufgenommen hat. Doch muss die Erklärung dieser Erscheinung auch jetzt noch der weiteren Untersuchung überlassen bleiben.

Zusammenfassung

An den Eiern von *Hynobius retardatus* wurde der Mechanismus der Wasserabsorption studiert.

Das *Hynobius*-Ei ist mit einer weichen elastischen Kapsel umhüllt. Kommt das Ei mit Wasser in Berührung, so wird Wasser durch die Kapsel in den Kapselraum (Raum zwischen dem Chorion und der Eikapsel) allmählich aufgesaugt, und das hat die Kapselabhebung zur Folge. Die Kapsel des Eies, das bis zum Maximum Wasser schon aufgenommen hat, wird durch den inneren Wasserdruck ziemlich gespannt.

Diese Eikapsel ist sehr durchlässig für Wasser und Krystalloide aber für Protein nicht. Ausserdem ist in dem Kapselraum eine osmotisch aktive, kolloidale Substanz (Protein) vorhanden. Daraus ist der Schluss zu ziehen, dass Wasser vom kolloidosmotischen Druck auf rein osmotischem Wege absorbiert wird. Das wird durch die Tatsache noch klarer bewiesen, dass der Grad der Wasserabsorption und die Grösse des kolloidosmotischen Druckes beide durch physiologisch äquilibrierte Salz- und Saccharoselösungen ganz parallel beeinflusst werden. Nämlich der Grad der Wasserabsorption steht immer in Proportion zu der Grösse des kolloidosmotischen Druckes der Kapsel Flüssigkeit.

Das osmotisch aktive Kolloid wird nach der Befruchtung in den Kapselraum nicht erst frei gemacht, sondern muss schon vor der Ablage vielleicht im Gallertszustande im Kapselraum vorhanden sein.

Literatur

- AOKI, K. 1939. Über die Wasseraufnahme der Lachseier. I. J. Fac. Sci. Hokkaido Imp. Univ. Ser. VI (Zool.), vol. 7, p. 27.
- HOBSON, A. D. 1927. A study of the fertilization membrane in the echinoderms. Proc. Roy. Soc. Edinb., vol. 47, p. 94.
- KROGH, A. u. F. NAKAZAWA 1927 Beiträge zur Messung des kolloidosmotischen Druckes in biologischen Flüssigkeiten. Biochem. Ztschr. Bd. 188, S. 241.

- LOEB, J. 1908 Über die osmotische Eigenschaft und die Entstehung der Befruchtungsmembran beim Seeigelei. Arch. f. Ent.-Mech. Bd. 26, S. 82.
- MOSER, F. 1939a Studies on a cortical layer response to stimulating agents in *Arbacia* egg. I. Response to insemination. J. exp. Zoöl., vol. 80, p. 423.
- 1939b Studies on a cortical layer response to stimulating agents in *Arbacia* egg. II. Response to chemical and physical agents. J. exp. Zoöl. vol. 80, p. 447.
- 1940a Studies on a cortical layer response to stimulating agents in *Arbacia* egg. III. Response to non-electrolytes. Biol. Bull. vol. 78, p. 68.
- RICHARDS, O. W. 1940 The capsular fluid of *Ambrystoma punctatum* eggs compared with Holtfreter's and Ringer's solutions. J. exp. Zoöl., vol. 83, p. 401.
- ROBERTSON, T. B. 1912. Studies in the fertilization of the egg of a sea-urchin (*Strongylocentrotus purpuratus*) by the blood sera, sperm, sperm-extract and other fertilizing agents. Arch. f. Ent.-Mech. Bd. 35, S. 64.
- RUNSTRÖM, J. 1928. Die Veränderungen der Plasmakolloide bei der Entwicklungserregung des Seeigeleies. Protapl. Bd. 4, S. 388.
- TAKAMATSU, M. 1935 Zur Kenntnis der Embryochemie des *Hynobius*. J. Bioch., vol. 22, p. 203.
- TOMITA, M. u. H. FUJIWARA 1933 Beiträge zur Embryochemie der Amphibien. J. Bioch., vol. 17, p. 401.
- YAMAMOTO, T. 1939a Changes of cortical layer of the egg of *Oryzias latipes* at the time of fertilization. Proc. Imp. Acad. Tokyo, vol. 15, p. 269.
- 1939b Mechanism of membrane elevation in the egg of *Oryzias latipes* at the time of fertilization. Proc. Imp. Acad. Tokyo, vol. 15, p. 272.
-