



Title	エゾサンセウウヲ卵の過冷却について
Author(s)	酒井, 昭; SAKAI, Akira
Citation	低温科学, 5, 109-114
Issue Date	1950-12-25
Doc URL	<a href="https://hdl.handle.net/2115/17477">https://hdl.handle.net/2115/17477</a>
Type	departmental bulletin paper
File Information	5_p109-114.pdf



## エゾサンセウウヲ卵過冷却に就いて\*

酒 井 昭

(低温科学研究所生物學部門)

(昭和23年5月受理)

### I

兩棲類の卵の發生に及ぼす低温度の影響に就いての研究は古く Hertwig (1898) 及び Morgan (1902) 以來殆んど行はれて居ない。

Hertwig は *Rana fusca* (適温  $22^{\circ}\text{C}\sim 24^{\circ}\text{C}$ ) の卵を使つて  $9^{\circ}\text{C}$  で受精させ  $7^{\circ}\text{C}$  から次第に  $1.5^{\circ}\text{C}$ 迄冷やした卵は  $1.5^{\circ}\text{C}$ の中では殆んど死んで了ひ、 $2.5\sim 4^{\circ}\text{C}$ でも又 *Morula*の時期で多く死んだ事を報告して居る。Morgan は *Rana palustris*の色々な發生段階の卵を冷蔵庫中で  $0^{\circ}\text{C}$ に冷やした。其の結果 1~2細胞の時期では分割は行はれないで2~3日中に死ぬが *Blastula*の時期の卵は數週間後に異常となつてくる。*Gastrula*の時期では良く低温度に耐え非常に徐々ではあるが發生が進む。それ以後の時期の卵は一ヶ月以上良好な状態で徐々に發生が進む。そしてそれを室温にかえすと正常な發生を行つてオタマジヤクシとなる。然しながら *Rana temporaria*の卵では假令初期分割卵でも、この程度の低温度は何等の悪影響も與えない。更に Morgan は早い時期に産卵する種類のものほど低温度に強い。即ち雪融後間もなく産卵する *Rana temporaria*は最も強く、之から一ヶ月後に産卵する *palustris*の卵は非常に弱い事、又同一種類の卵に就いては發生の進展するに従つて次第に低温に對する抵抗性が強くなる事を述べている。

然し低温といつても、以上の實驗に用ひられた温度範圍は皆氷點以上である。卵がその氷點以下の温度にさらされて過冷却状態になつた場合、そこに如何なる變化が現はれるかと云ふ事に就いての報告は今迄全くない。

一方生體の過冷却状態は又多くの未解決の問題を含んで居るものである。そこでエゾサンセウウヲの卵を用ひて、過冷却が卵の發生に如何なる影響を及ぼすものかを調べたので其の結果を報告する。

用ひた材料はエゾサンセウウヲ (*Hynobius retardatus*) の卵で野外で自然状態で産卵されたものを用ひた。

同一腹の卵は 60~80 個であるが同一腹卵でも發生の進度に相當な變異があるから同一系

\* 北海道大學低温科學研究所業績 第90號

列の實驗に同一腹卵を使う事は出来なかつたので、同一lotの内同じ發生段階の卵は同一lotのものであるが、發生段階が異るとlotも亦異なる事になる。

卵は卵殻から取出し卵膜をつけたまま實驗に供した。媒體としては流動パラフィンが最も適しているがサンセウウラの軟かい卵に対しては不便の點が多いので以下の實驗では媒體として蒸留水を用いた。古い蒸留水は比較的過冷却が短時間で破れ易いため、豫め蒸留水を充分煮沸して冷してから使用した。

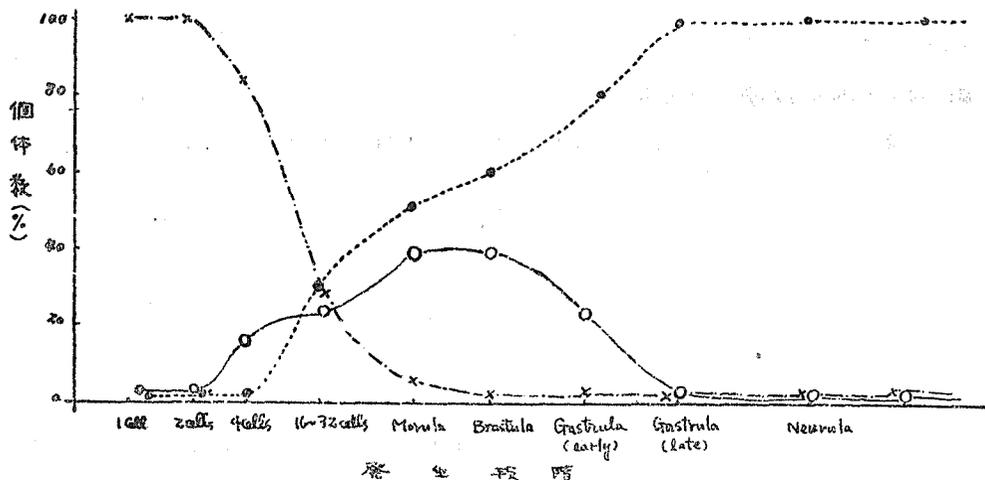
小さい管瓶(外徑1.5cm, 長さ4cm)の中に蒸留水を入れ、ガラス綿で卵がガラス管壁に接しない様に水の中に支持した。低温室中の低温箱の中で $-3^{\circ}$ 、 $-6^{\circ}$ Cの各温度に冷却速度 $0.09^{\circ}$ C/分(零度附近に於ける)で徐々に冷した。蒸留水が上記の温度になつてから後2時間置いて温度を徐々に上昇させ静に取出しシャーレに各發生段階毎に分けて $10^{\circ}$ Cの水道水中で飼育して、以後の發生状態を観察した。同一發生段階に就いて約20個の卵を飼育した。この卵の水點は約 $-0.48^{\circ}$ Cで發生各段階を通じて殆んど同一である。

## II

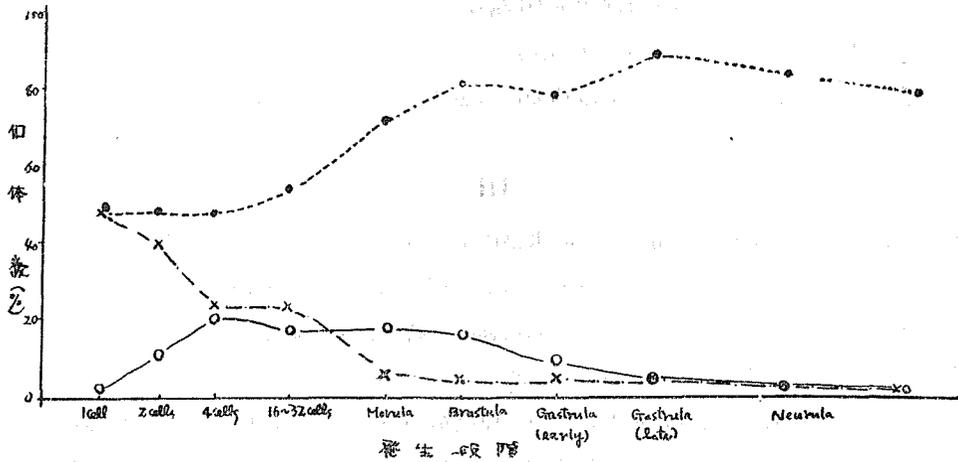
結果は第一、二圖に總括してある。

第一圖は $-6^{\circ}$ Cに第二圖は $-3^{\circ}$ Cに過冷却した場合の結果を示したが、両者は大體同様の傾向を示して居るので $-6^{\circ}$ Cの結果を主に述べる。

初期分割卵殊に1~4細胞期の卵は低温に依つて受ける影響が大きい。低温處理後、發生は全て不規則で中には分裂を中止する卵もあるが多くは不規則な分裂を續けて invagination が起らないで死んで了ふ。



第1圖 發生各段階の卵を $-6^{\circ}$ Cに2時間過冷却した時の影響  
 ● 對照卵と同様に孵化した卵  
 × Gastrulation 前に死んだ卵  
 ○ 不規則な Gastrulation をへて出來た畸形(孵化しないで死ぬ)



第 2 圖 發生各段階の卵を  $-3^{\circ}\text{C}$  に 2 時間過冷却した時の影響  
 ● 対照卵と同様に孵化した卵  
 × Gastrulation 前に死んだ卵  
 ○ 不規則な Gastrulation を経て出来た畸形 (孵化しないで死ぬ)

16~32細胞期から Morula の段階の卵は未だその影響が大きく不規則な分裂をなし invagination が起らないで死ぬ卵と、不規則な invagination を行つて不規則な Neurula を経て死ぬ卵とがある。

然し一部の卵は正常分裂を行つて孵化するものもある。

Blastula~early Gastrula の時期は非常に影響が少く、gastrulation 前に死ぬ卵は見られない。

一部の卵は不規則な Gastrula Neurula を経て畸形のまま、發生を続け盛に纖毛運動を行ふが間もなく死ぬ。然し多くの卵は正常に孵化する。

late Gastrula 以後の卵はこの程度の低温度では何等の影響を受けないで正常に孵化する。

猶  $-3^{\circ}\text{C}$ 、2 時間過冷却した場合は第 2 圖に示してある様に結果は  $-6^{\circ}\text{C}$  と同様で唯その影響が  $-3^{\circ}\text{C}$  の場合は少いに過ぎない。

未受精卵を  $-3^{\circ}\text{C}$ 、2 時間過冷却状態 (流動パラフィン中にて) に置いてから媒精したが対照と同様な受精率を示したし、以後の發生狀況も対照と比して差は認められなかつた。

未受精卵が各種の不利な條件に對して強い抵抗性を示す事は兩棲類の卵に就いても 2~3 の報告がある。

以上の結果から發生の進展と共に低温度に對する抵抗性は漸次増加し、gastrulation 以後はこの程度の低温度及時間では全く影響を受けない。

過冷却した卵を水道水中に入れた時假令不規則でも、ある程度分裂が進んでから發生を中止するか、或は更に不規則な分裂を續行する事はあるが、全く分裂を進めないで水道水中で短時間内に死ぬ場合はなかつた。即ち少くとも一次的には過冷却自体はこの卵に對して致

死的とならない。その二次的影響は發生の段階によつて異つてゐる。之に反して凍結した卵は例外なく水道水中で白變し死んで了つた。

猶孵化日數、孵化の際の外観は過冷却卵、對照卵の間には差が認められなかつた。

### III

低温度自體が卵に如何に作用するか。氷點以下に冷やしても、過冷却状態にある限り凍結は考へる必要がない。斯様な低温度では當然卵内の全ての生理的活動は停止し、従つて發生も停止してゐると思はれる。この生理的活動の一時的停止が過冷却された卵の以後の各種の影響の重大なる原因となつてゐると考へられる。

では何故この發生の一時的停止といふ同一原因が卵の發生段階に依つて異つた影響を與へるのであろうか。まず果して發生の停止が低温作用の内容であるかの點を考へてみたい。低温以外の他の方法即ち無酸素状態、麻醉、他の化學的藥品例へば KCN 等に依つて發生を停止させた時果して同一の結果が生ずるであらうかどうかを確めなければならない。兩棲類の卵では無酸素状態、麻醉等の方法で發生を停止させ以後の影響を調べた報告はない様であるが、魚卵では Stockard (1921) がメダカ、マスの卵で詳細に調べてゐる。その結果は同一發生段階の卵を低温度 (0°C 以上) と無酸素状態に置いた時同一の畸形が生じた事を報告してゐる。

更に異なる方法で何故この様な同一の結果を生ずるか、又發生段階に依つて何故同一原因によつて生ずる結果が異なるかを次の様に説明してゐる。温度が降下した場合二つの場合が考へられる。

- ① 發生が完全に停止しないでその速度が減少した時
- ② 發生が完全に停止した時

彼は前者の場合は卵の各部分、或は各器官はその發生速度を減少するが、各部分の速度勾配を保ちながら非常に徐々に發生を繼續してゐる。後者の場合は發生が完全に停止するから卵内の速度勾配は零になる。その状態がある時間繼續する時は再び良好なる状態が與へられても、もはや正常な場合の速度勾配を再び得る事が出来ないから、以後の發生は異常となつて發生を中止するか、或は畸形を生ずる。次に發生段階によつてその影響の異なる事に就いては、この様な發生速度の低下又は停止が起るその時期が重大なる關係を有してゐる。即ち卵の各部分、或は各器官の發生速度の差が大きい時はその受ける影響が大きく、差の小さい時はその影響も少いと説明してゐる。彼は前者を *critical stage*、後者を *indifferent stage* と呼んだ。之は勿論動物の種類によつて差があるが大體同じ傾向を持つてゐる。魚卵に就いては *gastrulation* に先立つ時期殊に發生初期が *critical* で發生を停止させると以後の發生を停止するか、又は異常となる。*gastrulation* 開始以後、殊に *gastrulation* 完了後は非常に

\* 發生が停止すると何故再び初速度勾配を得る事が出来ないかに就いては何も述べてゐない。

強い時期であると述べてゐる。この事實は兩棲類の卵で行つた Hertwig, Morgan 及本實驗の結果とよく一致してゐる。然しながら之丈の實驗事實から直に Stockard の説を認め難い。

King(1903), Krough(1914), は兩棲類の卵で高温に對する抵抗性を調べたが、發生段階と共に高温に對する抵抗性の増大する事を認めてゐる。

又卵内の速度勾配が發生初期に於て最大であるかどうか。低温以外の他の方法で發生を停止させたとき低温の場合と同様な結果が生ずるかどうかを確めなければならない。

### 摘 要

1. エゾサンセウウヲの卵を使つて $-3^{\circ}\text{C}$ ,  $-6^{\circ}\text{C}$ に冷却速度  $0.09^{\circ}\text{C}/\text{分}$ で平衡後2時間過冷却状態に置いて以後の發生の状況を調べた。
2. 過冷却自體は卵にとつて致死的ではないが二次的に發生段階によつて異つた影響を及ぼす。
3. 發生の進展と共に受精卵の低温度に對する抵抗性は増加する。gastrulationに先立つ時期特に發生初期は critical stage である。

之に反して gastrulation 開始以後は非常に抵抗性が強く用ひた条件下では何等の影響を受けなかつた。

4. 未受精卵を過冷却後媒精したが對照と同様な受精率を示した。猶正常に孵化した。
5. 各發生段階の卵を通じて孵化した卵の孵化日數、孵化時の外觀は過冷却卵と對照卵の間には差を認められなかつた。

最後に本研究に於て種々御指導を賜つた青木教授に對して感謝の意を表す。

### 文 献

- Hertwig, O. 1897 Ueber den Einfluss der Temperatur auf die Entwicklung von Rana fusca und Rana esculenta. Arch. f. mik. Anat., **51**, 319.
- Morgan, T.H. 1902 The relation between normal and abnormal development of the embryo of the frog, as determined by injury to the yolk portion of the egg. Arch. Ent.-Mech., **15**, 269.
- King, H. D. 1903 The effects of heat on the development of the Toad's egg. Biol. Bull., **5**, 218.
- Krough, A. 1914 On the influence of the temperature on the rate of embryonic development. Zeitsch. f. allg. physiol., **16**, 163.
- Stockard, C. P. 1921 Structure and developmental rate. Amer. Jour. Anat., **28**, 115;
- Needham, J. 1931 Resistance to thermal injury. Chem. Emb., vol., **3**, 1389.

**R é s u m é**

The eggs of *Hynobius*, all over their development, were supercooled for two hours at  $-3^{\circ}$  and  $-6^{\circ}\text{C}$  in distilled water with the cooling rate of  $0.09^{\circ}\text{C}/\text{min.}$ , and then after having been reared in tap water, the effect of supercooling on the further development was studied.

- 1) Supercooling itself is not fatal, but has some different effects on the process of development, according to the developmental stages at which the eggs have been supercooled.
- 2) In earlier stages the eggs are found to be more sensitive to the low temperatures than in later stages.
- 3) There existed a critical period of high sensitivity to the low temperatures in the earlier cleavage, yet after the gastrulation the eggs became very resistant.
- 4) The unfertilized eggs are generally not injured by supercooling of  $-3^{\circ}\text{C}$  for 2 hrs, and eggs previously supercooled show the normal fertilizability and development.
- 5) The embryos which have been hatched from eggs previously supercooled, made no difference in duration of hatching and outward appearance with the control.