



| | |
|------------------|---|
| Title | 生物細胞の耐凍性に関係する一つの原形質的要因：ウニ卵細胞での観察 |
| Author(s) | 朝比奈, 英三; ASAHINA, Eizo; 丹野, 皓三 他 |
| Citation | 低温科学. 生物篇, 21, 61-69 |
| Issue Date | 1963-12-10 |
| Doc URL | https://hdl.handle.net/2115/17674 |
| Type | departmental bulletin paper |
| File Information | 21_p61-69.pdf |



生物細胞の耐凍性に関係する一つの原因質的要因*

— ウニ卵細胞での観察 —

朝比奈英三 丹野皓三

(低温科学研究所 生物学部門)

(昭和38年9月受理)

I.

生物細胞におこる凍害は細胞内凍結によるものと細胞外凍結によるものの二つに大別される¹⁾。細胞を媒液中に浮遊させた状態で凍らせる場合、その凍結過程の最初のごく短時間のうちにおこる凍死はほとんど細胞内凍結によるものと考えられる²⁾。媒液が凍りはじめてから以後の冷却速度を充分におそくすることによってこのような細胞内凍結はかなりおこりにくくなるが³⁾、細胞外凍結による凍害の要素を除くことは甚だむずかしい。

細胞外凍結による害の説明はいろいろあるが、現在では細胞の内外にある水溶液が脱水されたためにできる濃縮塩溶液による原因質の傷害であるとするもの⁴⁾、及び原因質構造自身からの脱水そのものによるもの⁵⁾の二つが広く知られている。この前者は赤血球の凍結保存の際グリセリンを媒液に加えると著しく凍害を軽減できる事実を説明するために考えられたもので⁶⁾、血液や精液の凍結の研究者には支持者が少なくない。

野外で発見される耐凍性の高い動物には昆虫が多いが、越冬している昆虫の中で耐凍性の高いものにはグリセリンを体内にもつものが少なくない。このため昆虫における凍害の機構は不明であるにしても、昆虫の耐凍性はその体内にあるグリセリンによるものであるとの説がある⁷⁾。しかし越冬昆虫を数多くしらべるにつれグリセリンをもたぬ昆虫にも耐凍性のあるものが発見され⁸⁾、又ある昆虫は多量のグリセリンをもちながら全く凍結にたえないことがわかって来た⁹⁾。

いっぽうイラが前蛹は秋にまゆに入った後に10°C付近の温度におかれるとその体内のグリコーゲンがグリセリンに変わってゆくが¹⁰⁾、この前蛹の耐凍性はグリセリン生成に先立って既に或程度高まっている。同じ前蛹では10°Cの恒温において一旦できたグリセリンが約50日後に減りはじめ更に40日位の間全く消失するが、この後も前蛹の耐凍性は或高き**にとどまっている¹¹⁾。そしてこの前蛹の体内では越冬期にも糖の含有量はグリセリンに比べてごく少なく且越冬期間中ほとんど変化がない¹⁰⁾。

これらの事実からみて、生物の耐凍性の主要因は、その生物体内でいわゆる Salt buffer と

* 北海道大学低温科学研究所業績 第653号

** -10°Cで1日間の凍結に耐えられる。

して働らく小分子物質の増減そのものではないように思われる。しかし昆虫のような複雑な動物は耐凍性の基礎的な機構をしらべるためには必ずしも好適な材料ではなく、この問題の解明には適当な細胞単位での実験が必要であった。われわれはウニの卵細胞を用いてその凍結過程や凍害の機構をしらべて来たが^{2),3),12),13)}、たまたまこの細胞で受精の直後にきわめて急速な耐凍性の増大があることを発見した¹⁴⁾。本文はこのようなウニ卵の性質を利用して、前記の問題に対する何等かの手がかりを得るために行なった一つの試みをのべたものである。

本実験にあたりウニ卵における SH 基の変動について東京都立大学の団勝磨教授、酒井彦一博士よりいろいろ有益な助言をいただいた。ここに厚く御礼申し上げたい。

II.

材料には北海道忍路海岸産のキタムラサキウニ *Strongyrocrototus nudus* を札幌の実験室に運んで使った。親ウニは通気させた海水に入れておくと水温 15°C 以下では約 1 週間はほとんど健全である。実験にあたって 0.5 M KCl 溶液を用いて放卵させ、得た卵を濾過した海水で数回洗ってから 2°C の冷蔵庫中におき、受精率が 90% 以上で正常に発生が進行するもののみを使用した。

III.

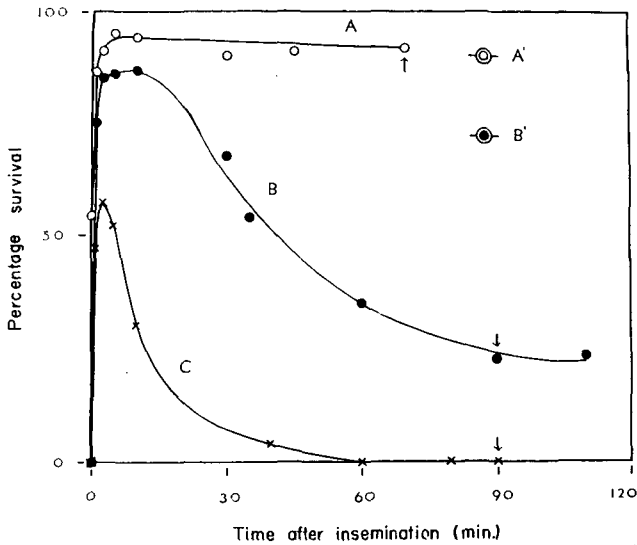
0.5 cc の卵細胞浮遊液 (少なくとも 1000 以上の卵細胞を含む) を直径 20 mm の試験管にとりそれぞれきめられた恒温の冷凍庫内で冷却した。冷凍庫内の気温は予備テストの結果 -20°C 乃至 -25°C をえらんだ。本実験の条件下では卵浮遊液はこれらの温度において何れも約 5 分以内に自発凍結した。まれに 5 分後にも凍りださない例があったのがそのときはごく少量の氷片をあたえて植氷した。又卵浮遊液の冷却速度を細い熱電対をその液中にさし入れて約 10 例測定したが何れの場合も凍結開始以後には 1°C/分を越えなかった。このような低い冷却速度ではキタムラサキウニ卵が細胞内凍結をおこすことはほとんどない³⁾。

ウニ卵を 15°C 乃至 20°C の室温で媒精し、それぞれ 0 分 (未受精), 1 分, 2.5 分, 5 分, 10 分, 30 分, 60 分, 90 分後に上記の方法で冷却凍結させた。この方法では卵浮遊液の温度は凍結開始後約 30 分で冷凍庫内気温とほぼ等しくなる。定められた時間の凍結の後試験管を 1 本づつとり出し室温の空气中で内容を融解させ直ちに検鏡して正常な卵細胞の数を算えた。第 1 図に示された卵細胞の生存率はこのような融解直後の正常細胞の数によるものである。これらの正常細胞は未受精卵の場合を除きいづれも卵割を開始しそのほとんどが少なくとも胞胚期までは發育した。後述する尿素処理卵の場合も凍結融解後正常にみえる卵は媒精すると一般に多精となるがほとんどいづれも発生を進行させることができた。未受精卵では融解直後正常に見えたものは媒精によってほとんどが受精膜を形成するが、正常な卵割を行なうことなく水泡をふきだして崩壊する。

このような方法で凍結時間 3 時間乃至 24 時間、凍結温度 20°C 乃至 25°C の範囲で 12 回の実験を行なったが、その結果は何れも同様な傾向をあらわしたのでその 3 例を第 1 図に示し

た。即ちこれらの条件のもとでウニ卵細胞の細胞外凍結後の生存率は、受精後僅か1分たった卵でも未受精卵に比べて著しく高く、受精後10分以内の卵において最高値をしめし、受精後の時間がたつにつれ卵の耐凍性は急速に低下し、卵割がはじまって以後の卵ではほぼ一定の低い値にとどまっている。但し一番おだやかな凍結条件である -20°C 4時間凍結の場合は、受精卵はすべて受精後の経過時間に関係なく、この凍結に耐えて生存できた。又この場合には未受精卵でさえ約半数は少なくとも融解直後には正常に見えるが、既に述べたようにこれらは何れも第1分裂までの間に水泡をふきだしてほとんど全滅した。

ウニ卵細胞の耐凍性がこのように受精後僅か1分以内に著しく増大する事実は甚だ興味ぶかい。この時期にはいわゆる表層変化¹⁵⁾として知られた細胞表面の可視的な構造変化が急速に完了することがわかっている。そこで媒精することなく表層変化だけを人工的におこさせたウニ卵でもその耐凍性が増大するかも知れないと考え、次の実験を行なった。元村の方法¹⁶⁾に従い1M尿素溶液(NaOH溶液を少量加えてpH8.4に調節)でキタムラサキウニの卵を洗うと、室温で1.5分以内に表層変化が完了するが人工処女生殖は全くおこらない。このような尿素処理卵でさきに受精卵で行なつたと全く同様な凍結実験をくり返した結果、期待にたがわず尿素処理卵は未受精卵に比べて著しい耐凍性の増大を示した(第1図)。



第1図 キタムラサキウニ受精卵の耐凍性の変化
矢印は卵割の開始期をしめす。

- A (○): 20°C で媒精後 -20°C で4時間凍結
- A' (⊙): 尿素処理卵を同じ条件で凍結
- B (●): 16°C で媒精後 -22°C で19時間凍結
- B' (⊙): 尿素処理卵を同じ条件で凍結
- C (×): 16°C で媒精後 -25°C で18時間凍結

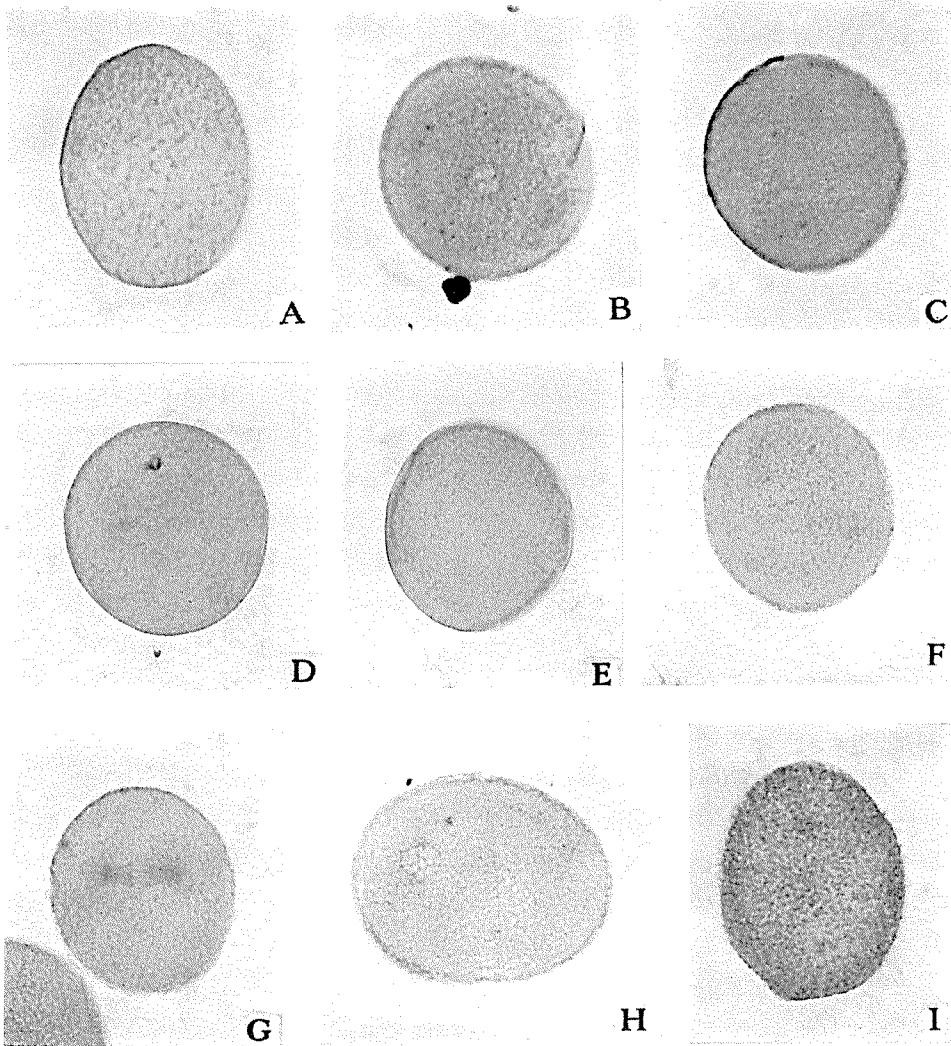
IV.

よく知られているように生物の耐凍性が高まってゆく時期には、その生物の組織中に凍害防禦物質として知られた小分子物質が増加することがしばしばある。しかしこのような物質がウニ卵の内部で僅か1分以内に凍害を防ぐのに有効なほど量的に生産されることは到底期待しがたい。又実際に受精前後のキタムラサキウニ卵を使って予察的に多価アルコールと糖類の含有量をしらべた結果そのような増量は全く発見できなかった(竹原未発表)。いっぽう塩溶液中で細胞外凍結しているウニ卵は、その表面に飽和塩溶液が接している場合よりもその接している溶液から共融混合物が析出された場合、即ちその溶液から完全に水が失なわれた場合の方がはるかに急激且顕著な凍害を受けることがわかって来た¹³⁾。そこでウニ卵において失水に対する細胞の抵抗性を増す効果がありしかも受精後きわめて急速におこりうるような過程としてまづ細胞原形質の蛋白が水との相互作用を増すような構造的変化を考えてみた。このためまずウニ卵細胞における受精直後のSH基の変動と卵の耐凍性との間にどのような連関があるかをしらべることにした。

ウニ卵において受精後にそのSH量に顕著な変動のあることは既に古くから知られており¹⁷⁾、この変動はグルタチオンのSHによるものではなく蛋白と結合したSH基(蛋白SH)によるものであることが明らかにされている¹⁸⁾。又川村及び団¹⁹⁾と川村²⁰⁾はウニ受精卵の第1分裂までの間にその蛋白SHの分布がどうかわるかを細胞化学的にしらべている。これらの知見はいずれもウニ卵の耐凍性とその原形質の構造的変化との連関を考えるに当たってきめて示唆に富むものであった。

前記の凍結実験に使ったと同じ卵群からのウニ卵を用い、川村及び団¹⁹⁾の方法に従いSHと結合するアゾ色素による染色法を利用して受精直後の卵細胞におけるSH基の状態をしらべた。凍結実験のときと同様に受精後0分(未受精)、1分、2.5分、5分、10分、30分、60分、90分後の卵細胞を用い、これらを5% TCA (Trichloroacetic acid) 溶液で12時間固定してから30分間蒸留水で洗った。この固定された卵細胞を常法でアルコールで脱水し、パラフィンに埋蔵して厚さ10 μ の切片に切った。この切片を卵白のような接着剤を使わずにスライドガラスにのせ、キシロールで脱パラフィンしてから80%のエチルアルコールまで戻した。次に切片を80%エチルアルコールに過量に溶かしたBennettの色素²¹⁾で3時間染色した。染色された切片を更に24時間80%エチルアルコール中で弁色してから常法で脱水しバルサムで封じた。この染色切片の標本は白色光ではうすい橙黄色に見えるが、トルイジンブルーでそめた濃い青色フィルターをとすと強い赤色を呈する¹⁹⁾。この事実を利用して切片標本の完成直後にすべての時期の卵切片の写真をとってその染まりかたを比較した(第2図)。

この実験の結果は既に川村及び団によってパフンウニ及びタコノマクラの卵で報告されているもの¹⁹⁾とほぼ等しい。即ち受精後卵細胞の染色性は急速に増大する。受精後分裂装置が卵細胞内にみとめられるまでの30分位の間(水温15°C内外)は細胞内はほぼ一様に染色されるが核は色がうすい。有糸分裂期に入ると分裂装置や染色体は強く染色され、反対に細胞質の



第 2 図 キタムラサキウニ受精卵のアゾ色素による染色性の変化
5% TCA で固定後切片を Bennett の試薬で染色

A. 未受精卵, B. 受精 1 分後, C. 同 2.5 分後, D. 同 5 分後, E. 同 10 分後
F. 同 40 分後, G. 核分裂後期, H. 2 細胞期の初期, I. 尿素処理未受精卵

呈色は弱くなる。更にわれわれの観察結果から指摘される点は、1) 受精後僅か1分の卵でも明らかな染色性の増大がある。2) 卵細胞質の染色性は受精後10分以内が最も高くそれ以後は次第に淡くなる。3) 卵の表層部にある細胞質は他の部分より濃く染ってみえる*等である(第2図)。

次に尿素処理によって人工的に表層変化をおこさせた未受精卵を同様に染色したところやはり細胞質に明らかな染色性の増大をみとめた(第2図のI)。

以上の結果は、もしもこのような卵細胞の染色性の増大が直ちにSH基の増加によると考えられるならば、ウニ卵細胞の耐凍性の大きさとその細胞質の蛋白SHとの間に平行的な関係があることを示すものであろう。

V.

最近 Levitt は凍害の機構を説明する一つの仮説を呈出した²²⁾。それによれば植物細胞の原形質を構成しているそれぞれの蛋白分子が凍結の際の原形質からの脱水の結果相互に近接するため新たに強い分子間SS結合をつくり、これが直ちにその分子の unfolding をひきおこすか、又は融解後原形質が水を吸って膨張しても新しくできたSS結合のためにもとの状態に戻れずその結果分子が unfolding をおこして構造がこわれるという。彼とその協力者等の一連の研究²³⁾⁻²⁶⁾によれば、植物体のハードニングの際、耐凍性のある植物ならばその原形質蛋白のSHが増加し、これは多くの場合SS→SHの変化によるものであるとのべている。しかし彼等の資料によれば半月又は1ヶ月におよぶハードニングの過程でSH量の増加が明瞭にみとめられるのは最初の数日以内であってそれ以後にはSH量は必ずしも耐凍性の増大と平行するわけではない。この場合植物の耐凍性は半月後においてもさらに明らかに増大しており、しかもこの時期には蔗糖のような凍害防禦物質が細胞内に増量することは多くの植物で知られているので²⁷⁾この資料から彼等が考えているように原形質蛋白のSH量の増加を耐凍性の増大をもたらす主要因であると結論することには問題があるように思われる。

ウニ卵の場合は、受精後卵細胞の耐凍性が急増するのは僅か1, 2分の短時間であり、この間に耐凍性を高めるのに十分な程の量の小分子物質がつくられることは考えられず、又卵細胞の受精前後における糖や多価アルコールの定量の結果(竹原未発表)もこれを裏書きしている。さらにウニ卵の内部で受精の直後から顕著な生化学的変化がおこることは良く知られた事実であり、可視的な細胞の構造も僅々1分以内に変ることがいわゆる表層変化として知られている¹⁵⁾。又このような表層変化を受精によらず人工的な尿素処理によっておこさせた場合でも、その細胞の耐凍性は明らかに高まるのが今回の実験により判明した。いっぽうウニ卵を各種の単塩溶液中で細胞外凍結させた実験の結果によれば、これらの細胞はその外面に接する溶液から完全に水が失われた場合にもっとも敏感に害を受ける¹⁹⁾。これらの結果からウニ卵の受精に伴う急速な耐凍性の増大に対する可能な解釈の一つとしてその原形質が失水に対する抵抗性を増すような構造的変化が考えられる。細胞の凍害は脱水によっておこされる原形質蛋白の

* この点は固定や切片製作のときの影響が大きいので更に検討を要する。

変性であると考えるかぎり上記のような構造的変化の一つとして SH 基のような水和に富む末端基 (Terminal groups) の増加を考えてもよいであろう。

ウニの受精卵における SH 量の変動は最近の酒井の一連の研究^{18), 28), 29)} によって非常に明らかにされて来た。彼の報告によると 2 種のウニ卵で TCA 不溶性の蛋白に結合した SH 基の量は受精後約 20 分間にやや増加するが決して急激なものではない²⁹⁾。又川村は本実験と同じ染色法を利用してウニ卵の第一分裂期における SH 基の量的変化をしらべたが、少なくとも受精の直後には意味のあるほどの変化はみとめられなかった²⁰⁾。これらの知見からみて、ウニ卵細胞の原形質蛋白の SH 量が細胞の耐凍性に関係あるとしても、Levitt 等が想像しているような細胞全体としての SH 基の量の問題ではなく、その細胞質の或構成部分が SH 基に富んでいれば耐凍性を増す効果があるのかも知れない。いづれにしても本実験における受精卵の、又は尿素処理卵のアゾ色素染色性の増加を少なくとも或部分における蛋白 SH 基の増加によるものと考えることが許されるならば、ウニ卵における耐凍性の増大はその原形質蛋白の SH 基の増加をふくむ構造的変化に直接の関係があると想像してもよいであろう。

摘 要

ウニ卵細胞は受精の直後に急激な耐凍性の増大をしめす。このことを利用して細胞の耐凍性に関係ある原形質的要素をしらべた。

キタムラサキウニの卵細胞を、受精後第一卵割が終るまでのいろいろな時期に、細胞内凍結がおこらぬ条件で凍結させ、融解後の生存細胞の数を算えた。この結果によれば卵細胞の耐凍性は、受精の直後わずか 1 分で著しく高まり、受精後 10 分以内が最高で、それ以後はかなり急に低下し、卵割がはじまって後は少なくとも 2 細胞期まではもはや変化しない。尿素処理によって人工的に表層変化をおこさせた未受精卵も受精初期の卵に劣らぬ高い耐凍性をしめす。

受精直後のウニ卵には、いわゆる凍害防禦物質としてしられた小分子化合物の生産はおこらない。そこで上記のような耐凍性増大のためにはその原形質の蛋白が水との相互作用を増すような構造的変化があるものと考え、SH と結合するアゾ色素を使って細胞化学的染色をウニ卵に試みた。その結果受精直後細胞質の染色性は非常に急速に増大し、10 分以内に最高となりそれ以後は次第に低下することが判った。いっぽう有糸分裂期に入ると分裂装置や染色体は強く染色されるが、細胞質の呈色は弱まる。又尿素処理によって表層変化をおこさせた未受精卵にもその細胞質に明らかな染色性の増大をみとめた。

このような染色性の増大を、少なくとも細胞質の或部分における蛋白 SH の増加によるものと解釈することが許されるならば、ウニ卵の耐凍性の増大は、卵細胞の原形質蛋白の SH 基の増加をふくむ構造的変化に起因することが想像される。

文 献

- 1) Asahina, É. 1962 Some notes on the mechanism of frost resistance in living animal and plant at climatic low temperatures. Bull. Marine Biol. St. Asamushi, **10**, 251-256.

- 2) Asahina, É. 1961 Intracellular freezing and frost-resistance in egg-cells of the sea urchin. *Nature*, **191**, 1263-1265.
- 3) 朝比奈英三 1962 生物細胞が細胞内凍結を防ぐ一つの機構. 低温科学, 生物篇, **20**, 45-56.
- 4) Smith, A. U. 1961 *Biological Effects of Freezing and Supercooling*. Edward Arnold Ltd. London.
- 5) Levitt, J. 1958 Frost, Drought and Heat Resistance. (Protoplasmatologia VIII). Wien.
- 6) Lovelock, J. E. 1953 The mechanism of protective action of glycerol against haemolysis by freezing and thawing. *Biochim. biophys. Acta*, **11**, 28-36.
- 7) Salt, R. W. 1961 Principles of insect cold-hardiness. *Ann. Rev. Entomology*, **6**, 55-74.
- 8) 竹原一郎・朝比奈英三 1960 昆虫の耐凍性とグリセリン. 低温科学, 生物篇, **18**, 57-65.
- 9) 丹野皓三 1962 ムネアカオオアリの耐凍性 I. 低温科学, 生物篇, **20**, 25-34.
- 10) 竹原一郎・朝比奈英三 1960 イラガ越冬前蛹のグリセリン (予報). 低温科学, 生物篇, **18**, 51-56.
- 11) 竹原一郎・朝比奈英三 1961 イラガ越冬前蛹のグリセリン I. 低温科学, 生物篇, **19**, 29-36.
- 12) 朝比奈英三 1953 生物の凍結過程の分析 X. 卵細胞 (ウニ) の凍結過程. 低温科学, **10**, 81-92.
- 13) Asahina, É. 1962. Frost injury in living cells. *Nature*, **196**, 445-446.
- 14) Asahina, É. and Tanno, K. 1963 A remarkably rapid increase of frost resistance in fertilized egg cells of the sea urchin. *Exptl. Cell Res.*, **31**, 223-225.
- 15) 稻山正雄 1957 ウニ卵の受精. 発生生理の研究 (岡・山田共編), 29~72, 培風館, 東京.
- 16) Motomura, I. 1934 On the mechanism of fertilization and development without membrane formation in the sea urchin egg, with notes on a new method of artificial parthenogenesis. *Science Rep. Tohoku Imp. Univ. IV.* **9**, 33-45.
- 17) Rapkine, L. 1931 Sur les processus chimiques au cours de la division cellulaire. *Ann. Physiol. et Physicochim. Biol.*, **7**, 382-418.
- 18) Sakai, H. and Dan, K. 1959 Studies on sulfhydryl groups during cell division of sea urchin egg I. Glutathion. *Exptl. Cell Res.*, **16**, 24-41.
- 19) Kawamura, N. and Dan, K. 1958 A cytochemical study of the sulfhydryl groups of sea urchin eggs during the first cleavage. *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, **4**, 615-620.
- 20) Kawamura, N. 1960 Cytochemical and quantitative study of protein-bound sulfhydryl and disulfide groups in eggs of *Arbacia* during the first cleavage. *Exptl. Cell Res.*, **20**, 127-138.
- 21) Bennett, H. S. 1951 The demonstration of thiol groups in certain tissues by means of a new colored sulfhydryl reagent. *Anat. Rec.*, **110**, 231-247.
- 22) Levitt, J. 1962 A sulfhydryl-disulfide hypothesis of frost injury and resistance in plants. *J. Theoret. Biol.*, **3**, 355-391.
- 23) Levitt, J., Sullivan, C. Y., Johansson, N. O. and Pettit, R. M. 1961 Sulfhydryls — a new factor in frost resistance I. Changes in SH content during frost hardening. *Plant Physiol.*, **36**, 611-616.
- 24) Schmutz, W., Sullivan, C. Y. and Levitt, J. 1961 Sulfhydryls — a new factor in frost resistance. II. Relation between sulfhydryls and relative resistance of fifteen wheat varieties. *Plant Physiol.*, **36**, 617-620.
- 25) Levitt, J., Sullivan, C. Y. and Johansson, N.O. 1962 Sulfhydryls — a new factor in frost resistance. III. Relation of SH increase during hardening to protein, glutathione and glutathione oxidizing activity. *Plant Physiol.*, **37**, 266-271.
- 26) Kohn, H., Waisel, Y. and Levitt, J. 1963 Sulfhydryls — a new factor in frost resistance. V. Direct measurements on proteins and the nature of the change in SH during vernalization of wheat. *Protoplasma*, **57**, 556-568.
- 27) Sakai, A. 1962 Studies on the frost-hardiness of woody plants 1. The causal relation between sugar content and frost-hardiness. *Contr. Inst. Low Temp. Sci.*, **B. 11**, 1-40.

- 28) Sakai, H. 1960 Studies on sulfhydryl groups during cell division of sea urchin egg II. Mass isolations of the egg cortex and change in its -SH groups during cell division. J. Biophys. Biochem. Cytol., **8**, 603-607.
- 29) Sakai, H. 1960 Studies on sulfhydryl groups during cell division of sea urchin egg III. -SH groups of KCl-soluble proteins and their change during cleavage. J. Biophys. Biochem. Cytol., **8**, 609-615.

Summary

In sea urchin egg cells the resistance capacity to extracellular freezing instantly increases at the time of fertilization and then gradually decreases before the mitotic apparatus is formed in the cell. A cytochemical observation in the egg cell seems to suggest that the behavior of protein-bound SH groups is responsible for increasing cellular frost-resistance.

Egg cells of the sea urchin, *Strongylocentrotus nudus* were used as material. Test-tubes containing 0.5 ml of egg suspension in sea water were cooled in a refrigerator in which egg suspension usually began to freeze spontaneously within some five minutes. Upon freezing the cooling rate in the freezing suspension was always less than 1°C per minute, at which rate egg cells of *S. nudus* never froze intracellularly⁹. In this way egg cells in suspension were subjected to freezing after 0 (unfertilized control), 1, 2.5, 5, 10, 30, 60 and 90 minutes respectively from the time of insemination. The freezing temperatures ranged from -20°C to -25°C and the duration of freezing ranged from 3 to 24 hours. After the freezing for the pre-determined periods of time, test-tubes were removed singly and each of them was re-warmed slowly in air at room temperature. Some of the results of these freezing experiments are presented in Fig. 1, in which the percentage survival is figured on the basis of number of intact cells counted under microscope just after thawing. Most of these intact cells could normally resume their development except unfertilized eggs in which the formation of fertilization membrane could be seen after insemination, but normal cleavage rarely took place. It is apparent in Fig. 1 that upon fertilization the frost resistance in the egg cells very rapidly increases. Besides, under severe conditions of freezing, the high frost-resistance in fertilized eggs reaches a maximum within about 5 minutes after insemination, then begins to decrease as the development proceeds. Besides, in the cells in which cortical change had been artificially induced by urea treatment, too, a remarkably high frost-resistance was found (Fig. 1).

By use of a mercaptid-forming azo dye a cytochemical staining method⁹ was applied to the egg cells (Fig. 2). The stainability in egg cytoplasm promptly increased upon fertilization. Before the mitotic stage the colour intensity was nearly uniform in the entire cell except the nucleus which was not deeply stained. The astral centers and spindle during mitosis were stained deeply. At telophase, however, they lost their deep colour. It must be here noted that the colour intensity in cytoplasm is highest within about 10 minutes after insemination and then apparently decreases as the development proceeds. The egg cell in which the cortical change was artificially induced by urea treatment, showed a distinct increase in the stainability of cytoplasm (Fig. 2).