



Title	遠心されたウニ卵細胞の凍結 I
Author(s)	朝比奈, 英三; ASAHINA, Eizo
Citation	低温科学. 生物篇, 23, 65-70
Issue Date	1965-12-01
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/17696
Type	departmental bulletin paper
File Information	23_p65-70.pdf



遠心されたウニ卵細胞の凍結 I*

朝比奈英三

(低温科学研究所 生物学部門)

(昭和40年8月受理)

I. 緒言

生物細胞が細胞外凍結をしている場合にうける害の主要因は、細胞外液の凍結にともなう原形質よりの脱水、細胞の内外における水溶液の濃縮等であると考えられている¹⁾。このような原因で原形質が凍害をうけるものとするれば、凍っている細胞のどの部分も同時におかされるのではなく、まずどこか一番弱い部分がまずこわされ、これが発端となって結局細胞全体が死ぬことは充分考えられる。しかし多くの生物細胞では或る一部の原形質の崩壊はひきつづきすみやかにまわりの部分にひろがるのがきわめて多いので、どの部分が最初にこわされたかを判別することは非常にむずかしい。

ウニの卵細胞を遠心すると、細胞内成分がその密度に従って成層し、さらにいくつかの割球に分離できることが知られている²⁾。従ってこれを利用すれば、同一の細胞の部分における耐凍性のちがいについて何らかの手がかりをつかむことができるかもしれない。本文はこのような考えから、遠心分離したウニ卵半球の耐凍性について予察的に行なった観察の結果をのべたものである。

本文に入る前にバフンウニの遠心分離についていろいろ教えて頂いた東北大学理学部生物学教室の山本穆彦博士に感謝する。又材料を採集送付して下さった東北大学浅虫臨海実験所の方々に厚くお礼を申し上げたい。

II. 材料と方法

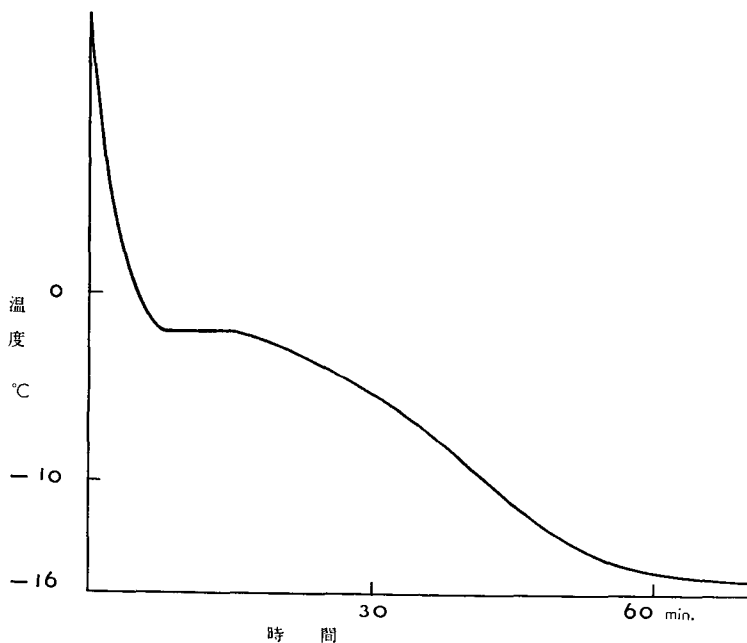
材料: 青森県陸奥湾産のバフンウニ *Hemicentrotus pulcherrimus* を1964年4月末に札幌の実験室に運び、通気させた海水バット中においた。実験期間中の水温は12°Cから15°Cの範囲にあった。この条件で親ウニは長期飼養できるが、1週間以上たつと正常な卵をうむウニが減ってくる。しかし15日間飼ったウニからも受精率100%の正常に発生する卵を多量に得た例があった。1/2 M KCl を使って親ウニから放卵させた卵は海水でよく洗って2°Cの冷蔵庫に保存し、通常3日以内に使用した。受精率が85%以下におちた卵は使用しなかった。

遠心: まず蒸留水でうすめた60%海水中に未授精卵を入れ10分間おいた。次に容量10 mlの遠心管の底に3 mlの1 M 蔗糖液を入れ、その上に上記の卵の入った60%海水を2 ml

* 北海道大学低温科学研究所業績 第735号

入れて遠心した。ウニ卵を遠心で二分することは色々な大きさの遠心力及び遠心時間で可能であるが、今回は12,000 gで17分内外遠心した。これによつて直径63 μ 位の重半球と70 μ 位の軽半球を得た(図版I-2, 3)。2つに切れたウニ卵をさらに1 M 蔗糖液と海水を等量にまぜた液中に浮遊させて再度軽く遠心すると重軽双方の半球をきれいに分けることができる。これらの卵半球は凍結実験のまえに必ず海水で数回洗つて蔗糖の影響を除いた。

凍 結： ウニ卵とその遠心半球の凍結法は著者の前報³⁾の場合とほぼ同様で、細胞の浮遊した0.5 mlの海水を試験管にとり、 $-16\sim-18^{\circ}\text{C}$ の気温の冷凍箱内で冷却した。熱電対を使つて、この卵浮遊液の冷却曲線(第1図)をとると、室温より氷点までは約 $3^{\circ}\text{C}/\text{分}$ の速度で



第1図 卵浮遊液の凍結曲線。冷凍箱内気温 -16°C

冷されることがわかつた。それで冷却開始後約6分でこまかい氷片を試験管内におとして植氷し、卵浮遊液が過冷却することを防いだ。冷却曲線は氷点(約 -2°C)において約15分間水平となるがその後はほぼ $0.35^{\circ}\text{C}/\text{分}$ のはやさで低下してゆき終末温度に近づくにつれゆるやかとなる(第1図)。

このように凍らせた卵浮遊液があらかじめ定めた冷却温度に達したときその試験管をとり出し、室温の水中に管をつけて融解させた。液の融解直後に検鏡して卵細胞の生死をしらべ、又異常なくみえるものは媒精した。正常にみえる卵に媒精すると、受精膜の上りかたは凍らせない卵細胞に比べると低いが、軽半球でも重半球でもほとんど例外なく膜があがつた。しかし卵割の進行は軽半球ではすべておこるが、卵片発生である重半球では少数のものにしかおこらない。それで凍結融解後の卵半球の生死は外観と受精膜打拳の可否によつて判定した。

又凍結融解の過程を観察するために特殊な冷凍箱内に設けた倒立顕微鏡上で卵浮遊液を凍

らせた³⁾。

III. 結 果

1. 遠心による成層と卵細胞の分離

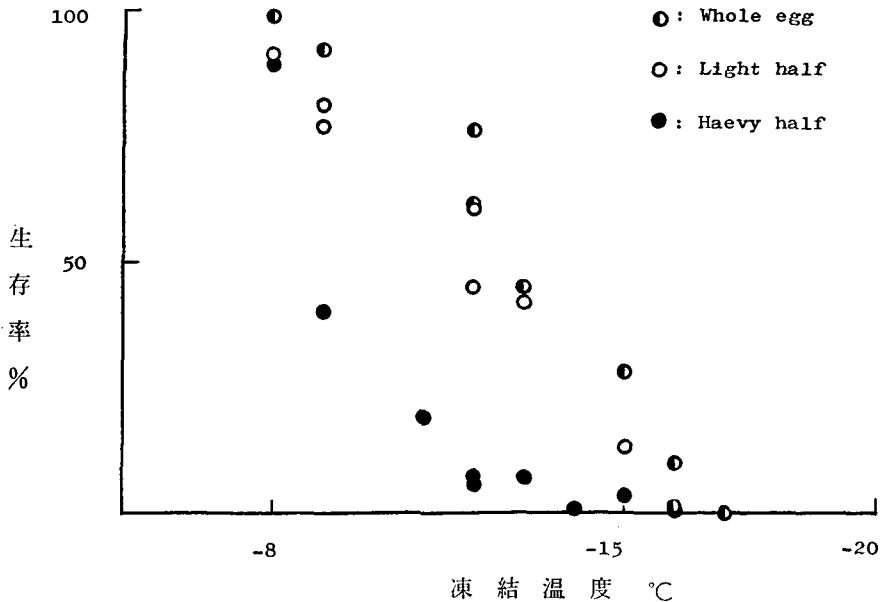
バフンウニ卵を遠心すると、卵細胞ははじめ細長くやがて歪鈴状(図版 I-1)となり遂に二分する。卵の内容は求心端からみて、まず油滴、橙色の色素をふくむやや大量の透明な細胞質、卵黄、色素のない透明な細胞質の順で成層する。細胞核は色素をふくむ細胞質層のところに浮遊している。

遠心によって卵細胞が二分した後遠心をやめると、それぞれの半球は球形にもどるが、軽半球の中には油滴、核、色素をふくむ透明な細胞質、卵黄の一部がふくまれる(図版 I-2)。重半球の中には大部分の卵黄と、色素のない透明な細胞質が混在する(図版 I-3)。遠心力が大きいと細胞は短い時間で二分し、内容物の成層は充分に行なわれない。

2. 遠心分離した半球の耐凍性

遠心分離した重軽2種類の半球を別々にわけて海水浮游液をつくり、前記のように試験管内で凍結しゆつくりと予定した温度まで冷却した。結果は正常な卵細胞の場合とともにまとめて第2図に示す。

遠心しない常態のウニ卵細胞では -9°C 付近まで冷却されたとき凍害があらわれ、更に冷却されるにつれ凍死するものが増し、 -16°C では大部分の卵細胞が死ぬ。遠心分離半球では



第2図 遠心分離したウニ卵半球の耐凍性。横軸の温度は第1図の冷却速度でそれぞれ凍らせた場合の終末温度を示す。冷凍箱内気温、 $-16\sim-18^{\circ}\text{C}$

●: 完全細胞, 未遠心 ○: 軽半球 ●: 重半球

-8°C ですでに凍害がみとめられるが、軽半球では -16°C までの温度範囲で常態の卵細胞の場合とほぼ等しい耐凍性をあらわしている。しかし重半球では -9°C ですでに生存率は半数を割り、-12°C では大部分のものが凍死する。

3. 遠心分離半球の凍結過程

卵細胞または遠心分離半球の海水浮游液の小滴をカバーグラスにとり顕微鏡下で冷却し、-5°C 付近で植氷して凍結を開始させ、その後は約 2°C/分の速度で冷却し、-15°C 付近に達した後加温融解させた。バフンウニ卵は急速凍結に対して抵抗性が高く、20°C/分の冷却速度にもたえるので、今回の実験程度の冷却速度では細胞内凍結をおこすものはごく少ない。しかし遠心されて長く引きのばされた卵では細胞内凍結をおこすものがやや多くみとめられた。

遠心分離した卵半球の細胞外凍結の過程は、完全な1個の卵細胞でいままでに観察されたもの^{3,9)}とほとんど同様で、未受精卵であるために凍結によって脱水され縮小してもわずかしかゆがまない。この場合重半球の方が軽半球よりゆがみかたが少なく、ほとんど球形のまま氷にはさまれている(図版 III-8)。しかし凍結の過程ではほとんど異常のみとめられなかった卵半球も、15分内外の凍結の後に加温すると、融解の過程で原形質の崩壊をおこすものが多く、ある半球は吸水膨脹し、又ある半球は収縮変形したまま恢復しない(図版 II-6, III-9)。このような凍結過程の観察を数回くりかえしたが、融解後の凍死率は、いつも重半球の場合の方が軽半球の場合より大きかった。

IV. 論 議

ウニ卵細胞を遠心して二分するとき、卵の内部細胞質は流動性にとみ、その成分は容易に成層するが、ゲル状をなす表層の細胞質にはこのような変化は比較のおこりにくいと考えられる。しかし元村によれば 500,000 g の遠心力でウニ卵を二分したときには、重軽両半球において細胞表層部にもかなりのちがいがみられるという⁹⁾。今回の実験においても表層細胞質に含まれるといわれる橙色の色素粒が軽半球に多く集まるから、遠心の前後において細胞表層部にもある程度の変化がおこったことは考えられる。しかし 12,000 g で 17 分の遠心では卵表面における表層胞の移動はほとんどおこらず、卵が二分された後も、重軽双方の半球がともに受精膜を打撃する能力があるので、表層部の構造は双方の半球で大きなちがいはないものと思われる。

従来細胞外凍結によって生物細胞のうける害を考える場合に、凍害に対して一番敏感な部分は細胞の原形質膜であろうとする考えかたは少なくない⁷⁾。これは細胞媒液の濃縮によってできた高濃度の塩溶液によって原形質膜の重要成分である脂質が溶解されることが細胞における凍害の主要因であるという想定⁸⁾にもとづくものである。しかし今回の実験ではほとんど同じ構造の表層部をもつウニ卵の半球の間に明らかな耐凍性の差がみとめられた。従って少なくともこの実験条件のもとではウニ卵細胞で凍害に対して一番敏感な部分は表層原形質膜ではないのではあるまいか。もちろん原形質膜は細胞の表面のみにあるのではなく、細胞内部のいろいろな部分に発達していると考えられるが、凍結のとき濃縮塩溶液の作用を最も強くうける部

分は表層原形質膜であるとみてよいであろう。

重軽2種の半細胞の内容物のちがいは当然これらの半球の凍結の際異なった影響をあたえるであろう。実際に細胞外凍結による変形の程度は軽半球の方が重半球より大きい(図版 II-5)。重半球には大量の卵黄がふくまれ、従って含水量が軽半球より少ないことがこの原因の一つともみられるが、収縮の程度は重半球といえども甚だ大きく外観からは両半球の間に差をつけにくい(図版 II-5, III-8)。凍害によい重半球に卵黄が多い事実は、凍害の機構を前述のような塩溶液による脂質の溶解とする説にとって有利であるようにもみえる。しかし卵黄の一部は軽半球にもふくまれており、又卵黄の全量をふくむ完全な細胞の耐凍性が、重半球ではなくてかえって軽半球の耐凍性とほとんど等しいことは、卵黄粒を細胞内で凍害に対する最弱点とみる説にとって不利である。

ともあれ遠心によって細胞の構造を部分的に変えることを利用すれば、細胞の凍害の機構に関する研究は今後さらに一步をすすめることができるであろう。

摘 要

バフンウニ未受精卵を 12,000 g で 17 分内外遠心することにより重半球と軽半球に二分し、この双方の耐凍性を比較した。

1°C/3 分位の冷却速度で各半球を凍結させると細胞内凍結はほとんどおこらないが、-8°C 以下の温度まで冷却すると融解されたとき原形質崩壊がおこるものがあらわれ、-15°C まで冷却すればほとんどすべての細胞が凍死する。この凍結条件では軽半球の耐凍性は遠心しない常態の卵細胞のそれとほとんど等しく、重半球の耐凍性は明らかにそれらより劣る。

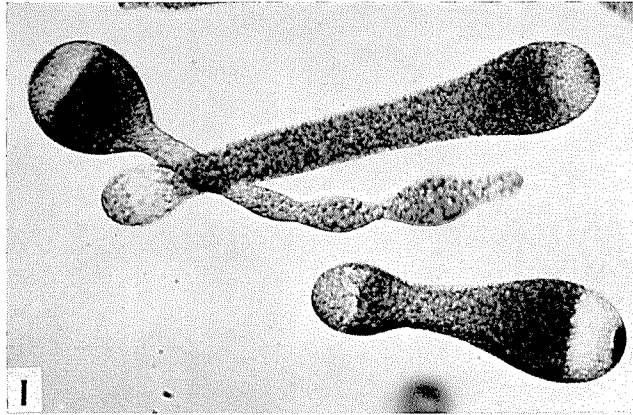
文 献

- 1) 朝比奈英三 1959 凍結した生物の生存と死. 科学, **29**, 597-603.
- 2) Harvey, E. B. 1956 The American Arbacia and other Sea Urchins, Princeton Univ. Presss, Princeton, New Jersey, 298 pp.
- 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) Asahina, Éizo 1962 Frost injury in living cells. *Nature*, **196**, 445-446.
- 5) 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.
- 6) Motomura, Isao 1949 Artificial alteration of the embryonic axis in the centrifuged eggs of sea urchins. *Sci. Rep. Tôhoku Univ. Ser. IV (Biol.)* **18**, 117-125.
- 7) Smith, A. U. 1961 Biological Effects of Freezing and Supercooling, Edward Arnold Ltd. London, 462 pp.
- 8) Lovelock, J. E. 1954 The protective action of neutral solutes against haemolysis by freezing and thawing. *Biochem. J.*, **56**, 265-270.

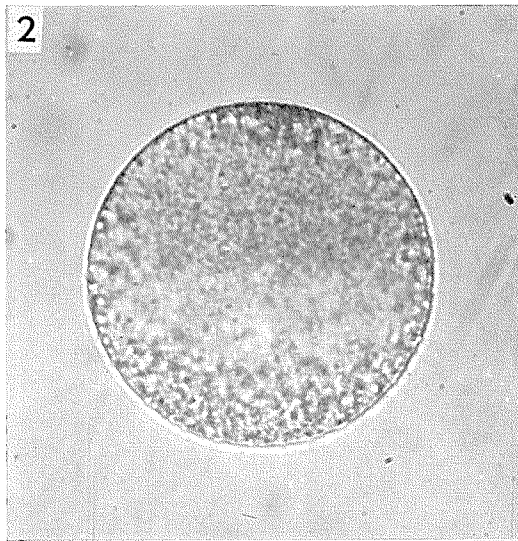
Summary

A sea urchin egg cell can be harmlessly broken into two halves, one heavier than the other, by means of centrifugation. In the egg cell of the sea urchin, *Hemicentrotus pulcherrimus*, the light halves produced in this way contain the oil drop, nucleus, clear cytoplasmic layer including the fine pigment granules, and a little yolk; the slightly smaller heavy halves contain most of the yolk, and a clear layer of cytoplasm. The appearance of surface cytoplasmic layer in both half eggs, however, is almost the same. The halves were separately suspended in sea water in test tubes and subjected to freezing. The sea water was seeded with ice at about freezing point, and these half-cells were cooled slowly at a rate of 0.35°C per minute, when no cells were found to freeze internally. If these extracellularly frozen cells were rewarmed before they had been cooled to about -9°C., none of them were injured. However, frost injury in these cells increased as the freezing proceeded to temperatures below -10°C. In these cases, the rate of survival in the light halves was nearly the same as in unbroken whole eggs and was always distinctly higher than that in the heavy halves. These results suggest that susceptibility to extracellular freezing may vary in the different cellular components and that the surface cytoplasmic layer may not be the most susceptible part in a single cell.

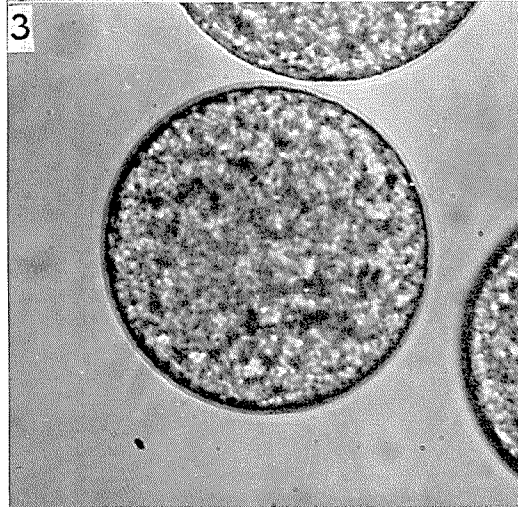
1. 遠心で引き
のばされた
卵細胞
×180

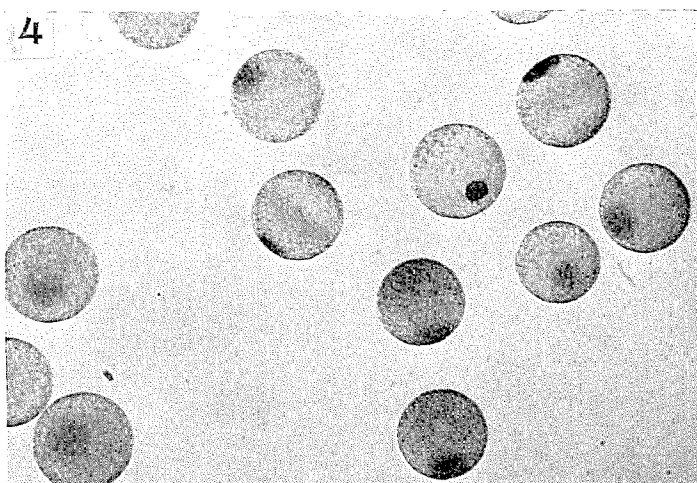


2. 軽半球 ×360

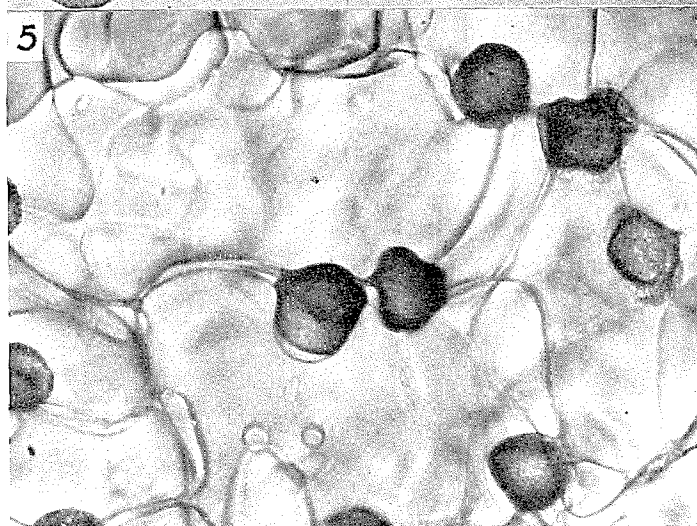


3. 重半球 ×360

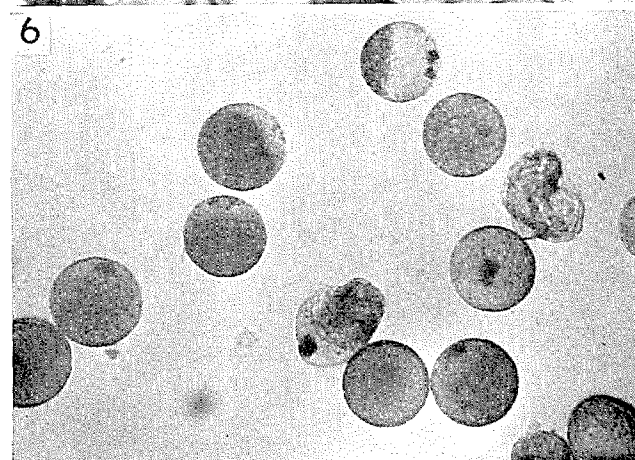




4. 軽半球
凍結前
×180

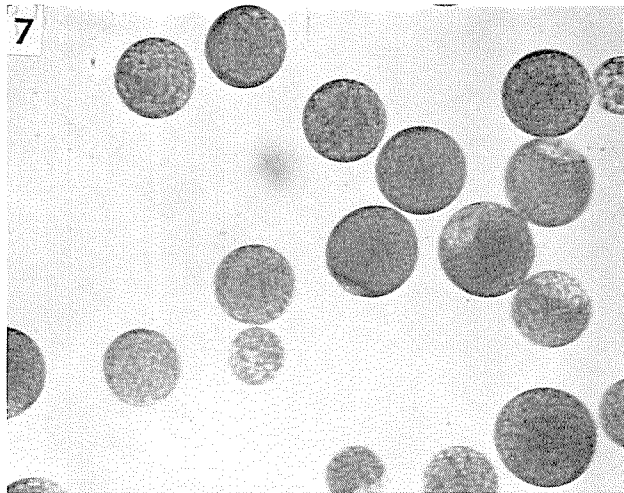


5. 軽半球
凍結中
-11°C
×180

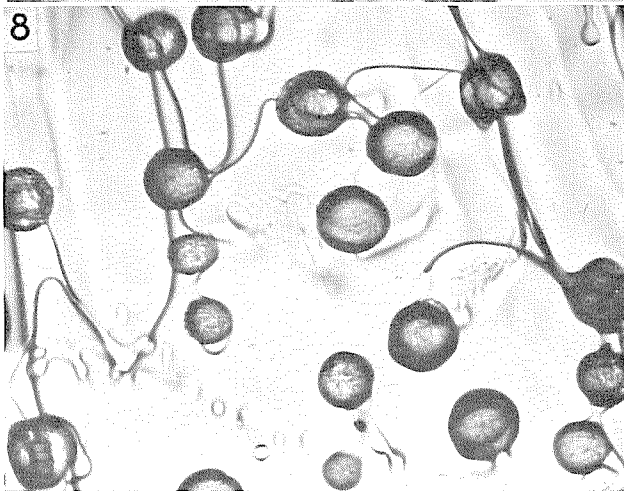


6. 軽半球
融解後
×180

7. 重半球
凍結前
×180



8. 重半球
凍結中
-12°C
×180



9. 重半球
融解後
×180

