HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	鮭卵の受精に於けるカノレシウムに就て(1) : 受精過程に於げるカノレシウムの役割に就て
Author(s)	濱野, 繁
Citation	札幌博物学会会報, 18(1-2), 13-17
Issue Date	1949-07-31
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/64342
Type	journal article
File Information	Vol.18No.1-2_004.pdf

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

鮭卵の受精に於けるカルシウムに就て (1) 受精過程に於けるカルシウムの役割に就て[1)]

Studies on the calcium in the fertilization of salmon (*Oncorhynchus keta*) egg, 1. The rôle of calcium ion in the fertilization process. (With English résumé, p. 17).

濱　野　繁

Shigeru Hamano

北海道大學農學部水產動物學教室

緒言　鮭卵は淡水中で數分にして受精能力を消失するが，等調 Ringer 氏液中では受精し得ないが受精能力は長時間保持する。然し山本（1944）に依るとメダカの卵は趣を異にし等調 Ringer 氏液中でも受精する。然し若し Ca-free Ringer 氏液で洗滌される時は其の液内では受精せず又等調蓚酸曹達又は枸櫞酸曹達等の鹽溶液處理に依り Ca イオンを除却した場合は同樣に受精されず，メダカ卵の受精には Ca イオンの缺くべからざることを報じて居る。

本報告は鮭卵の受精現象に於ても Caイオンを必要とするか，然も其の由來は何處に求むべきか，即ち媒液中のものなのか又は卵自体に存在するものなのか或は精液又は精子中のものなのかを考察し，併せて Ca-free Ringer 氏液又は鹽溶液に依る Ca イオン除却處理を行ひ，Ca イオンの移動を定量的に追求し更に Ca の形態に就て考察言及するものである。

本研究は齋藤三郎教授の御指導及び青木廉教授の御教示に依り行なはれたものである。

鮭卵分與に便宜を與へられた北海道鮭鱒孵化場の方々に深く感謝する。

實驗方法並に結果

1. Ca-free Ringer 氏液處理に依る受精率變化

等調 Ca-free Ringer 氏液（M/7.5 NaCl 100c.c.＋M/7.5 KCl 2.8c.c.）を滿した7容器に合計20分間次々に通過浸漬した未受精卵を受精せしめて流水に移し，約15時間後 Bouin 氏固定液にて固定し卵分割の如何を鏡檢し受精率を求めた。一方上記の如く Ca-free Ringer 氏液にての20分間處理後更に等調 Ringer 氏液（M/7.5 NaCl 100c.c.＋M/7.5 KCl 2.8c.c.＋M/11 $CaCl_2$ 3.4 c.c.）にて浸漬處理後受精させたもの及び等調Ringer氏液にかふるに等調 Mg-Ringer 氏液（M/7,5 NaCl 100c.c.＋M/7.5 KCl 2.8c.c.＋M/11 $MgCl_2$ 3.4c.c.）を使用せるものに就き同樣固定鏡檢して得た受精率は夫々第1表の結果を示す。

各實驗に於て常に 150個以上の卵を使用し乾導法受精を行ひ，鏡檢の結果全たく卵分割を見られないものを不受精卵と見做し，受精卵は第二（4細胞）又は第三（8細胞）分割を示す。

第1表　Ca-free Ringer 氏液處理による受精率

	不受精卵	受精卵
A. 對照	4%	96%
B. Ca-free Ringer 氏液處理ニヨル受精	83%	17%
C. Ca-free Ringer 氏液處理後更ニ Ringer 氏液處理ニヨル受精	9%	91%
D. Ca-free Ringer 氏液並ビニ Mg-Ringer 氏液處理ニヨル受精	52%	48%

1) Contribution No. 107 from the Department of Fishery, Faculty of Agriculture, Hokkaido University.

明に Ca-free Ringer 氏液處理は受精率の顯著は低下を示す。然し此の低下は Ringer 氏液通過に依り正常に復歸し得るものの如く Mg-Ringer 氏通過にては稍々上昇す。

2. 等調枸櫞酸曹達及び媒液並びに卵表面の Ca の受精率に對する影響

未受精卵を等調枸櫞酸曹達(M/15)中に前記 Ca-free Ringer 氏液處理と同方法にて10分間浸漬後受精せしめ一方同處理卵を等調 $CaCl_2$ (M/11) に 10 分間浸漬後受精せしめ更に以上の處理後，蒸溜水及び水道水に夫々浸漬せる場合の受精率を檢討し次いで濾紙を用ひ未受精卵の表層部体液を完全に除却せる受精率及び之等の處理後，蒸溜水及び水道水に夫々浸漬せる場合の受精率を求めた。以上の結果は第2表に示す如く Ca 欠除 (E, F) の受精率は甚だしく低下し，卵表体液除却 (C, D) も亦顯著な低下を示す。

第2表　等調枸櫞酸曹達及び媒液並びに卵表面 Ca の受精率に對する影響

	不受精卵	受精卵	死卵
A 對照	2 %	98 %	
B 卵表面体液不除蒸溜水中にて受精	6.7%	93.3%	
C 卵表面体液除却後蒸溜水中にて受精	40 %	57.9%	2.1%
D 卵表面体液除却後水道水中にて受精	40.4%	59.6%	
E Na_3-Citrate にて10分處理後蒸溜水中にて受精	76.8%	21.1%	2 %
F Na_3-Citrate にて10分處理後水道水中にて受精	74.5%	21.2%	4.3%
G Na_3-Citrate にて10分處理後更に $CaCl_2$ (等調)にて10分處理後蒸溜水中にて受精	20 %	79 %	1 %
H Na_3-Citrate にて10分處理後更に $CaCl_2$ (等調)にて10分處理後水道水中にて受精	8.3%	90.7%	1 %

3. 精液中の Ca を除却せる場合の受精率

W. G. Ellis (1939) に依ると卵液 (egg fluid) 中にては精子の受精能力が長時間保持されると云ふものの，一般に鮭精子は山本 (1944) のメダカに關する實驗方法で精巢を細碎して Ca-free Ringer 氏液にて10分間處理する時は受精率は66%に低下する。

著者は未受精卵をすりつぶした液に精液を附加して攪拌し是に Ca-free Ringer 氏液を注ぎ10分間放置し其の間上澄を2回の Ca-free Ringer 氏液にて更除して實驗に供した。Ca-free Ringer 氏液にかふるに等調 Ringer 氏液にて同時間處理した場合の受精率を見た。之等の結果は第3表に見る如く等調，Ca-free Ringer の如何に關係せず Ringer 氏液にて處理する時は略々同程度の低下を齎らす。

第3表　精液中の Ca を除却せる場合の受精率

	不受精卵	受精卵
Control	2.6%	67.4%
精液を10分等調 Ringer 氏液にて處理せる受精率	24.3%	75.7%
精液を10分 Ca-free Ringer 氏液にて處理せる受精率	22.6%	77.4%

4. 等調醋酸曹達處理に依る受精率

枸櫞酸曹達又は蓚酸曹達は Ca と反應して枸櫞酸 Ca 又は蓚酸 Ca として安定な結合をなすがイオンに解離し易い醋酸曹達との反應で生ずる醋酸 Ca は再びイオンに解離する。從つて受精に必要な Ca を集取結合して醋酸 Ca を生ずるは明白なるも受精に際し再び生じた Ca が使用される事も當然豫想される。

本實驗は此の想定のもとに前實驗の Ca-free Ringer 氏液又は枸櫞酸曹達使用と同樣に未受精卵

を等調 (M/7.5) 醋酸曹達液の數容器に合計10分間浸漬後の受精と醋酸曹達に浸漬後更に10分間等調 $CaCl_2$ (M/11) に浸漬處理後受精率を比較した。然るに第4表に見る如く醋酸曹達のみの處理は $CaCl_2$ を使用したものとの差異を認めず，本結果より Ca の行動を斷言することは出來ないが，上述の如く受精に際して解離した Ca イオンが使用された結果兩者に大差ないものと考へられる。

第4表　等調枸櫞酸曹達處理に依る受精率

	不受精卵	受精卵
A Control	2.6%	97.4%
B Na-Acetate 10分浸漬後の受精	2.1%	97.9%
C Na-Acetate と $CaCl_2$(等調)に夫々10分宛浸漬後の受精	7 %	93 %

5. 等調 Ca-free Ringer 氏液及び枸櫞酸曹達處理に依る Ca 移動の定量

以上の諸實驗より鮭卵の受精現象には Ca の必要が明白である。枸櫞酸處理により受精に必要な Ca は不溶性の Ca-Citrate の形となり當然受精には使用されず受精率は著しく低下す（第2表)。然るに同樣受精率を低下せしめる Ca-free Ringer 氏液處理（第1表）の場合の Ca の移動に關しては卵から媒液中に溶出するか又は卵內に殘存するも受精に關與しない形となると考察される。此の問題を解決すべく Ca-free Ringer 氏液及び等調枸櫞曹達に依る Ca 量の變化を追求した。即ち，一方濾紙で体液を除却した1000個の未受精卵を 700c.c. の Ca-free Ringer 氏液に浸漬（約1分間）後直ちに媒液を傾斜法で蒸發皿に取り殘渣は濾過により媒液を集めた。他方同樣に1000個の未受精卵の体液を除却し 700c.c. の Ca-free Ringer 氏液に20分間浸漬後同樣にして媒液を得た。

同媒液を湯煎上で蒸發乾固せしめ，次いで 6N HCl の少量にとかし再び湯煎上で蒸發乾固後更に鐵網上で微赤熱し，稀鹽酸にとかし暫時加溫後濾過す。濾液をアンモニア水を用ひ微アルカリ性となし之に少量の醋酸を加へて微酸性（pH 5）にもどして鐵網上で煮沸し之に煮沸せる修酸アンモニア液を加えて激しく攪拌しつゝ數分間煮沸した後保溫しながら約2時間放置して沈定を待ちて濾過して溫湯にて鹽化物の反應の消失する迄洗滌し乾燥後豫め秤量せる坩堝に移す。使用せる濾紙は白金線を用ひ灰となし坩堝に加へ始めは除々に次第に底部が僅かに赤熱する程度に加熱し5～10分間此の溫度を保つ。其の間時々坩堝の蓋を取り修酸石灰を炭酸石灰と一酸化炭素とに分解せしめ，冷却後秤量する。更に分解の不充分の危惧の爲に秤量後更に炭酸アンモンの紛末と蒸溜水を少量加へ低溫で水分を蒸發せしめ再び灼熱し冷却後の秤量が前回と一致する迄繰返した。此の際 Ca 量は CaO として計算した。同樣に Ca-free Ringer 氏液の代りに等調枸櫞酸曹達を用ひた場合について定量した。兩者共に夫々3回の實驗結果の平均價を求めたのが第5表である。

第5表　等調 Ca-free Ringer 及び枸櫞酸曹達處理に依る Ca 移動の定量

	實驗液	標準液	實驗液－標準液
A 等調處理 Ca-free Ringer の場合	0.0071gr	0.0056gr	0.0015gr
B 等調枸櫞酸曹達處理の場合	0.0336gr	0.0285gr	0.0051gr

明らかに20分浸漬に依り媒液中の CaO 量は增加を示し特に枸櫞酸曹達處理に於て顯著な量差を認められ受精に要する Ca が卵から媒液に溶出することが覗はれる。

考　　察

鮭卵の受精現象に於て Ca イオンの必要は等調 Ca-free Ringer 氏液處理及び等調枸櫞酸曹達處理に依り受精率の顯著な低下に依つて明らかである（第1，第2表）。然して此の必要なる Ca は媒液，精液又は精子及び卵自体から由來する以外には考へ得ない。然るに蒸溜水中の受精率に著しい差異を認め得ざる事實（第2表，B）は媒液中の Ca を利用する事を否定する。次に精液（又は精子）より由來する Ca の受精に及ぼす影響に關しては精子に全々障害なしに精液から Ca を除却する事は技術的に考へ得ない。精子は Ca-free Ringer 氏液中に10分以上止る時は全個体は死滅する。

本報告に用ひた卵液（egg fluid）の使用に依り精子の運動を抑制せしめて Ca-free Riuger 氏液浸漬に依る Ca 除却は完全なりと斷言し得ない。然し等調 Ringer 氏液處理と Ca-free Ringer 氏液處理との受精率の略々同程度の低下（第3表）は精液又は精子の Ca は受精に影響せざる事を示し受精率の低下は寧ろ操作の精子に與へた障碍に依る受精能力の降下に依ると考へるが至當であらう。

從つて當然卵自体の Ca 利用以外には有り得ない。しかも濾紙に依る卵表層に含まれる体液及び粘性の卵質液の除却が受精率の半減を來たす事實（第2表D）は卵表層に含まれる Ca の影響を示す。但し此の際濾紙に依る操作が起る精子と卵との接着障害を考へられる。

以上の考察に依り鮭卵の受精に Ca は必要缺くべからざるものであり然も其の Ca は卵から由來し媒液及び精液の Ca は無關係となる。然し Ca を缺除するも Mg の存在に依り受精は見られるが其の率は極めて低い（第1表D）。次に受精に必要な Ca の性質を考察するに一度 Ca を除却した卵も機會を得れば再び Ca を獲得して受精に供する（第1表C及び第2表G，H）即ち Ca の去就は可逆的で容易に移動する。例へば第1表C及び第2表G，H の他に枸櫞酸曹達處理卵（第2表E，F）と醋酸曹達處理（第4表B）の著しい受精率の差異を示す事實からも Ca 去就（又は移動）の容易なことが肯下される。即ち前者は受精に要する Ca は卵から奪取されて枸櫞酸 Ca として安定な結合をなす故に受精率は甚だしく低下するに反し後者は一度卵から Ca を奪取して醋酸 Ca を形成ずるも再び Ca イオンを解離し容易に卵に移動し從つて正常卵（無處理卵）と懸隔なき受精率を示す。又 Ca-free Ringer 氏液及び等調枸櫞酸曹達處理に依る受精率の低下は必要なる Ca イオンが卵より媒液中に溶出された結果で處理の爲に利用し得ざる形となり卵内に殘存するにあらざることは卵の處理時間の長短に比例して媒液中に含まれる Ca 量が增減する事實から明白である（第5表）。尙 Ca の卵よりの去就は前述の如く容易に可逆的に行なはれる事實から利用される Ca は free に存在するものと思はれる。又卵表層の Ca 以外に卵内層の Ca も受精に關與するか否かは，今後に殘された諸問題である。

結　　言

1) 鮭卵の受精には Ca イオンが必要である。
2) 鮭卵の受精現象に媒液及び精溶中の Ca は關與しない。
3) 卵表層中の Ca が受精の際に使用される。そして此の Ca の除却及び附加は Ca-free Ringer，枸櫞酸曹達と Ringer 氏液又は $CaCl_2$ 溶液を用ひて可逆的に制禦され，從つて受精率を高降し得る。又 Ca-free Ringer 氏液又は枸櫞酸曹達處理に依つて受精に必要な Ca は卵外に誘導される。

參考文献

L. V. Heilbrunn and Karl M. Wilbur 1937. Stimulation and nuclear breakdown in the Nereis egg. Biol. Bull. 73. pp. 537.

Yamamoto, T. 1944. Physiological studies on fertilization and activation of fish eggs. I. Response of the cortical layer of the egg of Oryzas latipes to insemination and to arifical stimlation. Anno. Zool. Jap. 22. pp. 109.

W. G. Ellis and J. W. Jones. 1939. The activity of the spermatozoa of Salmo salar in

relation to osmotic psresure. Exp. Biol. 16. pp. 530.

山本時男 1943. 魚類の發生生理. (養賢堂).

Résumé

According to T. Yamamoto (1944), Ca-ions are necessary in the fertilization process of *Oryzias* eggs, and their fertilization in the isotonic Ringer's solution is normal. While, the ripe eggs of salmon (*Oncorhynchus keta*) lose their fertilizability within a short time in tap water, but in spite of the keeping of their ability of fertilization for a long time, they are unfertilized at all in the isotonic Ringer' s solution. The present paper deals with the rôle, origin and character of calcium in the fertilization process of salmon eggs.

The eggs put into Ca-free Ringer's solution for 20 minutes are unfertilized by dry insemination, but if they are put back into the Ringer's solution, their fertilization take place quite normally. (Table I). This fact shows that the calcium in the superficial parts of eggs permeates into Ca-free Ringer's solution, but the eggs take back the calucium from the Ringer's solution.

The same is true in the solution of Na_3-Citrate whose anions are precipitant. Namely, when the eggs are put into the isotonic Na_3-Citrate solution (M/15) for 10 minutes their fertilization percentage by dry insemination is fallen cxcccdingly, but if they are put back into the isotonic $CaCl_2$ solution (M/11), it attains almost to the normal percentage (Table Ⅱ). This indicates that the calcium of eggs combines with the anions of Na_3-Citrate solution and stable Ca-citrate is formed, but by the transfusion into the isotonic $CaCl_2$ solution the eggs ob tained again the necessary calcium for the fertilization.

Since the dry insemination by the fresh semen mixed with egg-fluid which was washed twice during 10 minutes with Ca-free Ringer's solution does not influence the fertilization (Table Ⅲ), the calcium of semen does not take part in the fertilization.

With the treatment for 10 minutes by the isotonic Na-Acetate solution whose anions are ionized perfectly, the combination calcium of the eggs with the anions of solution is expected to form Ca-Acetate, but the fertilization is normal (Table Ⅳ). It is probable that the ionization of Ca-Acetate which is unstable takes place at the time of dry insemination.

As stated above, the eggs are fertilizable by the Ca-free semen. And besides the fertilization takes place in distilled water, and it is fallen to 50 percent by the removal of the surface fluid of eggs with aid of filter paper. These facts indicate that the calcium of superficial parts such as the chorions and perivitelline spaces of eggs is used in the fertilization process.

Ca-volume in medium proportional to the immersion time of eggs into Ca-free Ringer's solution or isotonic Na_3-Citrate (Table Ⅴ). This indicates the dispersion of calcium into medium from the eggs.