

デメコルチンによるウニ卵の卵割抑制と異常卵割 (第一報)*

小林 直正・中村 健児 (京都大学理学部動物学教室)

昭和 32 年 1 月 18 日 受領

コルヒチンの生物に対する作用については Eigsti & Dustin ('55) が詳述しているが、この薬剤は細胞の分裂装置を破壊、またはその形成を阻害し、その結果として核及び細胞の分裂を妨げるために、しばしば倍数性細胞の誘発に使用されてきた。それらの実験の多くは植物細胞を材料として実施され、倍数性個体の育成にまで成功した場合が少なくない。これに反して、動物細胞を材料とした場合には倍数性細胞の誘発それ自体が既に容易でなく、特に倍数性個体の育成に当つては、倍数性胚を作り得ても、これを成体にまで生育させた例は極めて少く、わづかにコマユバチ (稲葉, '39, '40, '41) と蚕 (広部, '39, 辻田, '51) についての成功が報告されているに過ぎない。しかも自然界には動物に於ても倍数性細胞及び倍数性個体の存在は知られているので、コルヒチンによる倍数性細胞誘発の困難は、

コルヒチンの動物細胞に対する毒性の強いことがその原因の一部をなしているものと考えられる。著者の一人である小林は動物の生殖細胞並びに受精卵に対するコルヒチンの作用を研究してきたが、最近コルヒチンの誘導体であるデメコルチン (チバ製薬新製品) を入手し得たので、ウニ卵に対する両者の作用の比較検討を行つた。コルヒチンとデメコルチンの構造は第 1 図の如くである。デメコルチンは最初名古屋大学の中柴榮三氏より分与され、後にはチバ製品より贈与された。ここに好意をよせられた方々に感謝の意を表する。

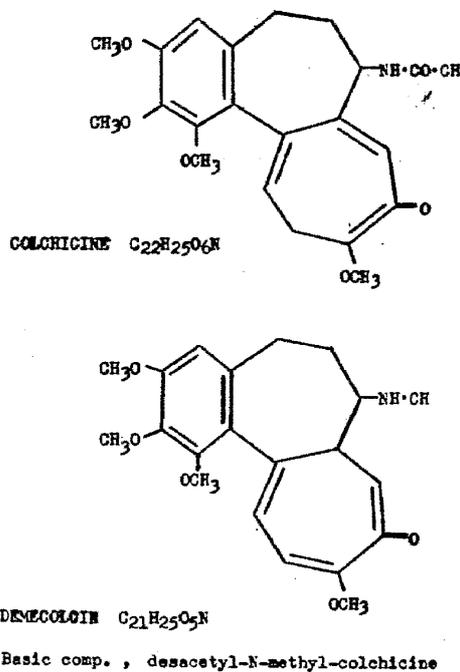


Fig. 1. The chemical structures of colchicine and demecolcin.

材料及び方法

材料はコシダカウニを主とし、比較するためにバフンウニを用いた。KCl 処理によつて放卵させた卵を数回海水で洗つた後に媒精、80%以上の卵に受精膜が打撃したのを確認してから室温に於てつぎの処理を行つた。媒精後 3 分のウニ卵の浮游海水中に薬剤を加え、最終濃度をコルヒチンは 0.001% 乃至 0.0005% デメコルチンは 0.0005% 乃至 0.00001% の間の数段階の濃度とし (第 1 表及び第 2 図参照)、(1) 数時間にわたつて処理を継

続した場合と、(2) 対照の無処理卵が第一卵割を終つた時期に正常海水で数回洗滌した場合とについて観察を行つた。これらの観察には位相差顕微鏡を用いたが、同時に一定時間後に材料の一部を固定し切片標本による細胞内部の詳細な観察に備えた、なお、切片標本

Table 1. Concentrations of demecolcin and colchicine used, and their effects.

		concentration (%)	10 ⁻³	5×10 ⁻⁴	10 ⁻⁴	5×10 ⁻⁵	10 ⁻⁵
demecolcin	cleavage inhibition		+	—	—	—	—
	recovery by washing		—	/	/	/	/
colchicine	cleavage inhibition		+	+	+	+	—
	recovery by washing		—	—	+	+	/

* 瀬戸臨海実験所邦文業績第 121 号

による観察結果は第二報として別に報告する

観 察

観察はコシダカウニ卵並びにバフマウニ卵について行つたが、その結果は発生に要する時間の差以外は全く同一であるので、ここにはコシダカウニについてのみ記述を行う。コシダカウニの無処理卵を対照とした

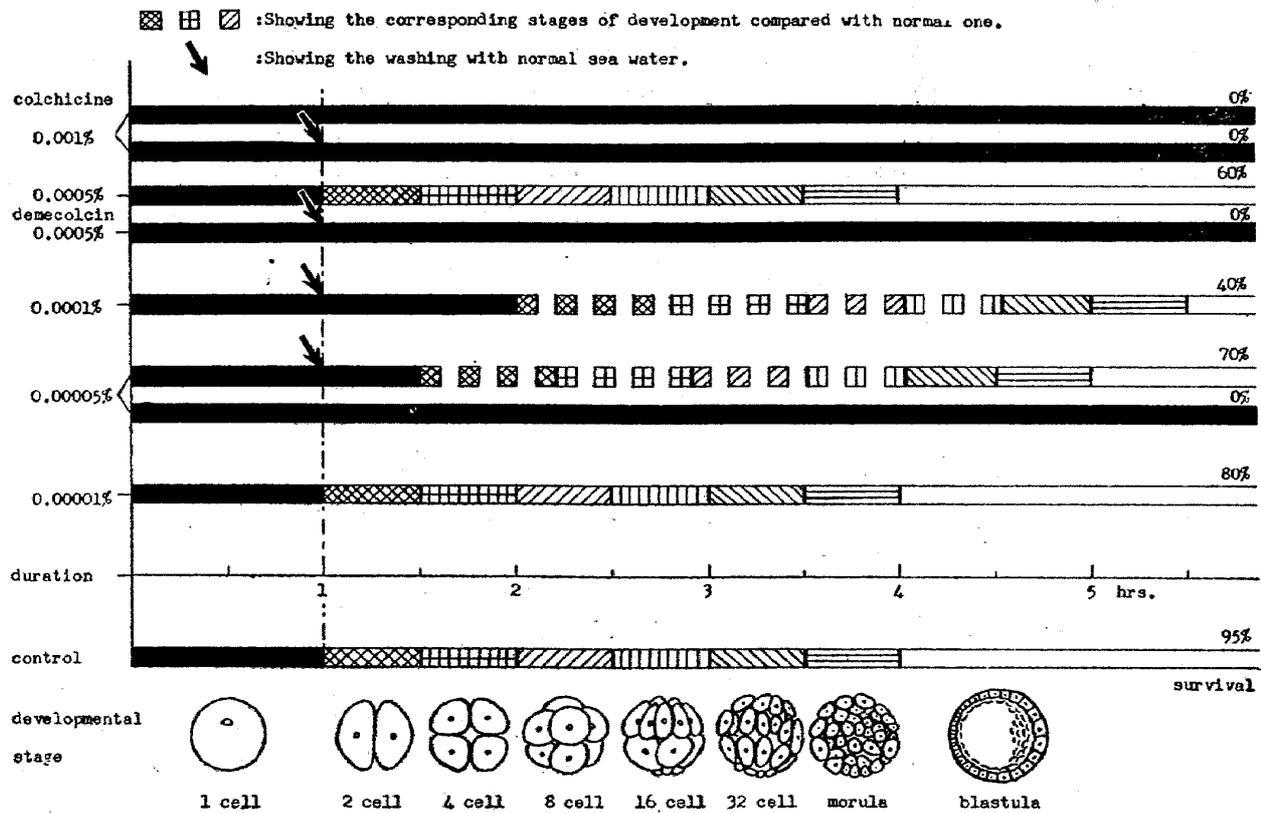


Fig. 2. Concentrations of demecolcin and colchicine used, and process of development.

が、その正常な発生過程は第 2 図及び第 3 図に示すように、水温 28°C に於ては媒精から第一卵割までは約 1 時間、その後の卵割の間隔は約 30 分、従つて約 3 時間半で桑実胚となり 4 時間で胞胚となつて、やが

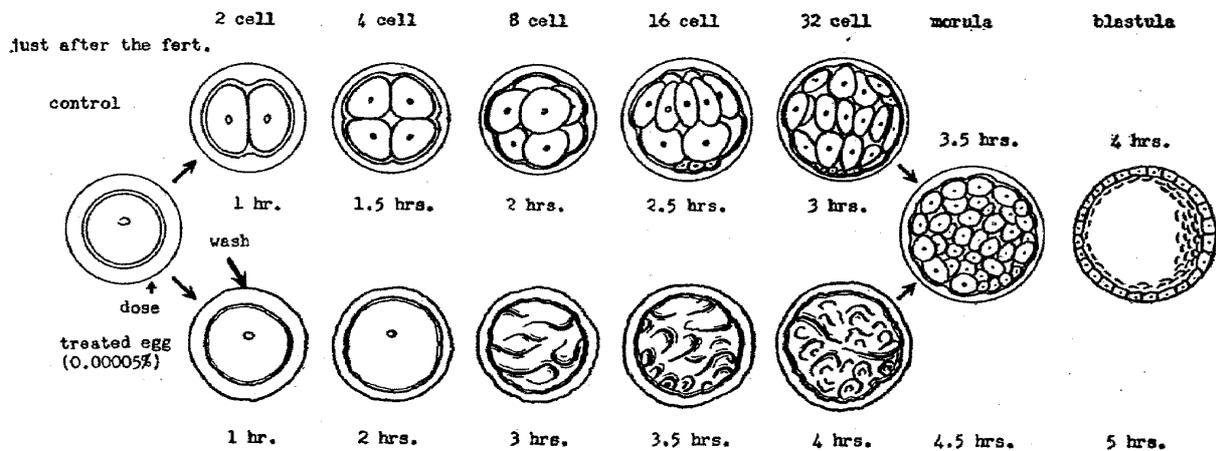


Fig. 3. Cleavage process in normal eggs and abnormal one in demecolcin treated eggs after washing with sea water. water temp. 28°C.

て受精膜を脱して遊び出す。薬剤を作用させた場合は、ある濃度以上になると卵割が抑制されるが、この卵を対照の無処理卵が第一卵割を行つた時期に正常海水で数回洗滌した後に正常海水に移すと、コルヒチンでは卵割が再開せず遂には崩壊してしまうのに反し、デメコルチンでは或る濃度に於ては卵割が再開する。これらの作用は個々の卵によつて多少の差が見られるが、70% 以上が明らかに作用を受けた場合を+、作用を受けなかつた場合を一で示すと、これらの薬剤と濃度との間には第1表に示すような関係がある。

即ち、コルヒチン処理の場合は、0.0005% 以下の濃度で卵割は殆ど抑制されずに、無処理卵とほぼ同じ速度で発生が進行する。これに対して 0.001% の場合は殆ど総ての卵は既に第一卵割から抑制され、稀に長時間を要して第一卵割を完成するものがあつても、それ以後の卵割は全然行われぬ。かように卵割の抑制された卵の内部には、核は認められるけれども星状体も紡錘体も全く認められぬで、長時間放置すると細胞質に疎密な部分を生じ、やがて細胞質は不規則な大小の塊状にわかれて最後には崩壊する。0.001% コルヒチンで卵割を抑制した卵を海水で洗滌しても分裂は再開せず、内部に於ても核分裂は認められない。

デメコルチン処理の場合は 0.00005% 以上の濃度では卵割は殆んど完全に抑制され、内部に於ける星状体並びに紡錘体は認められない。かような卵を長時間放置するとやがて細胞質の崩壊を来すことは 0.001% のコルヒチン処理の場合と全く同様である。また 0.00001% 溶液では卵割は抑制されず、発生過程は無処理卵に於けると殆んど同じ速度で進行し何等異常は認められない。分裂の抑制された卵のうちで 0.0005% 以上の濃度の溶液で処理されたものは無処理卵の第一卵割の時期に於ける正常海水の洗滌によつても卵割能力を恢復しないが、0.0001% 及び 0.00005% の濃度で処理したものは(写真1)、この洗滌後1時間で核分裂の再開が認められる。この核分裂には通常卵割が伴わないために卵は多核となり、時間の経過と共に核の数が増加することが認められ(写真2)、また時としては多極分裂の行われることも外部からうかがわれる。このような核分裂が続

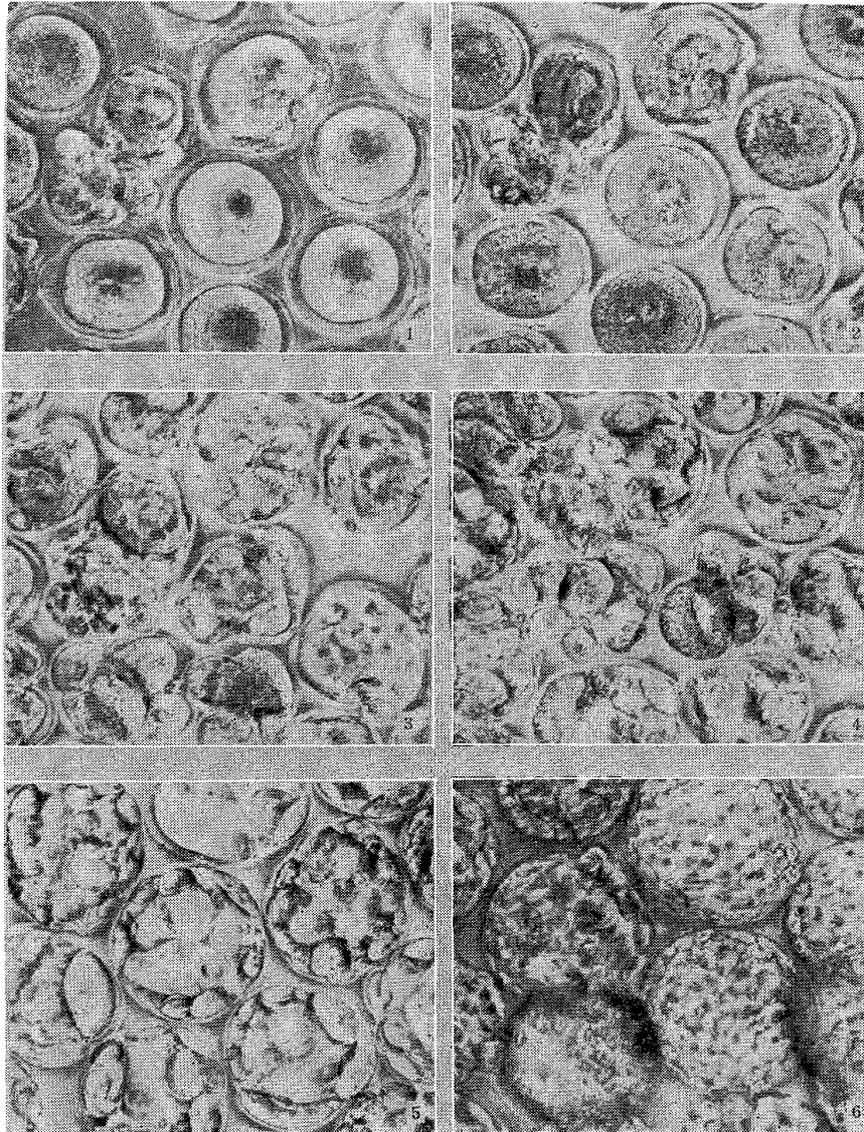


Fig. 4. Cleavage process of demecolcin treated egg (at 0.00005%) after washing of normal sea water. Phase contrast photomicrographs. $\times 60$.
1. washing (1 hr. after fertilization). 2. 1 hr. after washing.
3. 2 hrs. 4. 3 hrs. 5. 3.5 hrs., morulae, nearly normal. 6. 4 hrs., normal swimming blastulae.

行される間に卵割能力が次第に恢復され、卵の表面から割溝が不規則に入るが、始め割溝は卵の内部深くには達しない (写真 3)。しかし間もなく卵は大小さまざまな割球に分割され (写真 4)、時間の経過に伴って次第に割球の大きさは等しくなり殆んど正常胚に近い桑実胚を形成し (写真 5)、更に胞胚期には胞胚の表面に絨毛を生じ、やがて受精膜を破つて泳ぎ出す (写真 6)。

考 察

(1) 卵割抑制濃度

ウニ卵に対するコルヒチンの作用については Nebel & Ruttle ('38), Beames & Evans ('39, '40) Cornman & Cornman ('51), Swann & Mitchison ('53) 等の研究があるが、これらの研究に於て卵割の抑制効果をあらわした濃度は 2.5×10^{-5} M 乃至 5×10^{-4} M である。また chaetopterus の卵母細胞の第一分裂抑制に井上 ('52) が用いた濃度も 5×10^{-4} M であつた。今回の実験に用いたコルヒチンの卵割抑制最低濃度は 0.001% (2.5×10^{-5} M) で Swann & Mitschison の用いた濃度に等しい。Nebel & Ruttle は更に低い濃度 (10^{-6} M) でも多少の影響を認めているが、今回の実験では抑制最低濃度の 1/2 の濃度 0.00005% (1.25×10^{-5} M) で既に殆んど全く卵割遅延等の影響を認めなかつた。

ウニ卵に対するコルヒチンの作用は核分裂の時期によつて異なり、中期後期に作用させた場合には、分裂装置は破壊されてもその核分裂は続行し卵割もおこなわれるが、それ以後の分裂が阻止されることが知られている (Beames & Evans; Swann & Mitchison, loc. cit.), 今回の実験では受精直後に作用させたので、その時期は核分裂の前期に当るので、第一回の核分裂並に卵割が抑制されたのは当然である。コルヒチンの作用の可逆性については井上 (loc. cit.) が chaetopterus の卵母細胞の第一成熟分裂を抑制した後に正常海水で洗滌した場合、紡錘体が後に正常の大きさに恢復して受精可能になることを報告し、Beames & Evans も低濃度のコルヒチンでは洗滌後に異常分裂が行われることを認めている。今回の実験では卵割抑制の最低濃度でも海水洗滌後にかような核分裂並びに卵割能力の恢復は殆んど認められなかつた。しかしこの実験では作用させた時期が受精直後であり、また洗滌も約 1 時間コルヒチンを作用させた後であるから、材料も異なり作用時間も同一でない他の実験と直接対比させることは不可能であるが、今回の実験の条件の下ではコルヒチンの作用は不可逆的であると云うことができる。

デメコルチンの動物細胞に対する作用はコルヒチンと同様であるが、動物体に対する一般的毒性はかえつて弱く 1/30 と云われ、白血病に多少の効果が認められるという (Eigsti & Dustin, p. 143 より、及び Moeschlin, Meyer & Lichtman ('53))。今回の実験の結果はウニ卵の卵割を抑制する最低濃度は 0.00005% (1.25×10^{-6} M) で、コルヒチンの 1/20 であるから、その作用はコルヒチンに比して遙かに強いと云える。正常海水の洗滌による分裂再開はこの抑制最低濃度に於けるばかりでなく、その 2 倍の濃度即ち 0.0001% に於てすら認められ、コルヒチンの作用が不可逆的であることに対して著しい対比をなす。コルヒチンの作用が或る濃度に於て可逆的であるとしても、すくなくともデメコルチンの場合はコルヒチンよりも可逆的に作用する濃度範囲が遙かに広いと云うことはできるであろう。

(2) 異常卵割

ウニ卵にコルヒチンその他種々な分裂装置を破壊する薬剤を作用させた後、正常海水で洗滌すると分裂装置がある程度恢復し不規則な卵割がおこることは知られたところである。デメコルチンでは 0.0001% 及び 0.00005% でこれと同様なことが認められるが、コルヒチンその他の薬剤の場合には胚は正常化することなく結局は殆んど死滅するのに対し、デメコルチンの場合は最初は卵割が不規則であり且不十分であるにも拘らず、卵割が繰り返される間に割球の大きさがほぼ正常胚と等しくなり、胞胚に於ては構造上正常胚と何等差異が認められず、受精膜を脱して泳ぎ出す。このような現象は Wilson ('01) がエーテル海水でラツパウニ卵を処理した場合と非常によく似ている。このことはデメコルチンの作用が分裂装置破壊について単に可

逆的なばかりでなく毒作用の弱いことを示すものと云えよう。

デメコルチンによつて抑制された卵割が洗滌によつて再開する場合は、まず核分裂が数回行われて多核卵となつてから行われるのであつて、第一回の核分裂にともなつてすぐに割溝の生じることが殆ど認められない。かような多核卵では核は卵の中央部に集まることなく卵の中に散在し、従つてその後の核分裂の紡錘体は卵の比較的表層に近く存在する。割溝はこのような場合紡錘体に関係して生じるように思われるがこの点に関して第二報に於て詳しく報告する予定である。

摘 要

1. ウニ卵の卵割に対するデメコルチンの作用をコルヒチンと比較して検討した。
2. 受精直後のウニ卵の卵割を抑制する最低濃度は 0.00005% で、コルヒチンの 1/20 である。
3. 卵割の抑制された卵を、無処理の対照卵が第一卵割を行う時期に正常海水で水洗したが、コルヒチンでは卵割抑制最低濃度で処理した卵でも卵割は再開しなかつたのに対し、デメコルチンは最低抑制濃度のみならずその倍の濃度で処理した場合も卵割は再開する。
4. 卵割再開に際しては、最初核分裂のみが再開し、多核卵になつてから始めて不規則且不完全な卵割がおり、時間の経過とともに胚は正常化し、正常と同じ桑実胚、胞胚となり、受精膜を脱して泳ぎ出す。
5. 以上からデメコルチンはコルヒチンよりも分裂抑制作用は強く、胚に対する毒作用は弱いといふことができる。

文 献

- Beames, H. W. & T. C. Evans, '39 Biol. Bull., 77, 328. ———— & ———— '40 Biol. Bull., 188-198. Cornman, I. & M. E. Cornman, '51 Ann. N. Y. Acad. Sci., 51, 1443-1487. Eigsti, O. J. & P. Dustin, Jr. '55 Colchicine, 143. Inoue, S. '52 The chemistry and physiology of the nucleus., 305-318. Moeschlin, S., H. Meyer & A. Lichtman, '53 Schweiz. Med. Wschr. 83, 990-994. Nebel, B. R. '37 Biol. Bull., 73, 351-2. ———— & M. L. Ruttle, '38 J. Hered., 29, 3-9. Swann, M. M. & J. M. Mitchison, '53 J. Exp. Biol., 30, 506-514. Wilson, E. B. '01 Arch. Entw., 13, 353-395.

Résumé

The Cleavage Inhibition and Abnormal Cleavage of Sea-Urchin Eggs induced by Demecolcin. I.

Naomasa KOBAYASHI and Kenji NAKAMURA

Zoological Institute, College of Science, Kyoto University.

The inhibition effect of "demecolcin", one of the derivatives of colchicine (made by CIBA Limited, Basle), on the cleavage and the karyokinesis of sea-urchin eggs, *Mespilia globulus*, are studied in comparison with that of colchicine. The minimal concentration of demecolcin which suppresses the cleavage is $5 \times 10^{-5}\%$, 20 times less than that of colchicine as far as the inhibition effect is concerned. The eggs treated with these reagents at concentrations stronger than the minimal con-

centration were washed and transferred to the normal sea water when untreated eggs (control) accomplished the 1st cleavage. It was found that the eggs treated with colchicine do not recover from the inhibited state while those treated with demecolcin at concentrations of $5 \times 10^{-5}\%$ and of $10^{-4}\%$ the nuclear division commences. This means the restoration of karyokinetic ability. The nuclear division took place successively in the washed egg but the cytokinesis did not accompany with early several karyokineses. With the lapse of time irregular and incomplete cleavage furrows appeared, the eggs are cleaved into messes of irregular blastomeres and then they are transformed into morulae of almost normal shape. Finally, these morulae became normal blastulae which hatched out from the fertilization membrane and swam as freely as the normal embryos. This fact would indicate that the toxicity of demecolcin is far less than that of colchicine at least at the minimal concentration of cleavage inhibitions.

会 記 II.

北海道支部大会(つづき)

- 薬品処理時における腫瘍細胞内ミトコンドリアの行動岡田 正 (北大・理・動)
- 冷凍腹水肉腫の染色体調査佐々木本道 (北大・理・動)
- MTK - 腫瘍 IV の少数細胞移植における分葉核形成細胞唯是 洋子 (北大・理・動)
- Methylcholanthren 皮下注射によりシロネズミに生じた紡錘形細胞肉腫
の細胞組織学的観察佐藤 晶子 (北大・理・動)
- ハツカネズミに継続移植された MTK—肉腫の行動と染色体の調査大貫 泰 (北大・理・動)
- 札幌近郊における *Paramecium* (ゾウリムシ属) の分布と季節的変遷につ
いて林 新治 (北大・理・動)
- 桑に寄生するダニ類 (予報)江原昭三 (北大・理・動)
- 銭函の瀝水で発見されたハウネンエビ科について菊地 昶史 (北大・理・動)
- チャイロスズメバチ *Vespa dybowskii andre* の生態について坂上 昭一 (北大・理・動) 福島 邦一 (長野下伊那)
- Relative index system によるリンゴハダニの寄生に対するリンゴの品種
間差異の検討森 はん須 (北大・理・動)
- ハバヒロビルの生殖習性について長尾 善 (北大・理・動)
- アカイエカの産卵場所選択について鈴木 健二 (北大・理・動)
- 奥尻島の鼠類大田嘉四夫・高津昭三 (北大・農・動)
- 貧栄養型湖における鱒類の食性 (予報)犬飼 哲夫・井上 聰 (北大・農・動)
- 組織培養法による仁の構造の研究堀 浩 (北大・理・動)
- プラナリア組織に於ける類種物質の分布山本 正 (北大・理・動)
- 染色・位相差・電顕像よりみたるヤツメ精子の形態・構造狩野康比古 (北大・理・動)
- 癌 の 進 化牧野佐二郎 (北大・理・動)
- 特別講演 アメリカの癌研究所田中達也 (北大・理・動)