日本遺傳學會第七回大會講演

家兎卵子に於ける第二極體の形成と精子侵入との關係 特に精子の蛋白質分解酵素の存在證明¹⁾

山 根 甚 信

臺北帝國大學理農學部畜產學教室

緒 言

卵子の極體形成が動物の種屬を異にするに従ひ其時期區々にして (1) 兩極體共精子侵入前に形成せられるもの (2) 兩極體共精子侵入後に形成せられるもの (3) 第一極體は精子侵入前に放出せられ第二極體が精子侵入後に初めて形成せられるものの三部類に分たる。哺乳動物の卵子は此の第三の部類に屬するものの如く Gerlach (1890), Sobotta (1895, 1907), Rubaschkin (1905), Sobotta & Burckhard (1910), Lams (1913) 等の主として啮齒類に就ての觀察あり。斯くの如く哺乳動物に於て第二極體が精子の卵子内侵入後にのみ形成せらるゝとせば兩現象の間に因果關係ありや否やは先づ決すべき問題なり。而して若し因果關係ありとせば其本態の何物なりやは次で究むべき問題なり。予は此見地より家兎を以て實驗し此の兩現象の間に因果關係あるを認め、然も精子が一種の蛋白質分解酵素を含有し之を以て卵子内に侵入する結果卵原形質に變化を及ぼし第二極體の形成を促すものならんとの推論に到達し其概要を 1930 年 Cytologia 誌上に報告せり。其後實驗を重ねるに従ひ益々精子の蛋白質分解作用を確證し現今にては精子より一種の Dipeptitase を檢出し得るまでに至れり。本講演は之等の實驗の綜括なり。

抑々前世紀の末葉より現今に至るまで哺乳動物發生學者の輩出に拘らず、今尙其受精機構の不明なる所以は他なし (1) 受精が體內にて行はれること (2) 精子及卵子を隨時體外に取出し體外にて人工受精を行ひ之を直接觀察する技術の進まざりしこと (3) 哺乳動物卵子は其數僅少且微細にして之を一個宛生體觀察し又は切片標本とする技術の至難なる事等是なり。然るに家兎に於ては排卵は偶發に非ずして交配の刺激により行はれるが故に之を以て實驗せば生活せる卵子を隨時體外に取出すは極めて容易なり。即ち若し不受精卵を得んとせば發情期の雌兎に輸精管結紮雄兎を交配し又、受精卵を得んとせば正常雄兎を交配す。然る時は排卵は交配約 10 時間後に行はるゝを以て交配 13 時間以後には常に輸卵管内に不受精若くは受精の成熟卵子を見出すものなり。之を Tyrode 液に入れ孵卵器中に體溫度に保てば此儘にても少くとも 7-8 時間は生活機能を保持し得べく若し軌近進歩せる組織培養の技術を應用せば二分割期までも培養し得。又精子の體外保存は予等の年來研究せる所にして家兎精子は糖磷曹調節液内にて 24-30 時間受精能力を保持せしめ得るに至れるを以て不受精卵を體外に於て受精せしむること溫血動物に於ても可能なり。卵子の大きさに就いて一言せんに家兎の成熟せる卵細胞の直經は約 110-120 μ にして僅に肉眼に認め得る程度なり。従て卵子の生體觀察手術固定等は總て双眼顯微鏡下にて行

1) Yamane, J., Die Abhängigkeit der Bildung des zweiten Richtungkörpers vom Eindringen des Spermatozoons in die Eizelle beim Kaninchen. Nachweis der dem Spermatozoon innewohnenden, proteolytischen Fermente. 本研究の一部は北海道帝國大學にて帝國競馬協會の委託試験費により、一部は臺北帝國大學に於て帝國學士院の研究補助金により行ひたり。帝國競馬協會並に帝國學士院に對し深厚なる謝意を表す。

ふを要す。第1圖は家兎の新鮮卵子を蠶の繭絲にて結紮せるを示すものにて繭絲の太さと對比すれば卵子の大きさを推想し得ん。

第1圖 家兎の新鮮卵子を蠶の繭絲にて結紮せるもの。之により卵子の大きさを推想し得べし。

1. 成熟卵子と Follikelzellmasse

實驗の經過を理解し易からしめんため先づ家兎成熟卵子の卵巢内に於ける状態竝に排卵直後の状態を説明せん。卵子は所謂 Graaf 氏卵胞内に含まれて少々偏在し(第2圖) Zona pellucida と稱せられるゼラチン様の卵膜に包まれ卵膜の周囲には Corona radiata なる放射狀に並列せる細胞層あり。卵膜は即ち此細胞層の液化變形せるものにして此の細胞の下部は卵膜の表面と緊密に癒着す。故に之を硝子針にて剝離せんとするも除去困難にして剝離後は卵膜の表面絨毛狀を呈し粗面となる。而して Corona radiata の細胞 (Corona 細胞と略稱す) 相互間の關係も緊密な

第2圖 成熟せる Graaf 氏卵胞の断面圖解。

り。Corona radiata を包圍せるは Stratum granulosum の細胞にして是が液化して Graaf 氏卵胞内腔の大部分を占有せるは則ち Liquor folliculi なり。家兎に於ては併し Liquor folliculi は決して液狀を呈せず細胞の變質して生ぜる粘稠なる膠狀物質なり。従て排卵に際しては卵細胞は卵膜のみならず Corona radiata, Str. granulosum の細胞及び Liquor folliculi の膠狀塊に包まれたるま

まにて輸卵管内に出現す（第4圖）予は爾今記載に便にせんかため *Corona radiata* 以外の細胞群及び *Liquor folliculi* を總稱して *Follikelzellmasse* と呼ぶ。

2. 正常交配に於ける極體放出の時期

正常交配に於ける兩極體放出の時間的關係に就ては目下實驗中に屬すれども本研究に必要な範圍は既に判明す。即ち第一極體の放出は交配後 10 時間内外なるものの如く交配後 13 時間に輸卵管内にて採取せる卵子は悉く第一極體を保有し又此時間に成熟 Graaf 氏卵胞内に残留せる卵子 (*atretisches Ei*) も同様に之を有す。交配 13 時間後には第一極體と略同大の第二極體を見るのみならず尙此の外に極めて小なる第三極體即ち第一極體より分離せるものを認む。此第二成熟分裂は實際は尙ほ早期に行はれるも茲に掲げしは最も晚き *Termin* なり。交配 24 時間後には受精卵子は既に第一分割を終り卵膜と分割細胞との空隙 (*perivitelline space*) には 3 箇の極體を見る。

3. 精子侵入と極體形成との關係

輸卵管結紮雄兔を交配し卵巣より放出せしめたる不受精卵子は交配後 20 時間以上經過するも第二極體を形成せず排卵時有せる第一極體を見るのみなり。更に交配後 23 時間以上經過せば卵膜は萎縮し卵子は既に生活力を失へるかの觀を呈す。又不受精卵子を試験管内に培養するも

第3圖 體外にて人工受精せる卵子の斷面・右邊には第一極體を認め卵原形質内には4個の精子頭を見る。*Corona* 細胞間隙に突入せる精子の群列に注意せよ。

交配後 20 時間以上にて第二極體の形成行はるゝことなし。然るに之を人工受精する時は第二極體を放出す（體外培養にては中途に死滅又は生活力を減退する卵子もあるにより例外あり）。即ち第二極體の放出は精子の卵子内侵入によりて促さる。予の 1930 年の豫報に於ける體外人工受精の生體觀察に於て果して精子が卵子に侵入せりや否やに就き G. Hertwig (1931), Pincus &

Enzmann (1932) は疑を懷けども切片標本により精子頭若くは精子核の存在を確證し得るのみならず顯著なる Polyspermie さへ起るを認む (第3圖) るにより試験管内にても精子が卵子内に侵入し得るは疑ふの餘地なし。

4. Follikelzellmasse 及び Corona radiata に及ぼす精子の作用

若し果して第二極體放出と精子侵入との間に因果關係ありとせば吾等は次に其の Kausalität を追究せざるべからず。然して實驗の中途に於て圖らずも之が解決の關鍵と思惟せられる精子

第4圖 交配13時間後に放出せられたる不受精卵子(下端の暗色圓形像)。之を包圍せるは Follikelzellmasse にして精子棒にて左側上方に引き粘り性強き事を示す。

第5圖 6時間半體外培養せる不受精卵子・卵細胞上部に第一極體を有し卵膜周囲には Corona 細胞が尚ほ粘着せるを示す。

の Follikelzellmasse 及び Corona radiata に對する特異作用を観察せり。即ち Follikelzellmasse は極めて粘稠にして硝子面にさへ糊着し易く（第4圖）Corona 細胞は相互間緊密なるのみならず卵膜との剝離困難にして此の状態は試験管内に6時間以上培養するも變化せず（第5圖）。然るに之に精子を注加するときは Follikelzellmasse は先づ大小無數の塊片に分裂崩壊するも遂には分散して細胞は器底に完全に沈澱し卵子は Follikelzellmasse より離脱す。又 Corona 細胞は分散せざるも相互の關係極めて疎となり卵膜より之を剝離すること極めて容易なり。次に斯くの如き受精の影響が生体内に於ても起るや否やを見んがため一方には正常雄兎を他方には輸精管結紮雄兎を配したる雌兎を交配12時間後より約1時間宛の間隔を置いて屠殺採卵し受精卵と不受精卵の Follikelzellmasse 及び Corona radiata を比較するに體外人工受精の場合と全く同一の現象を認めたり。即ち不受精卵は交配15時間後にも排卵當時（即ち交配10時間後）と何等異なる所なく卵子は粘稠なる Follikelzellmasse により取囲まれ Corona 細胞と卵膜の關係又緊密なり。交配18時間後に至れば Follikelzellmasse の状態區々にして卵子は或は之に包まれ或は其の邊緣に位するも約63%は之より離脱す（第6圖）。併し輸卵管洗滌液中には排卵時と大差な

第6圖 交配18時間後に輸卵管より採取せる不受精卵子。Follikelzellmasse より分離せるも Corona 細胞は固着す。

き Follikelzellmasse を認む。交配20時間後には卵膜は卵白層に包まれ始めるも尚ほ兩者の間に Corona 細胞の點々として介在するを見る。受精卵は之に反し交配13時間後既に其66%は Follikelzellmasse より分離し Corona 細胞も少量が緩かに結合せるのみなり（第7圖）。

交配17-18時間後には Corona radiata は全く消失し卵膜は裸出し其表面圓滑にして Corona 細胞附着の痕跡を留めず。交配20時間後には不受精卵同様卵白層に包まれ始めるも Corona 細胞の介在を見ず。斯くの如く卵子の體外にあると體內にあるとを問はず受精により Follikelzellmasse と Corona 細胞の性狀が一變することは此兩者の精子に對する一反應と認めざるべからず。

第 7 圖 交配 13 時間半後に輸卵管より採取せる受精卵子。Follikelzellmasse より分離せるのみならず Corona 細胞の大部分を失ふ。

5. 精子の蛋白質分解作用

受精卵に於ける Follikelzellmasse の分散は之に凝集せる精子の運動に因る理學的のものゝ如く考へられざるに非ざるも Follikelzellmasse を硝子針を以てしても除去すること困難なるのみならず Toluol を以て死滅せしめたる精子を注加せる場合生活精子と同様 Follikelzellmasse を分散する能力あるより觀れば精子の理學作用は二次的にして一次的には Follikelzellmasse の粘稠性を低減せしむる化學作用なるを認めざるを得ず。然則精子の斯かる化學作用とは如何なるものなりや。吾等は未だ Follikelzellmasse を構成する化學物質の何物かを知らざるも唯其基體が St. granulosum の細胞の變質による産物にして其粘稠なる點より Ovomukoides の如き蛋白質物な

第 8 圖 精子浸出液を注加せる不受精卵子。Follikelzellmasse は完全に分散し Corona 細胞は剝離し易く卵細胞は顯著なる Cytolyse を示す。

るべしと想像し得るのみ。されど Follikelzellmasse の分散, Corona 細胞の剝離, 卵膜表面の圓滑化等の現象は畢竟斯かる蛋白質の分解による粘度の變化なることは推想に難からず。實際に於て精子を Tyrode 液にて浸出し遠心分離せる上澄液のみを不受精子に加ふるに其作用は生活精子よりも一層強烈にして殆んど瞬間的に Follikelzellmasse を分散し Corona 細胞は離開し易くなり卵膜は脆弱となり卵原形質も顯著なる Cytolyse を示す(第 8 圖)。

更に此浸出液につき試験するに煮沸により其作用を失ひ Kaolin によりて吸着せらる。之等の事實より推せば精子は一種の蛋白質分解酵素を含むものと認め得べく所用 Tyrode 液の水素イオン濃度は $\text{pH}=7.7$ なるにより恐らく Tryptase ならんと推定せられ、今日にては精子浸出液が Dipeptide を分解する性能あるを證し得たり。

茲に一言すべきは不受精子に於ても受精卵より遙に遅れるとは云へ Follikelzellmasse, Corona 細胞共に脱落することなり。此場合は然し Follikelzellmasse の分散は Autolysis 以外には起らず交配 20 時間後にも尙ほ輸卵管内に排卵時と殆んど異ならざる形にて現る。即ち受精せざる卵子が Follikelzellmasse 及び Corona 細胞の包圍より脱却するは理學的にして恐らく輸卵管の蠕動と其粘膜表面の纖毛運動に因るものとなるべし。又受精卵に於ても卵細胞に向つて遊走する精子が Corona 細胞の間隙に突入して恰も楔の役目をするによりて其の離脱を容易ならしむ(第 3 圖)。然れども總て之等の理學作用と上述の精子の化學作用とは判然と區別するを要す。

6. Pancreatin による第二極體の形成

若し卵子の第二極體形成が精子の侵入と因果關係あり又精子が Tryptase を含有し受精に際して之を卵子内に搬入することが事實とせば他の Tryptase を卵子に作用せしめ、以て人工的に第二極體を形成せしむること又不可能に非ざるべし。實驗によるに第一極體のみを有する不受精子を Pancreatin 溶液(Merck 製 Pancreatin absolutum 0.15 g 100 c.c を Tyrode 液に溶解せるもの)を以て 8 乃至 10 分間處理し更に Tyrode 液に移入して 37°C の體溫に保つ時は明かに第二及び第三極體を形成し其像は受精卵子に於けると何等異なる所なし。

第 9 圖は即ち此經過を示す一例にして卵膜の上半球を硝子針にて切除したるものなり。(a) に於ては第一極體を明瞭に認むるのみならず其右脚下に僅ながら卵細胞の突隆せるは第二極體放

第 9 圖 不受精子が pancreatin の作用により第二極體を形成する状を示す。(a) 第一極體と其右脚下に第二極體放出の部位を暗示する卵原形質の隆起を見る。(b) 此部位にて第二極體が放出の半途にあり。

出の準備にあるを示し (b) には既に此位置に第二極體を放出しつつあるを明示するものにして第二極體形成と精子侵入との關係が精子内に含まるゝ蛋白質分解酵素の作用に因るとの論據に重要な支持を與ふるものと言はざるべからず。

7. 結 語

第二極體の形成が精子によるにせよ又單なる化學藥品によるにせよ蛋白質分解酵素の作用によりて起る理由の説明に就ては今後尙幾多の實驗を必要とす。本講演は併し斯かる細論に入るを目的とするに非ず唯精子が蛋白質分解酵素を含み受精に際して之を卵細胞内に運び入れる事實を指摘せんとするものなり。彼の動物の受精現象に關して劃期的發見をなせる J. Loeb は海膽の卵子が精子侵入により受精膜 (fertilization membrane) を形成すること及び受精膜が酪酸の如き脂肪酸によりても人工的に形成せられ得る事實より精子は Lipoid 溶解性の化學的物質所謂 Lysin を含み之を卵子内に搬入すと結論せり。海膽卵子の受精膜形成と家兎卵子の第二極體形成が本質的に異なるは言ふを俟たざるも精子侵入に對する卵原形質の反應なる點に於ては軌を一にす。而して其 Aktivator たる精子の擔ふ化學的物質が彼に於ては lipolytisch にして是に於ては proteolytisch なるの差異あり。又 J. Loeb の Lysin は假想的のものにして之を精子より直接抽出したるに非ざるも本研究に於ては既に精子浸出液より Dipeptide を分解する酵素を検出し得るまでに至れり。即ち哺乳動物卵子に於ては特有の受精機構あるを察知し得べし。又茲に謂ふ所の蛋白質分解酵素は遺傳因子を酵素なりとする學說の論據となる程特異性を有するものに非ざるも少くとも生殖細胞たる精子が實驗的に檢出し得る酵素を含み之を卵子内に搬入するの事實は受精惹いては遺傳の機構を理化學的に説明する時期に歩一歩近接し得る可能性あるを示すものと云ひ得べし。

附記：本稿は 40 餘枚の幻燈板にて行ひたる講演の要旨なるを以て形態上の變化に就ては記述のみにては意を盡さざる憾あり又都合により順序を變更し内容を取捨したる點少からず諒讀を得は幸なり。尙本研究に關係する詳細は次の諸報告を參照せられたし。

- Yamane, J., & Egashira, T., 1925, On the relation of copulation to ovulation in the rabbit as shown by means of artificial insemination. Journ. Jap. Soc. Veter. Sci. Vol. 4, No. 2.
- Yamane, J., & K. Kato, 1928, Ueber die Wasserstoffionenkonzentration des Spermas beim Pferde und ihr Wirkungsoptimum auf die Vitalität der Spermatozoen beim Pferde und Kaninchen. Ztschr. f. Tierzücht. u. Züchtungsbiol. Bd. 12, H. 3.
- Yamane, J. & Kato, K., 1928, Ueber die Befruchtungsfähigkeit der in der mit Phosphat gepufferten Dextroselösung konservierten Spermatozoen beim Kaninchen. Biol. Zentralbl. Bd. 48, H. 8.
- 山根甚信：1929, 家畜人工授精術の研究と其實用上竝に學術上の意義に就て。札幌農林學會報。第 92 號。
- Yamane, J., 1930, The proteolytic action of mammalian spermatozoa and its bearing upon the second maturation division of ova. Cytologia Vol. 1, No. 4.
- Yamane, J., 1935, Kausal analytische Studien über die Befruchtung des Kanincheneies. I. Die Dispersion der Follikelzellen und die Ablösung der Zellen der Corona radiata des Eies durch Spermatozoen. Cytologia Vol 6, Nos. 2-3.