

両生類の生活環に対する強磁場の影響－卵成熟に対する影響－

広島大・院理・両生類研 古野伸明、広島大・附属高校 夫津木大輔、川崎大志、白神聖也、
大阪大谷大・薬 谷本能文、広島大・院理・両生類研 柏木啓子、愛媛大・沿岸環境科学研究
センター 鈴木賢一、ISAS/JAXA 山下雅道、山陽女子短大・臨床検査 柏木昭彦

Effect of strong static magnetic fields on the amphibian life cycle – Effect on oocyte maturation of *Silurana tropicalis* –

Nobuaki Furuno^a, Daisuke Futsuki^b, Taishi Kawasaki^b, Masaya Shiraga^b, Yoshifumi Tanimoto^c, Keiko Kashiwagi^a, Kenichi Suzuki^d, Masamichi Yamashita^e, Akihiko Kashiwagi^f

^aInstitute for Amphibian Biology, Graduate School of Science, Hiroshima University, Higashihiroshima, Hiroshima 739-8526, Japan ^bHiroshima University Highschool, Hiroshima, Hiroshima 734-0005, Japan ^cFaculty of Pharmacy, Osaka Ohtani University, Tondabayashi, Osaka 584-8540, Japan ^dCMES, Ehime University, Matsuyama, Ehime 790-8577, Japan ^eInstitute of Space and Astronautical Science (ISAS), Japan Aerospace Exploration Agency (JAXA), Sagamiara, Kanagawa 229-8510, Japan ^fSchool of Medical Technology, Sanyo Women's College, Hatsukaichi, Hiroshima 738-8504, Japan

E-mail: nfuruno@hiroshima-u.ac.jp

Abstract: In the present study, we investigated the effects of a strong static magnetic field (SMF) on oocyte maturation in *Silurana tropicalis*. First of all, we confirmed that oocyte maturation is triggered by progesterone, and this triggering is required for translation but not transcription. Under SMF the kinetics of initiation of oocyte maturation, as judged by the appearance of a white spot in the animal hemisphere, was found to be essentially the same as for controls. Cytological examination of treated specimens showed that the first polar body was excluded and spindle of meiosis II was successfully formed. However, as maturation proceeded, distribution of the pigment in the vegetable hemisphere became abnormal. The most of the white band characteristic of stage VI oocytes descended toward the vegetal pole and the rest of it invaded animal hemisphere. These results suggest that SMF might affect the progression of oocyte maturation.

Key words: *Silurana tropicalis*, strong static magnetic fields, oocyte maturation, spindle, pigment distribution

宇宙へ人類が進出するための準備として、地上とは異なる環境、つまり宇宙環境に適応できるかどうか

あらかじめ調べておくことが重要である。その宇宙環境には、地上とは違った重力や磁場が含まれる。

それらの影響を調べるためのモデル生物の中で、ツメガエルは大変適した動物であると考えられる。その理由は、季節に関係なく卵が大量に得られることや、体外受精であるため受精からその発生過程を容易に観察できるからである。今までに我々は、その利点をいかして、過重力や強磁場が初期発生にどのような影響を与えるかを調べてきた。その結果、過重力や強磁場は初期胚に多大な影響を与えることを示してきた^{1), 2)}。

十分に成長した卵母細胞は第一減数分裂の前期で停止しており、その内部に卵核胞と呼ばれる巨大な核が存在する。この卵母細胞は、ホルモン刺激などによって減数分裂を再開し、脊椎動物の場合、第二減数分裂の中期で再度減数分裂を停止する。この第二減数分裂の中期で停止した卵母細胞が未受精卵であり、この第一減数分裂の前期から第二減数分裂の中期までの過程を卵成熟と言う。このように、卵成熟とは、卵減数分裂の一部の過程であり、卵母細胞が受精可能な未受精卵に変化する重要なステップである³⁾。

ツメガエルの場合、卵成熟誘起ホルモンであるプロゲステロン処理を行うと卵成熟が開始し、卵核胞が崩壊する。この時、動物極に白い斑点が生じる。この白斑は外から容易に観察されるので、卵成熟が開始したかどうかの良い指標となる。その後、染色体が凝縮し紡錘体が形成される。続いて第一極体が放出されて第一減数分裂が終了し、DNA複製をスキップしてただちに第二減数分裂へ進み、第二減数分裂の中期で再度停止して受精を待つ。今までに我々は、過重力が卵成熟にどのような影響を与えるかを調べてきたが^{4), 5)}、強磁場がこの過程にどのような影響を与えるか今まで報告がない。本研究ではニシツメガエル卵母細胞を用いて卵成熟過程に強磁場を印加してその影響を調べた。

1. 卵成熟の開始に対する強磁場の影響

ニシツメガエルは、卵成熟の実験材料としてはあまり使用されておらず、報告例が少ない。そこで、このカエルの卵母細胞でもアフリカツメガエルと同様の薬剤に対する応答性を持っているか確かめるため、最初に2種類の薬剤を使用して調べた。そのため、アフリカツメガエルのステージVIに対応する卵母細胞を集め、無処理群150個、タンパク質合成阻害剤であるサイクロヘキシミド処理群30個、転写阻害剤であるアクチノマイシンD処理群30個の3つのグループに分けた。その後、それぞれの薬剤で前処理して、卵成熟誘起ホルモンであるプロゲステロン処理を行った。卵成熟の開始は、動物極に出現する白斑で判定できる。その結果、無処理群とアクチノマイシンD処理群は4時間ですべての卵母細胞に白斑が生じたが、サイクロヘキシミド処理群は卵成熟が起きなかった。このことから、ニシツメガエルもアフリカツメガエル同様、卵成熟の開始には転写は必要なく、タンパク質合成が必要であることが分かった。

次に、強磁場の卵成熟に対する実験を行った。強磁場の発生は超伝導磁石を用いた。この装置は、最大15テスラ(T)、 $1500\text{T}^2/\text{m}$ の垂直磁場を直径40mmのボア内に発生できる。ニシツメガエルの卵母細胞が50個ずつ入ったシャーレにプロゲステロンを添加し、その直後から、このボア内の3カ所、Upper、Middle、Lowerと呼ぶ位置にシャーレを設置し磁場を印加した。その3カ所にかかる磁場は、Upper、11T、 $-1400\text{T}^2/\text{m}$ 、Middle、15T、 $0\text{T}^2/\text{m}$ 、Lower 12T、 $1200\text{T}^2/\text{m}$ である。恒温筒内の温度は 20°C の水を循環させ 20°C に保った。対照実験として磁石の外に置いた 20°C のシャーレにいた卵母細胞を用いた。磁場印加直後から適当な時間間隔でボアからシャーレを出して観察し、動物極に白斑が出現した卵母細胞の数を数え

た。この時、対照実験ではプロゲステロン処理後1時間から白斑が出現し始め、3時間でほぼすべての卵母細胞に白斑が出現した。これに対して、磁場を印加した場合、若干早く白斑が出現し始めるものの、3時間でほぼすべての卵母細胞に白斑が出現していた。この結果、強磁場下では少し卵成熟の開始が早くなる傾向があるが、ほとんど影響がないことが示された。

2. 卵成熟の進行に対する強磁場の影響

上記の結果から、強磁場は卵成熟の開始には影響を与えないことが示されたが、過重力の我々の実験から、過重力は、卵成熟の開始には影響を与えないが、第二減数分裂の紡錘体の形成に異常を引き起こすことを報告している⁵⁾。このことは、強磁場が、減数分裂の紡錘体の形成に影響を与えることを示唆する。そこで、強磁場が、紡錘体の形成に影響を与えるかどうか調べるため、白斑出現後4時間に卵をみつめスミスの液⁶⁾で固定した。その後、包埋して切片を作製しシッフ試薬で染色した。対比染色にはファーストグリーンを使用した⁷⁾。顕微鏡で標本を観察した所、無処理卵では、正常な縦の紡錘体が観察された(図1、Control)。同様の結果は、それぞれ違った強度の磁場を印加した卵でも観察された。切片の観察から、第一極体も正常に放出されていた。この結果から、強磁

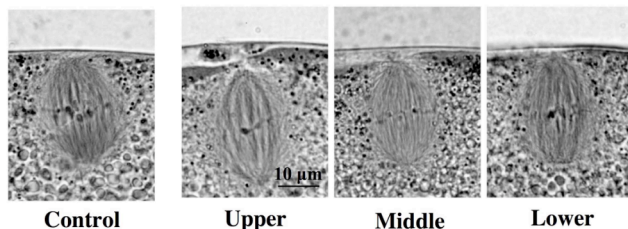


Fig. 1. Effects of strong static magnetic fields on the spindle formation of meiosis II. Strong SMFs does not affect the formation of meiotic apparatus.

場は卵成熟の進行における紡錘体の形成には影響を与えないことが示された。

しかしながら、白斑出現後計時的に観察してい

ると、無処理の卵と比較して、強磁場下の卵母細胞の外見に予想外の変化が表れた。カエル卵は、色素が多くあって茶色に見える半球が動物極で、色素が少なく灰色に見える半球が植物極である。その動物極と植物極の境目の赤道部分は、ステージ VI の卵母細胞では色素がほとんどなく白色帯といわれる。強磁場下の卵母細胞では、その白色帯の180度離れた2つの部分が動物極にせりあがり、逆に、それ以外の部分は植物極へ下がった。その結果、卵母細胞は奇妙な色素の分布を取るようになった(図2)。

図2は、色素の分布の異常が分かりやすいように、それぞれ違った3カ所の磁場強度を印加した動物極側(Animal)、側面(Lateral)、植物極側(Vegetal)からの写真が示してある。この結果から、強磁場は卵母細胞の表面の色素の分布に影響を

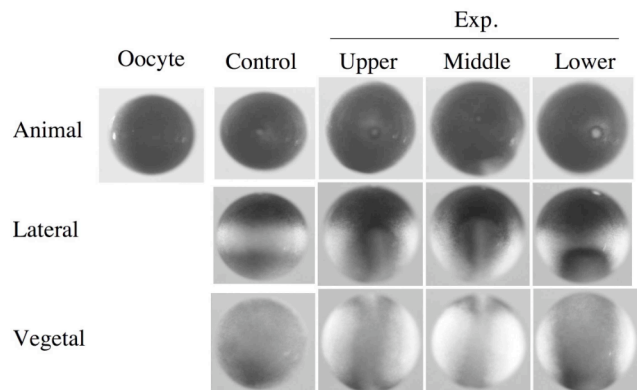


Fig. 2. Effects of strong static magnet fields on oocyte cortex. Cortex in vegetable hemisphere was reorganized.

与えることが明らかになった。

3. 終わりに

今までに卵成熟に対する磁場の影響を調べた例はない。本研究ではニシツメガエルの卵母細胞を用いて卵成熟に対する強磁場の影響を調べた。その結果、強磁場は卵成熟の開始や紡錘体の形成には影響を与えないものの、卵母細胞の色素の分布に影響を与えることが示された。興味深いことに、産卵された未受精卵のゼリー層を除き強磁

場を印加すると、本研究で観察されたような色素の異常が生じることが報告されており⁸⁾、著者らはその形態がテニスボールに似ていることから'Tennis Ball Effect'と言っている。本研究で観察された影響は、それと同様の可能性がある。正常な発生には、卵表面の細胞膜の下にあるタンパク質などの物質が受精後移動しなければならない。卵の表面にある色素の分布が異常になると言うことは、その近くにある発生に必要な物質の分布にも異常が生じると推定され、発生が正常に起こらない可能性が高く、強磁場は発生に重大な影響を与えられられる。

参考文献

- 1) Kawakami, S., Kashiwagi, K., Furuno, N., Yamashita, M. and Kashiwagi, A. (2006) Effects of hypergravity environments on amphibian development, gene expression and apoptosis. *Comp. Biochem. Physiol. Part A* **145**,65-72
- 2) Kawakami, S., Kashiwagi, K., Furuno, N., Yamashita, M., Kashiwagi, A. and Tanimoto, Y. (2006) Effects of strong static magnetic fields on amphibian development and gene expression. *Jap. J. Appl. Phys.* **45**, 6055-6056
- 3) Masui, Y. and Clarke, H. J. (1979) Oocyte maturation. *International Review of Cytology* **57**, 186-282. ed. by Bourne, G. H. and Danielli, J. F. Academic Press Inc.
- 4) Tazawa, I., Kashiwagi, A., Kashiwagi, K. and Furuno, N. (2005) Effects of hypergravity on oocyte maturation in *Xenopus laevis*. *Biol. Sci. Space* **19**, 242-244
- 5) Furuno, N., Tazawa, I., Kashiwagi, K., Kawakami, S., Shinkai, T., Yamashita, M. and Kashiwagi, A. (2006) The effects of hypergravity on bipolar spindle formation of meiosis II in *Xenopus* oocytes. *Biol. Sci. Space* **20**, 92-94
- 6) Smith, B. G. (1912) The embryology of *Cryptobranchus alleganiensis* including comparisons with some other vertebrates. *J. Morphology* **23**, 61-153
- 7) Furuno, N., Nishizawa, M., Okazaki, K., Tanaka, H., Iwashita, J., Nakajo N., Ogawa, Y. and Sagata, N. (1994) Suppression of DNA replication via Mos function during meiotic division in *Xenopus* oocytes. *EMBO J.* **13**, 2399-2410
- 8) Mietchen, D., Jakobi, J. W. and Richter, H. P. (2005) Cortex reorganization of *Xenopus laevis* eggs in strong static magnetic fields. *Biomagn. Res. Technol.* **3**, 2