

低磁場環境の生物への影響 —ウニ胚の発生に及ぼす低磁場の影響—

Effects of Low Magnetic Fields on the Organism.

-Effects of Low Magnetic Fields on the Early Development of Sea Urchin Embryos-

梶山女学園大 石川 優 ・福井 崇時
Sugiyama Jogakuen Univ. M.Ishikawa and S.Fukui

要 旨： バフンウニ *Hemicentrotus pulcherrimus* の初期発生に及ぼす低磁場の影響を調べた。地磁気遮蔽には電磁軟鉄箱を用い、その中にウニ受精卵を置いて発生過程を観察した。地磁気遮蔽効果は、対照で約 $23 \mu\text{T}$ であったのに対して、電磁軟鉄箱中では約 $5 \mu\text{T}$ に減少された。このような低磁場環境下でのウニ卵の発生は、中期囊胚期までは対照と殆ど差異はみられないが、後期囊胚期での三矢型骨片の形成、成長は対照に較べて顕著に早く、大きくなることが観察された。しかし、この差はプルテウス幼生になるまでになくなり、対照のプルテウス幼生の骨格と同じになった。低磁場で発生した囊胚の骨片形成の増大について考察し、また、今後の課題について述べた。

Abstract : The effects of a low magnetic field on the early development of the sea urchin *Hemicentrotus pulcherrimus* have been studied. Rectangular boxes constructed with high μ (magnetic permeability) metal were used for shield of the geomagnetic field, and fertilized eggs were cultured in the boxes. The static magnetic field of about 23 T was decreased to about 5 T in the boxes. Continuous exposure to such a shielded magnetic field caused a significant augmentation of the triradiate-spicule formation at late gastrula, and the size of the spicule became bigger than that of the control. Thereafter, the increased spicule-size was regulated, and at pluteus stage, the size and form of the larval bone-rod were adjusted to regular one of the control. Activation of mesenchyme cells by a low magnetic field after gastrulation and augmentation of the spicule formation were discussed.

Key words : low magnetic fields, spicule formation, embryogenesis, sea urchin magnetic effects

1. はじめに

我々は地磁気を遮蔽することにより、多くの生物種の細胞増殖、発生、成長などにどのような影響を及ぼすかを知る目的で、本学の小野崎博通、江崎 秀男、一色忍、太田敬久らと共に共同研究を行なっている。ここでは、ウニ胚の発生に及

ばす低磁場の影響についての実験結果を報告する。

2. 材料と方法

実験材料としてのウニは、夏に産卵期をもつサンショウウニ *Temnopleurus toreumaticus* と冬に産卵期をもつバフンウニ *Hemicentrotus plucherrimus* を用いた。ここでは、バフンウニで得られた結果について報告する。

先ず、卵と精子を採取して、一定濃度の卵浮遊海水に一定量の精子を加えて人工受精をした。100%受精した卵のみを実験に用いた。この受精卵浮遊液を、いくつかの小型シャーレ（径4cm）に一定量（10ml）づつとり、1）地磁気遮蔽用の電磁軟鉄製の箱、2）真鍮製の箱（電離放射線、電磁波を遮蔽、地磁気は遮蔽しない）の中に置き、また、3）室内机上に置いて、飼育した。2）、3）は対照実験とした。Fig. 1に示したように、地磁気遮蔽用の電磁軟鉄箱（1）は内外二重の箱とし、外箱の大きさは、高さ360mm × 巾410mm × 長さ330mm、内箱の大きさは、高さ220mm × 巾360mm × 長さ260mm で、何れも軟鉄板の厚さは6mmのものを用いた。対照実験の真鍮箱（2）の大きさは、電磁軟鉄箱の外側のものと同じにした。また、電磁軟鉄箱中での発生の様子を知るために、箱のなかに顕微鏡を内蔵し、それに Video-camera を接続して、一定短時間モニター用 TV に写して観察した。また、夜間における発生の様子を調べるために、Time lapse video-recorder で自動的に VTR を撮り、後で調べた。ウニの卵割及び発生速度は実験温度の変化により、影響を受けるので、試料が置かれた位置の温度を正確に監視するために、電子式温度自記記録計（Chino、ELシリーズ）により調べた。温度センサーはそれぞれの箱の中央および机上の試料の近くに置き、温度変化を監視した。ガウス・メーター（磁気測定器）を用いて、予め、電磁軟鉄箱、真鍮箱の中の5部域（Fig. 1: A～E および F～J）及び箱の外の机上（K）で、地磁気強度を測定した。測定値はX, Y, Z方向で測定した値の地磁気合成強度として計測された。その結果、電磁軟鉄箱内の A 部位で5 μ T, B 部位で4 μ T, C 部位で4 μ T, D 部位で6 μ T, E 部位で5 μ Tであった。また、真鍮箱内の F 部位で22 μ T, G 部位で24 μ T, H 部位で23 μ T, I 部位で18 μ T, J 部位で22 μ Tであった。箱外の机上（K）では23 μ Tであった。このことから、電磁軟鉄箱内では、外の実験室内の地磁気強度の約1/5に遮蔽され、また、真鍮箱内では、地磁気遮蔽効果がないことがわかった。

3. 実験結果

1) 対照実験条件下での発生

15～16℃の実験温度条件下では、真鍮箱および外の机上に置かれた対照のウニ卵の発生は、卵が受精すると約30秒で、精子進入点から受精膜の形成が始まり、約3分後に卵全体を取り巻いて完成する。その後、約90分で第一回の細胞分裂（第一卵割）をして、2細胞になり、つづいて約60分で第二卵割をして4細胞になる。さらに、その後卵割速度は多少早くなりつつ、8細胞、16細胞となり、やがて一層の細胞層で包まれた中空の胞胚期になる。

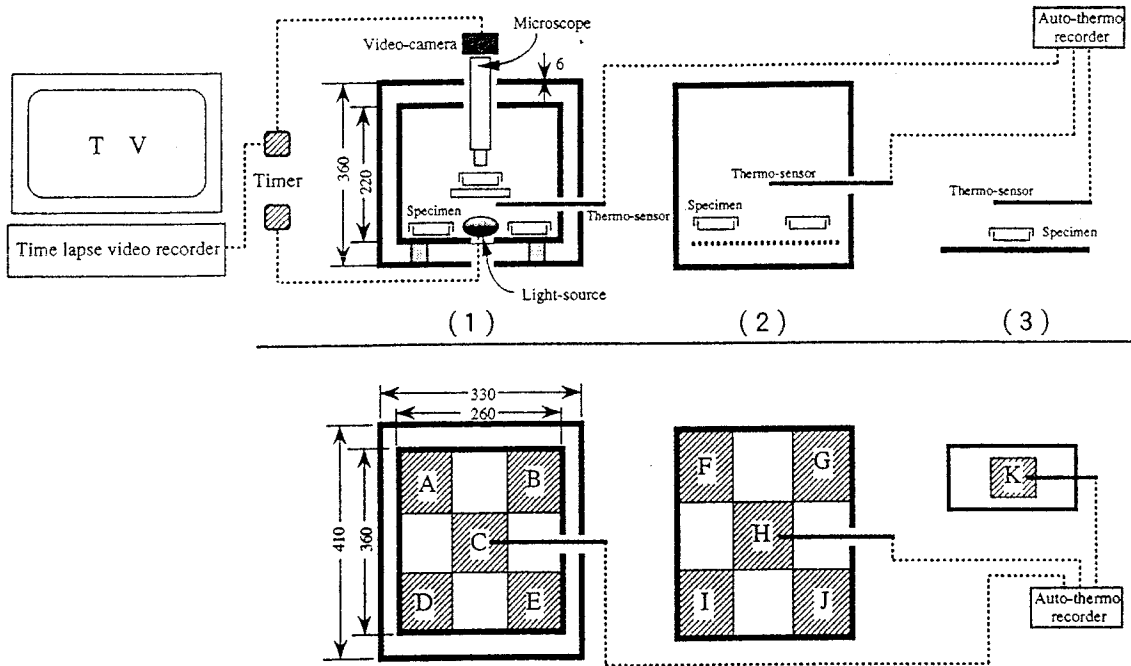


Fig.1. Diagrammatic illustration of the experimental apparatus (refer to the text).

Upper side shows a vertical section of the apparatus : (1) indicates the double boxes which were made from an high μ metal and equipped a microscope in the inner box. Specimens were distributed to 5 positions on the bottom of the inner box. (2) shows the brazen box. Specimens were put on the bottom of the box. (3) shows a specimen on the desk.

Lower side indicates a cross section of the apparatus : 5 positions (A to E) of the specimen in the inner box of (1), 5 positions (F to J) in the brazen box (2), and one position (K) of a specimen on the desk (3) were shown. Intensity of the magnetic field at each position has been appeared in the text.

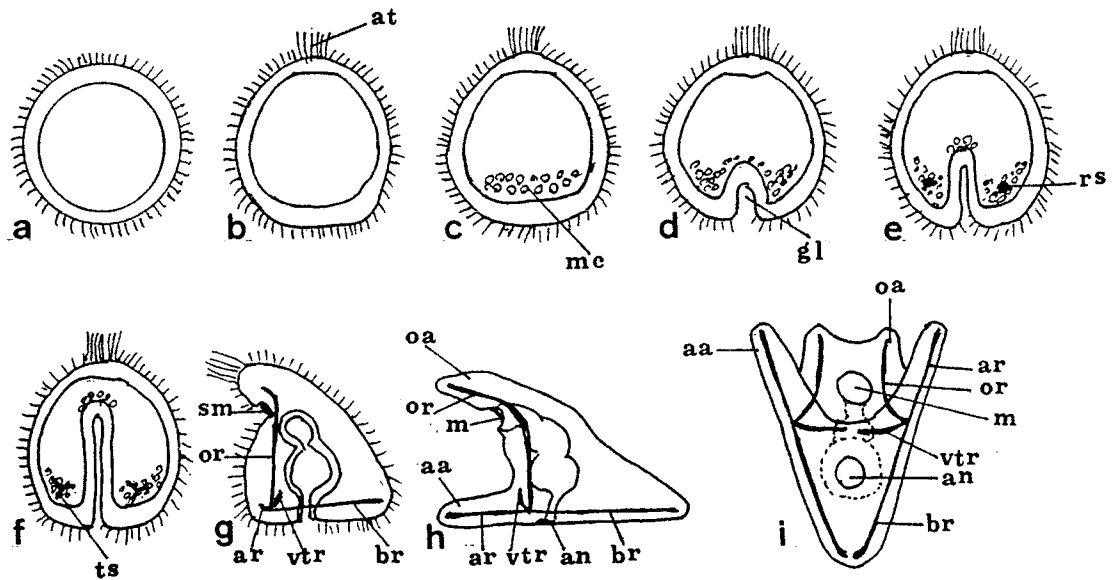


Fig.2. Developmental process after the blastula stage in control embryos (refer to the text).

a --early blastula, b --middle blastula, c --late blastula, d --early gastrula. e --middle gastrula, f --late gastrula, g --prism larva, h and i --early pluteus larva.

(abbreviation aa --anal arm, an --anus, ar --anal rod, at --apical tuft, br --body rod, gl --gastrulation, m --mouth, mc --mesenchyme cell, oa --oral arm, or --oral rod, rs --rudiment of spicule, sm --stomodeum, ts --triradiate spicule, vtr --ventral transverse rod)

胞胚期以降の発生の様子を模式的にFig. 2に示す。

胞胚初期 (Fig.2-a)になると、時間の経過にともない各細胞は繊毛を生やし、孵化酵素を分泌して、受精膜を溶かして外にでて、飼育海水中を泳ぎ回るようになる。この遊泳胞胚は時間と共に形が次第に変化する、即ち、受精後約20時間で、次第に植物極側の細胞層が扁平になり、動物極側の細胞層からは長く伸びた繊毛(頂毛, *at*)を持つようになる。この時期の胚を中期胞胚 (Fig.2-b)と呼ばれている。この時期から約4~5時間すると、植物極側細胞層から中胚葉性の細胞(一次間充織, *mc*)が胞胚腔内へ遊離して、二ヶ所に一次間充織細胞の集合体を形成する。この時期の胚を後期胞胚 (Fig.2-c)と名付けられている。受精後約30時間で、植物極側の細胞層は胞胚腔の中へ原腸陥入(*gl*)が起こり、初期囊胚期 (Fig.2-d)になる。この時期の一次間充織細胞群のなかには骨片原基は未だ見られない。その後、約12時間で原腸陥入は胚長の半ばまで達し、中期囊胚 (Fig.2-e)になる。この時期になると、二ヶ所に集まった一次間充織細胞群のそれぞれに、偏光顕微鏡でやっと見られる微小な三矢型骨片原基(*rs*)が現われる。受精後約46時間には、原腸陥入は動物極側細胞層近くまで達し、後期囊胚 (Fig.2-f)になる。この時期になると、はっきりと認めることができる三矢型骨片(*ts*)が2つつくられる。

受精後約60時間経過すると、さらに発生してプリズム型幼生 (Fig.2-g)となる。この時期になると未発達の間腕内側に口陥(*sm*)の凹みが形成され、骨片は三方向にさらに成長分化する。その後、口陥は原腸先端部と接着融合して、幼生の口(*m*)として開口する。最初の原口は幼生の肛門(*an*)となり、開通した幼生消化器官が形成される。

受精後約80時間経過すると、口腕(*oa*)と肛腕(*aa*)がさらに伸長し、また、骨片は両腕の伸長方向に平行して伸び、椅子型様の形をとった初期プルテウス幼生(*h, i*)になる。この状態の幼生は時間とともに、骨格が伸長し、幼生の大きさを増して成長するが、全体としての形の顕著な変化は見られない。その後は、プランクトンを餌として摂り、変態して、所謂ウニの形になる。

2) 低磁場条件下での発生

上記のごとく、対照実験で飼育した受精卵の発生を要約すると、受精後: 1) 24時間後の後期胞胚 (Fig.2-c)では一次間充織細胞が遊離する、2) 30時間後の初期囊胚 (Fig.2-d)では原腸陥入を開始するが、骨片形成は未だなし、3) 42時間後、中期囊胚 (Fig.2-e)では三矢型骨片の原基が出現する、4) 46時間後の後期囊胚 (Fig.2-f)では成長した三矢型骨片が現われる、5) 60時間後のプリズム型幼生 (Fig.2-g)では骨格の分化がはじまる。

地磁気を遮蔽した電磁軟鉄箱中で飼育した受精卵の中期囊胚までの発生過程および速度は、対照実験下で飼育したものと殆ど同じで、顕著な差はみられなかった。

しかし、Fig. 3に示したように、受精後46時間の後期囊胚における三矢型骨片の成長は、電磁軟鉄箱中で飼育したもの(A)は、対照(真鍮箱中: B, 机上で飼育: C)に比べて、大きく、早いことが解った。Figs. 3-A, B, Cは、受精後同じ時間(46時間)に観察した後期囊胚の三矢型骨片を偏光顕微鏡で観察したものを示す。

また、Figs. 3-D, E, Fは、それぞれの条件下で飼育された、受精後72時

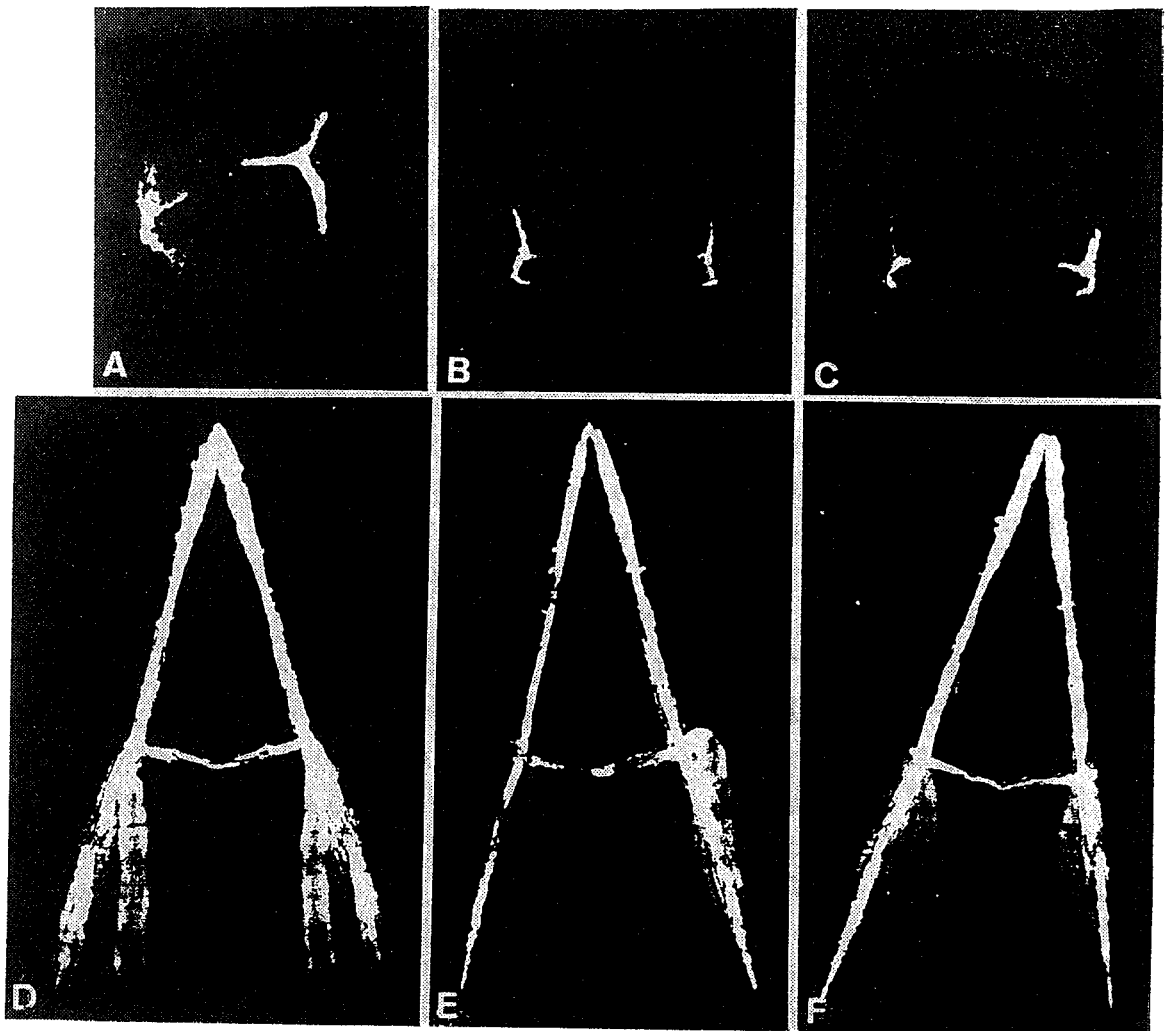


Fig.3. Triradiate spicules at late gastrula stage and the bone-rods of pluteus larvae observed by a polarization microscope.

A, B and **C** show late gastrula larvae 46 hr after fertilization ($\times 570$) and **D, E** and **F** show pluteus larvae 72 hr after fertilization ($\times 570$).

A and **D** : cultured in the high μ metal-boxes (*low magnetic condition*) ; **B** and **E** : cultured in the brazen box (*control 1*) ; **C** and **F** : cultured on the desk (*control 2*).

間のプルテウス幼生を示す。これらの写真から、電磁軟鉄箱中で飼育した胚からの幼生(D)は、対照のE, Fに比べて、成長した幼生骨格の形態には、殆ど差異は認められないことが解る。このことは、低磁場条件下で後期囊胚からプルテウス幼生までの間に、骨格形成の修復がおこることが考えられる。

4. 今後の課題と予備実験

以上の実験結果から、地磁気遮蔽により、骨片形成に関する系の活性化、即ち、一次間充織細胞の活性化が初期囊胚から後期囊胚までの間、約15時間の間で起こることが、予想されるので、今後は、その活性化の実体、即ち、胚のどの細胞で、代謝的に何が起こっているのかを知るための実験を計画している。

その予備実験の一つとして、種々の細胞の増殖と分化に関与することが、知られているプロテインキナーゼ、中でもチロシンキナーゼの活性を調べるために、本酵素の反応産物であるチロシン残基のリン酸化蛋白質を骨片形成過程の胚でしらべる実験を、現在行なっている。

即ち、バフンウニの初期囊胚(一次間充織細胞あり、骨片なし)および中期囊胚(骨片原基あり)の全胚を用いて、イムノブロットング法による、チロシン残基リン酸化蛋白質の電気泳動分画パターンより低磁場環境の影響を調べた。

その結果、電磁軟鉄箱中、真鍮箱中および机上で飼育したそれぞれの胚から、由来した初期囊胚のチロシン残基リン酸化蛋白質の分画では、多数の分画バンドがみられたが、特に中期囊胚のものと比較して、初期囊胚の93KD, 106KD, 130KDの蛋白質バンドにおいて、中期囊胚では、前者の93KDが2本に分かれ、また、106KD,

130KDの2本のバンドが無くなっていた。このことは、低磁場環境での飼育による差はみられず、発生時期でのみ、差がみられたことになる。即ち、低磁場条件と2つの対照条件との間での当該蛋白分画の差は認められなかった。このような結果は、実験に胚全体を用いたことに起因するとも思われるので、今後は、分離した造骨細胞(一次間充織細胞)の系で調べることを計画している。

この計画のためには、16細胞期の小割球(将来、一次間充織細胞になる)を、実験に供するだけの量を分離し、培養して骨片形成を起こさせる条件を、確立しなければならない。その実験条件を現在しらべている。現時点では少量の小割球を16細胞胚から分離して、次の培養液で細胞培養し、三矢型骨片の形成とその後の成長をみるに至っている。

培養液：2%馬血清、100 μ g/ml ストレプトマイシン、100U/ml
ペニシリンを含む滅菌海水

今後は、このような培養条件を用いて、より多くの分離小割球を効率よく集め、低磁場環境下で培養し、骨片形成に伴うチロシンキナーゼの活性の変化を調べることを計画している。

5. 考 察

1964年 Beischer, D.E.¹⁾はウニ受精卵を14万ガウスの強磁場に2時間おくことにより卵割が抑制されることを報告した。その後、Falugi, C. et al(1987)²⁾はウニ

Paracentrotus lividus の初期発生に対する弱パルス磁場（パルス幅 ～20 s, 繰り返し時間 ～200 s, 尖頭磁場強度 ～20 ガウス）の影響を調べて、細胞分裂（第一卵割、第二卵割）が、対照に較べて早く起こり、また、プルテウス幼生までの発生には形態的に異常は起こらないが、弱パルス磁場を与えていない対照のプルテウス幼生では、まだ頭頂点まで骨が伸びていない時期に、同じ時期（受精後 48 時間）の実験胚では、頂点まで到達することを報告した。このことから Falugi らは、弱パルス磁場を与えることにより、骨格形成が促進されるのは、造骨細胞から Ca^{2+} イオンの流出の増大がおこることを予想した。このことは Bassett, C.A. et al (1974)³⁾ の研究、即ち、低周波電磁波（20 ガウス以下、平均 10 ガウス）が骨や骨細胞を刺激して、損傷した骨の修復と増加を促すという研究に関連して興味深い。

最近、Zimmerman, S. et al (1990)⁴⁾ は、ウニ *Strongylocentrotus purpuratus* の受精卵に 60-Hz の磁場（0.1 mT rms）を連続して置いた場合、受精後 18 時間（18℃で一次間充織細胞を持った胞胚期まで発生）までは、対照に較べて発生の遅れはないが、その後 5 時間で、対照胚では中期囊胚期まで発生するのに対して、実験胚では初期囊胚期で、発生の遅れを示すことを報告した。彼らによれば、磁場の変化により原腸陥入の際の細胞移動に関係する DNA から RNA への転写に変化が起こることを予想した。

上述の Falugi ら (1987) および Zimmerman ら (1990) の研究はウニ卵の発生に及ぼす磁場および電磁波の影響を調べたものである。彼らによって得られた結果を相互に比較す

ることはウニの種類、実験条件が違ふためできないが、細胞分裂、原腸陥入、骨片形成などに磁場および電磁波が何らかの影響を与えていることが伺われる。

我々は上記研究とは異なり、地球表面における地磁気（30～60 μ T）を遮蔽して、4～6 μ T に減らした環境下におけるウニ卵の発生を、逆の立場から調べた。その結果、低磁場の影響は受精後初期の卵割から初期囊胚までは殆どなく、対照と変わらないが、中期囊胚から後期囊胚にかけて、低磁場に置かれた胚では三矢型骨片の形成と成長が早く起こり、対照の骨片よりも大きくなった。しかし、その後の発生でプルテウス幼生になるまでに、低磁場に置かれた胚の骨格形成は、修復されて正常なプルテウス幼生の骨格になることが解った。以上のことから、低磁場の影響は三矢型骨片が形成され始める中期囊胚から後期囊胚にかけて大きいので、骨片形成に関与する一次間充織細胞の機能の高揚に関係するものと考えられる。

低磁場環境下で、動物卵あるいは胚の発生を初めて調べた研究は、Asashima, M. et al (1991)⁵⁾ によってなされた。彼らはアカハライモリ *Cynops pyrrhogaster* の未受精卵から神経胚期までの胚を、地磁気を遮蔽して 5 nT にした実験環境下に置いて発生を調べた。その結果、20 日間処理した胚で、双頭、腸突出、脊柱湾曲、奇形眼などの他、発生の抑制、遅延などが起こることを知った。

Asashima, M. らの研究では、地球表面の地磁気を一万分の一に遮蔽減少した 5 nT の環境下でなされたもので、イモリ胚の発生に多くの奇形を生じたことは、地磁気と発生機構学との関係からも大変興味深いものである。我々が実験した地磁気遮蔽装置では、彼らの場合の 5 nT に較べて、遮蔽効果が少なく、約 5 μ T であったので、ウニ卵の発生において、三矢型骨片形成時以外には、顕著な形態異常の発生が見られなかったのかも知れない。

6. 謝 辞

本研究は、1991年から1993年の3年間にわたる、椋山女学園大学・学園研究費（A）の援助により行われたもので、この場を借りて厚く御礼申しあげます。また、実験を進めるに当たり、多大のご助力を戴いた本学・非常勤講師 中島 晴子 女史 並びに岐阜大学・医療技術短期大学部 武藤 吉徳 助教授に対して深甚なる謝意を表します。

7. 文 献

- 1) Beischer,D.E.: "Biological Effects of Magnetic Fields" ed. by Barnothy,Vol.1, p.201, Plenum Press, N.Y., 1964
- 2) Falugi,C.,M.Grattarola and G.Prestipino : Biophys. Jour., **51**, 999-1003,1987
- 3) Bassett,C.A.L.,R.J.Pawluk,and A.A.Pilla : Science (Wash.DC),**184**, 575-577, 1974
- 4) Zimmerman, S., A. M. Zimmerman, W. D. Winters, and I. L. Cameron : Bioelectromagnetics, **11**, 37-45, 1990
- 5) Asashima,M.,K.Shimada,and C.J.Pfeiffer : Bioelectromagnetics,**12**, 215-224,1991