

早稲田大学審査学位論文(博士)

陸生両生類無尾目の
変態のホルモン調節

1991年3月

新沼和彦

①

博 士 論 文

陸 生 両 生 類 無 尾 目 の
変 態 の ホ ル モ ン 調 節

新 沼 和 彦

Niinuma, Kazuhiko

物 理 学 及 応 用 物 理 学 専 攻

内 分 泌 学 研 究

研 究 指 導 菊 山 栄

目 次

第一章	従来の研究および本研究の目的と意義 . . . p 1 ~ p 2 4
第二章	ヒキガエル幼生の甲状腺ホルモンレベルについて p 2 5 ~ p 4 1
	材料と方法 p 2 6 ~ p 3 4
	動物 p 2 6 ~ p 2 7
	甲状腺ホルモンの抽出 p 2 7 ~ p 2 8
	T ₄ およびT ₃ のRIA法 p 2 8 ~ p 3 1
	甲状腺への放射性ヨウ素の取り込み p 3 1 ~ p 3 4
	結果と論議 p 3 4 ~ p 4 1
第三章	ヒキガエル幼生の視床下部と変態 p 4 2 ~ p 4 9
	材料と方法 p 4 4
	結果と論議 p 4 5 ~ p 4 9
第四章	ヒキガエル幼生の変態の各段階における副腎皮質ホルモ ンの血中レベルの変化 p 5 0 ~ p 5 5
	材料と方法 p 5 0 ~ p 5 2
	結果と論議 p 5 2 ~ p 5 5
第五章	ヒキガエル幼生の変態の各発生段階におけるプロラクチ ンレベルとプロラクチンの合成能の変化について p 5 6 ~ p 7 6

材料と方法	p 6 1 ~ p 7 0
ヒキガエル幼生からの採血方法	p 6 1
ヒキガエル幼生の脳下垂体の採取方法	p 6 1 ~ p 6 2
抗体の作製法	p 6 2 ~ p 6 4
プロラクチン R I A 法	p 6 4 ~ p 6 7
プロラクチン合成能の測定	p 6 8
電気泳動によるプロラクチンの分離とその画分の放射活性の測定	p 6 9 ~ p 7 0
結果と論議	p 7 0 ~ p 7 6

第六章	プロラクチン細胞と甲状腺刺激ホルモン (T S H) 細胞の各発生段階における免疫組織学的研究	p 7 7 ~ p 8 6
-----	---	---------------

材料と方法	p 7 8 ~ p 8 1
組織切片の作製と酵素抗体法による染色	p 7 8 ~ p 8 1
結果と論議	p 8 1 ~ p 8 6

第七章	結論と今後の展望	p 8 7 ~ p 8 9
-----	----------	---------------

謝辞	p 9 0
参考文献	p 9 1 ~ p 9 9
履歴書	
研究業績	

第一章 従来の研究および本研究の目的と意義

一般に、無尾両生類の幼生は水中に生活し、成長を遂げたのち、変態をして成体となる。この際、幼生時の運動器官であった尾は吸収され、あらたに後肢が発達し、水中の遊泳、陸上での歩行に用いられるようになる。変態時には、このような外部形態の変化ばかりではなく、体の内部の変化（例えば、食生の変化に備えての腸の短縮、陸上での呼吸のための鰓の消失と肺の発達など）も著しいものがある。さらに形態とともに機能の変化（例えば、尿素合成系の発達、消化管におけるタンパク分解酵素の活性上昇など）も伴う。このような変態時の変化が、何によって起こるかは多くの研究者の興味を引くところであり、幾多の研究がなされた（Dodd and Dodd (1976) White and Nicoll (1981)）。変態は

種々のホルモンによって調節されていることが分かっており、それらの主なものは甲状腺ホルモン、副腎皮質ホルモン、プロラクチン、成長ホルモン（GH）である。甲状腺ホルモンは変態を引き起こすホルモンであり、副腎皮質ホルモンは甲状腺ホルモンの働きを強化する働きを持つ。これに対し、プロラクチンは甲状腺ホルモンにきつ抗して変態を抑え、尾や鰓などの成長を促す。また、成長ホルモンは成体になってから必要な器官（例えば後肢）の成長を幼生のうちから促進することが知られるようになった。図一1-1に変態時における各種ホルモンの働きあいを示す。

これらのホルモンのうち、変態にもっとも重要な役割を果たすのは甲状腺ホルモンである。1912年にGudernatschはウマの甲状腺をオタマジャクシに与えることでその変態が促進されることを報告した。この結果は以後の内分泌学の研究ならびに方法に影響を与えた。甲状腺ホルモンの分離と結晶化は1915年

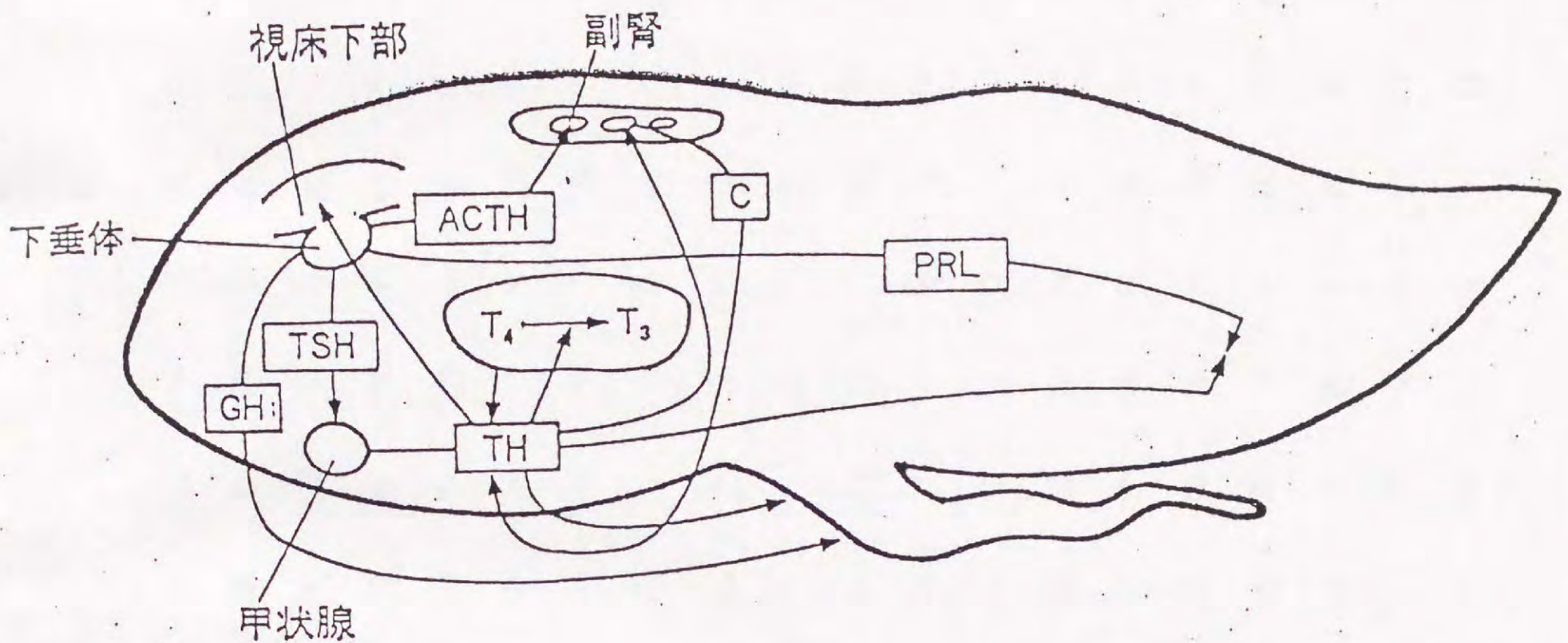


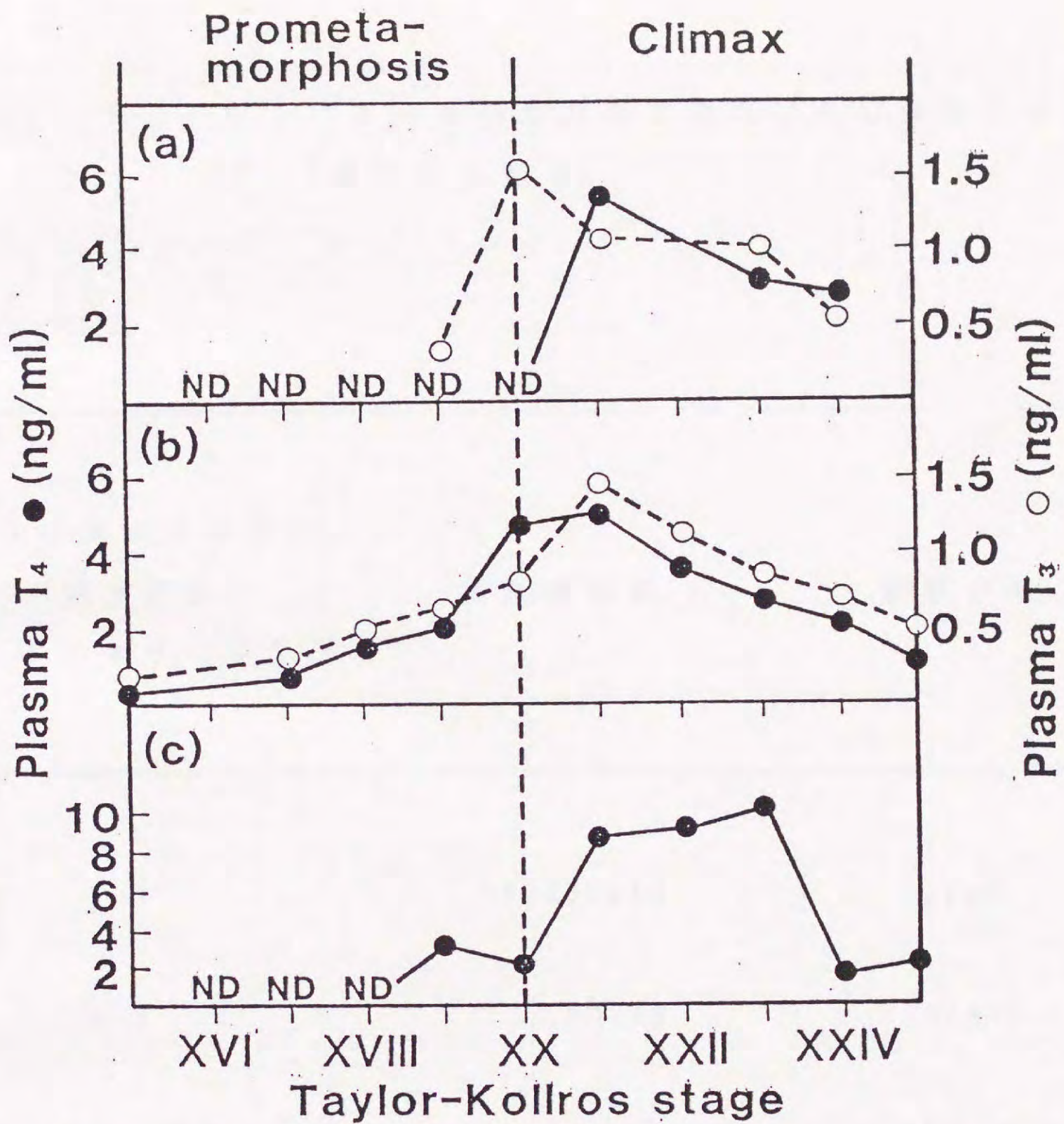
図 - 1 - 1

前肢出現時（変態最盛期の始め）のころのホルモンの働きあいの模式図。
 甲状腺ホルモン（TH）は末梢組織で T_4 から T_3 への転換系を誘導し甲状腺ホルモンの生理活性は強まる。また視床下部に働いて TRH や CRH などの分泌を高める。その結果下垂体からの TSH や ACTH の分泌が高まる。甲状腺ホルモンは副腎の ACTH に対する反応性も高める。その結果、甲状腺ホルモンや副腎皮質ホルモン（C）の血液中濃度は上昇する。副腎皮質ホルモンは甲状腺ホルモンの作用を強化し尾などの幼生器官を退化させる。プロラクチン（PRL）は甲状腺ホルモンに対しある程度拮抗作用を示す。甲状腺ホルモンは後肢などの成体器官の発達を促し、GH はそれに協調作用を示す。

に Kendall によってなされ、チロキシンの構造決定と合成は Harrington により 1927 年に成功した。以上が甲状腺研究の大きな足跡であるが、Gundernatsch を除き、これらの研究は主として哺乳類で行われた。甲状腺はその小胞のコロイドに主としてチログロブリンという分子量約 660,000 のヨード化された糖タンパク質を含んでいる。これが加水分解されると種々の低分子のヨード化合物が生ずる。それらはモノヨードチロシン (moniodotyrosine: MIT)、ジヨードチロシン (diiodotyrosine: DIT)、トリヨードチロニン (triiodothyronine: T₃)、テトラヨードチロニン (tetraiodothyronine) すなわちチロキシン (thyroxine: T₄) である (図-1-2)。この中で T₃ と T₄ がホルモン活性を持つが、甲状腺からは主として T₄ の形で分泌される。血液中に検出される T₃ は主として T₄ が末梢組織で脱ヨード化酵素により変換されて生じたものである。ウシガエル幼生

では変態の最盛期に T_3 、 T_4 とも血中レベルは最高値に達することが知られている (Miyachi et al. (1977) Regard et al. (1978) Mondou and Kaltenbach (1979) Suzuki and Suzuki (1981)) (図 - 1 - 3)。また一般に、ホルモンが効果を示すためには受容体に結合する必要がある (Oppenheimer et al. (1976))、甲状腺ホルモンの場合は標的細胞の核に受容体が存在する (Griswold et al. (1972) Kislner et al. (1975))。変態の進行とともに、この受容体のホルモンに対する親和性は変わらないが、結合基の数が増加する (Yoshizato and Frieden (1975)) (表 - 1 - 1)。また、 T_4 より T_3 への変換に必要な脱ヨード酵素の活性も肝臓で上昇する。そして、この酵素活性の上昇は T_4 または T_3 によって促進されることもわかってきた (Galton et al. (1982))。

一方、 T_3 や T_4 の働きを強化するホルモンとして副腎皮質ホルモンがクローズアップ



(a) Miyauchi et al. (1977) (b) Suzuki and Suzuki (1981)

(c) Mondou and Kaltenbach (1979)

図 - 1 - 3 ウシガエル幼生の変態期におけるチロキシン (T₄: ●)、トリヨードチロニン (T₃: ○) の血液中濃度の変化
 ND: 検出できず

表 - 1 - 1 ウシガエル幼生変態期での尾びれの細胞核における
T₃の最大結合能力

ウシガエル幼生 発生段階 (TKステージ)	結合基の数	解離定数
1 0	1,330±30	112±5
1 5	1,580±40	105±4
1 8 - 1 9	2,830±70	155±7
2 0 - 2 1	2,410±30	169±4

(Yoshizato and Frieden (1975)より引用)

されるようになった。オタマジヤクシを甲状腺ホルモンの液中で飼育した場合、副腎皮質ホルモンを加えると甲状腺ホルモンの効果が増強すること、副腎皮質ホルモン単独では効果がないことを見出したのがその発端である (Frieden and Naile (1955) Kaltenbach (1958) Kobayashi (1958))。ヒキガエルにおいてもこのことは確かめられている (Kobayashi (1958))。しかし、変態前期の幼生に副腎皮質ホルモンを単独で与えると、むしろ自然変態に遅れがみられる (図-1-4)。一方、脳下垂体を除去した動物に TSH を投与し、内因性の甲状腺ホルモンによって変態を誘導しつつ副腎皮質ホルモンを与えた場合は変態の促進がみられる (図-1-5)。内因性の副腎皮質ホルモンが変態の促進に寄与しているかどうかであるが、次のような実験結果からその可能性が高いといえる。ヒキガエル幼生に副腎皮質ホルモンの合成酵素群の活性を抑えるアンフェノン B (Amphenone B) という

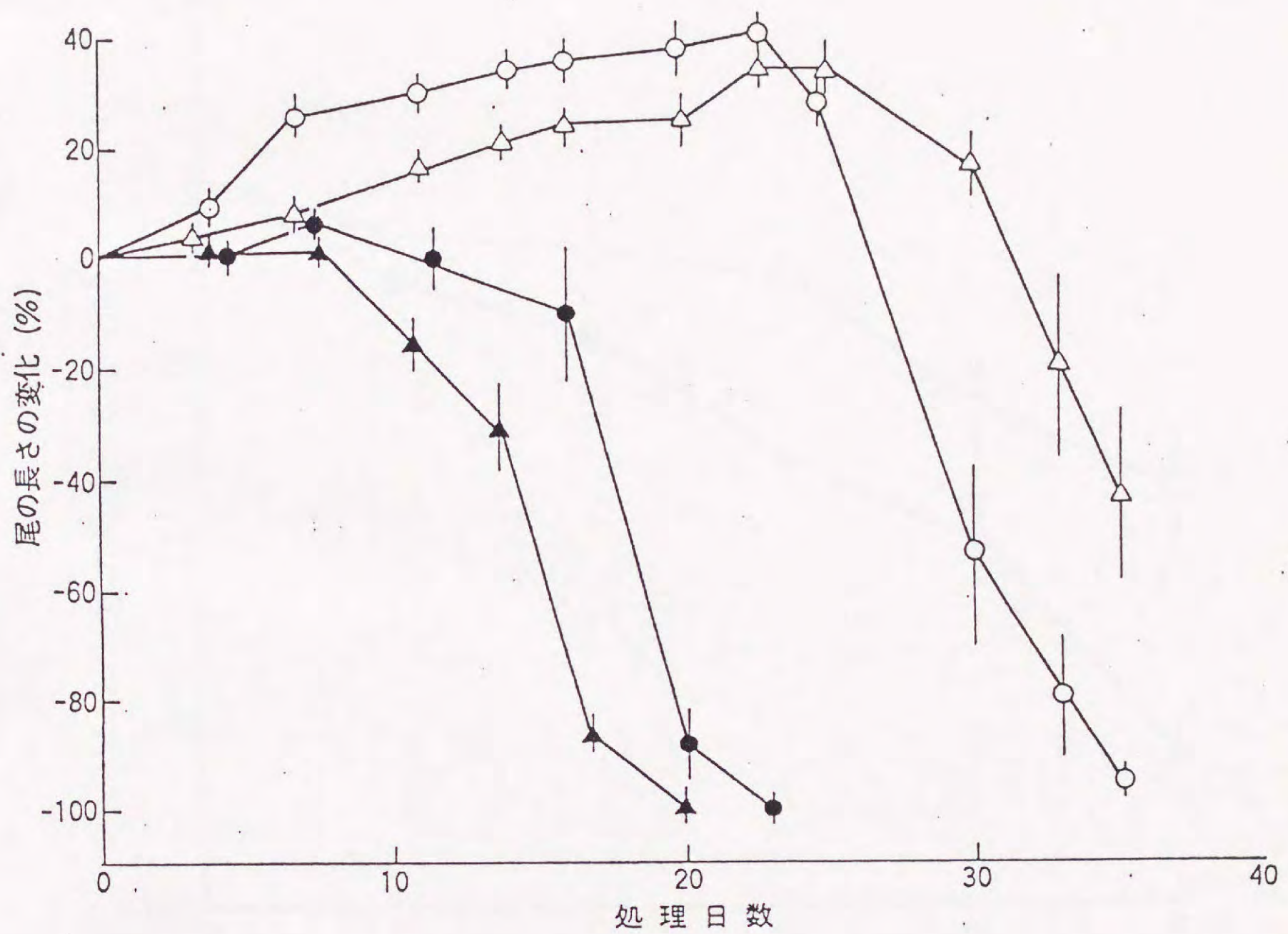


図 - 1 - 4

ヒキガエル幼生の尾の短縮に及ぼす T_4 と副腎皮質ホルモン (デオキシコルチコステロンアセテート; DCA) の影響。動物は 5.0×10^{-8} M の T_4 , 3.4×10^{-6} M の DCA を含む水で飼育された。○: 対照, △: DCA, ●: T_4 , ▲: DCA+ T_4

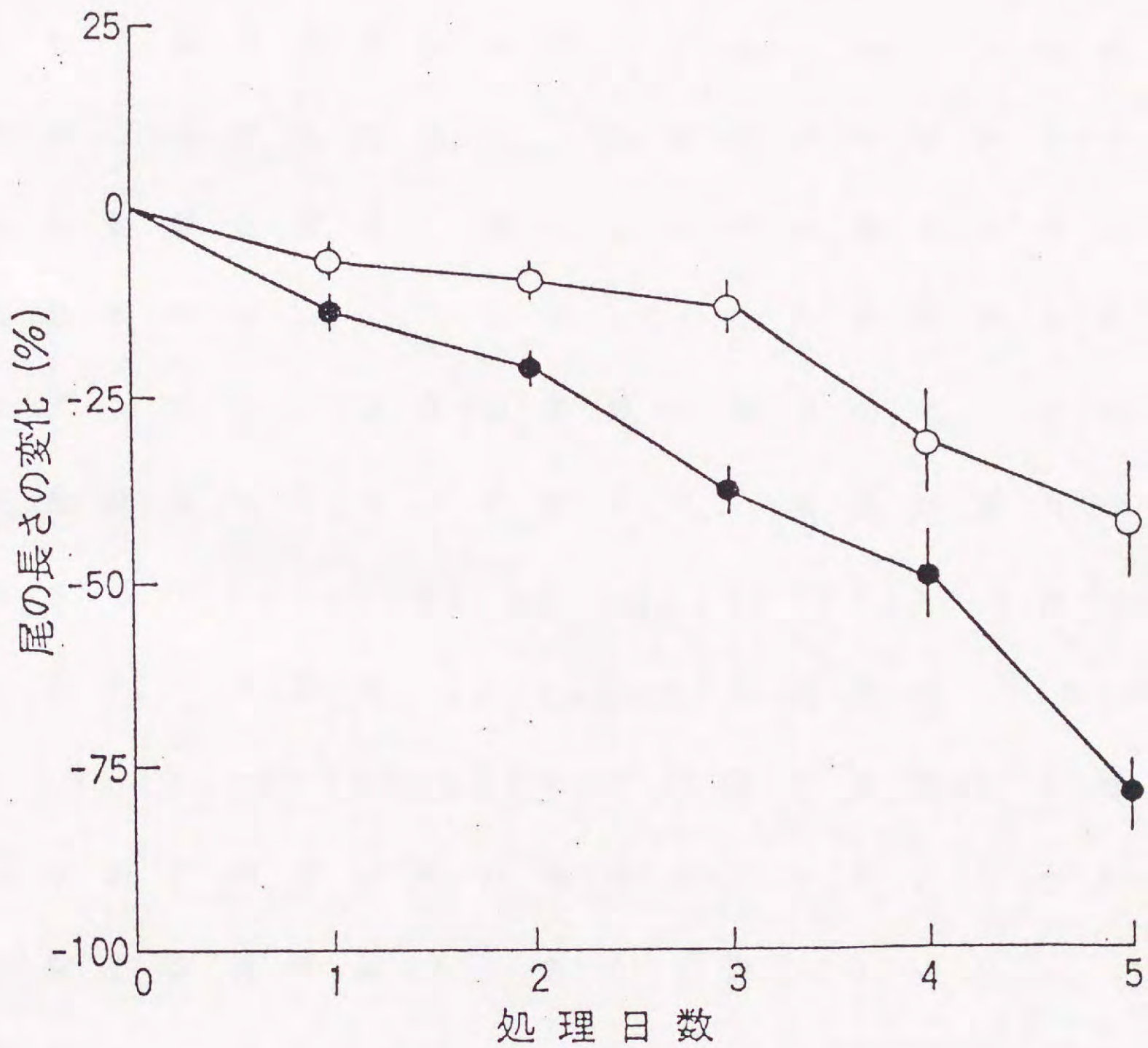


図 - 1 - 5

脳下垂体を除去されたヒキガエル幼生の尾の短縮に対する TSH と DCA の影響。○：TSH (10 μg) を投与された動物，●：TSH を投与された上 DCA (3.4 × 10⁻⁶ M) を含む水で飼育された動物

薬物を投与すると変態が遅れる。しかし、この薬物には哺乳類で T S H の分泌を抑制するという副作用が知られている。そこで動物にチオウラシルを与え、内因性の甲状腺ホルモンの影響を除き、その上で甲状腺ホルモンを外部から補い、アンフェノン B の効果をみるとアンフェノン B は変態を遅らせる。これに副腎皮質ホルモンを補えば、変態の遅れは解消する (Kikuyama et al. (1982)) (図 - 1 - 6)。その後 in vitro での研究 (Kikuyama et al. (1983 a)) により副腎皮質ホルモンのなかで効果が強いものはアルドステロンとコルチコステロンであり (図 - 1 - 7)、興味あることに、これらホルモンは両生類の副腎で作られるステロイドホルモンの主たるものである (Carstensen et al. (1961) Macchi and Phillip (1966) Jolivet-Jaudet and Ishii (1983)) (図 - 1 - 8)。

コルチコステロンとアルドステロンは哺乳類ではそれぞれ代表的な糖質コルチコイド

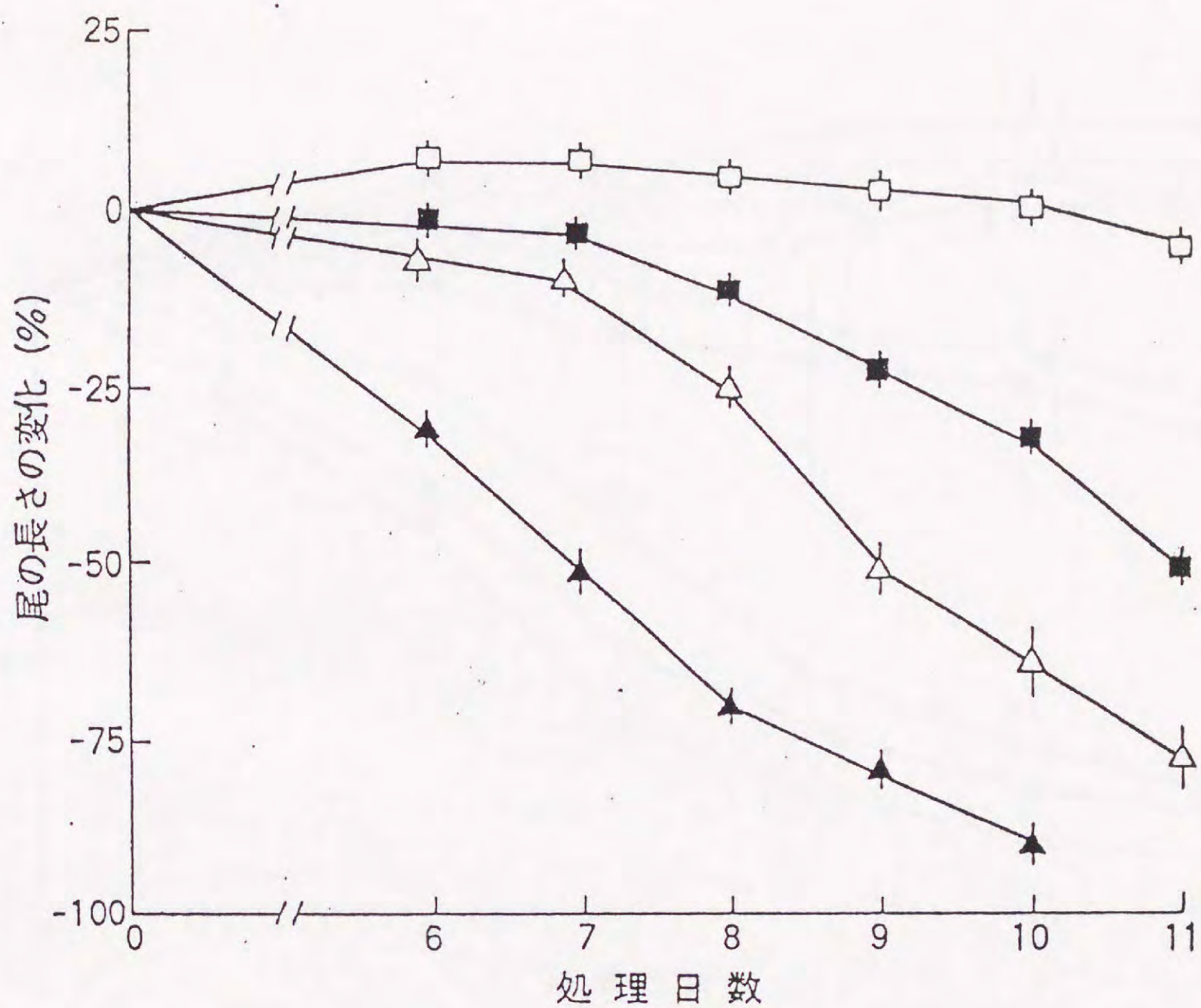


図 - 1 - 6

ヒキガエル幼生の尾の短縮に及ぼすアンフェノン B の影響。□：0.04% チオウレアを含む水に飼われた動物，△：チオウレアと 5×10^{-8} M T₄ 中に飼育された動物，■：チオウレアと T₄ 中に飼育された上で $10 \mu\text{g}$ のアンフェノン B を隔日投与された動物，▲：チオウレア，T₄， 10^{-7} M のアルドステロンおよびコルチコステロンを含む水で飼われたうえ，アンフェノンを投与された動物

(Kikuyama et al. (1982) より引用)

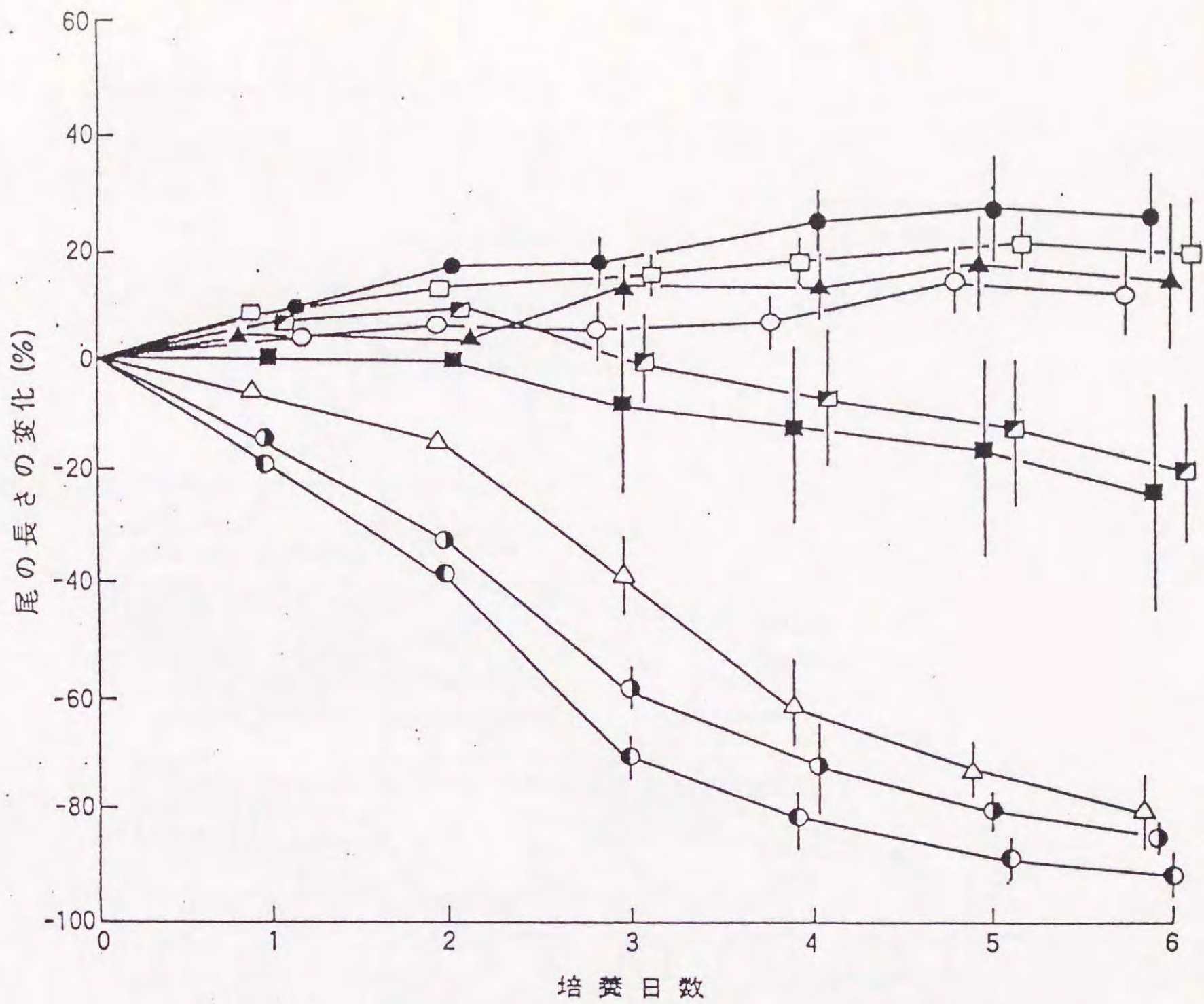


図 - 1 - 7

ヒキガエル幼生の尾片の甲状腺ホルモンによる誘導退縮に及ぼすステロイドホルモンの影響。○：対照，▲：T₄，□：T₄+テストステロン，●：T₄+エストラジオール，■：T₄+プロゲステロン，◻：T₄+コルチゾル，△：T₄+DCA，⊙：T₄+コルチコステロン，⦿：T₄+アルドステロン。ステロイドの濃度は 3.4×10^{-6} M，T₄の濃度は 5×10^{-8} M

(Kikuyama *et al.* (1983) より引用)

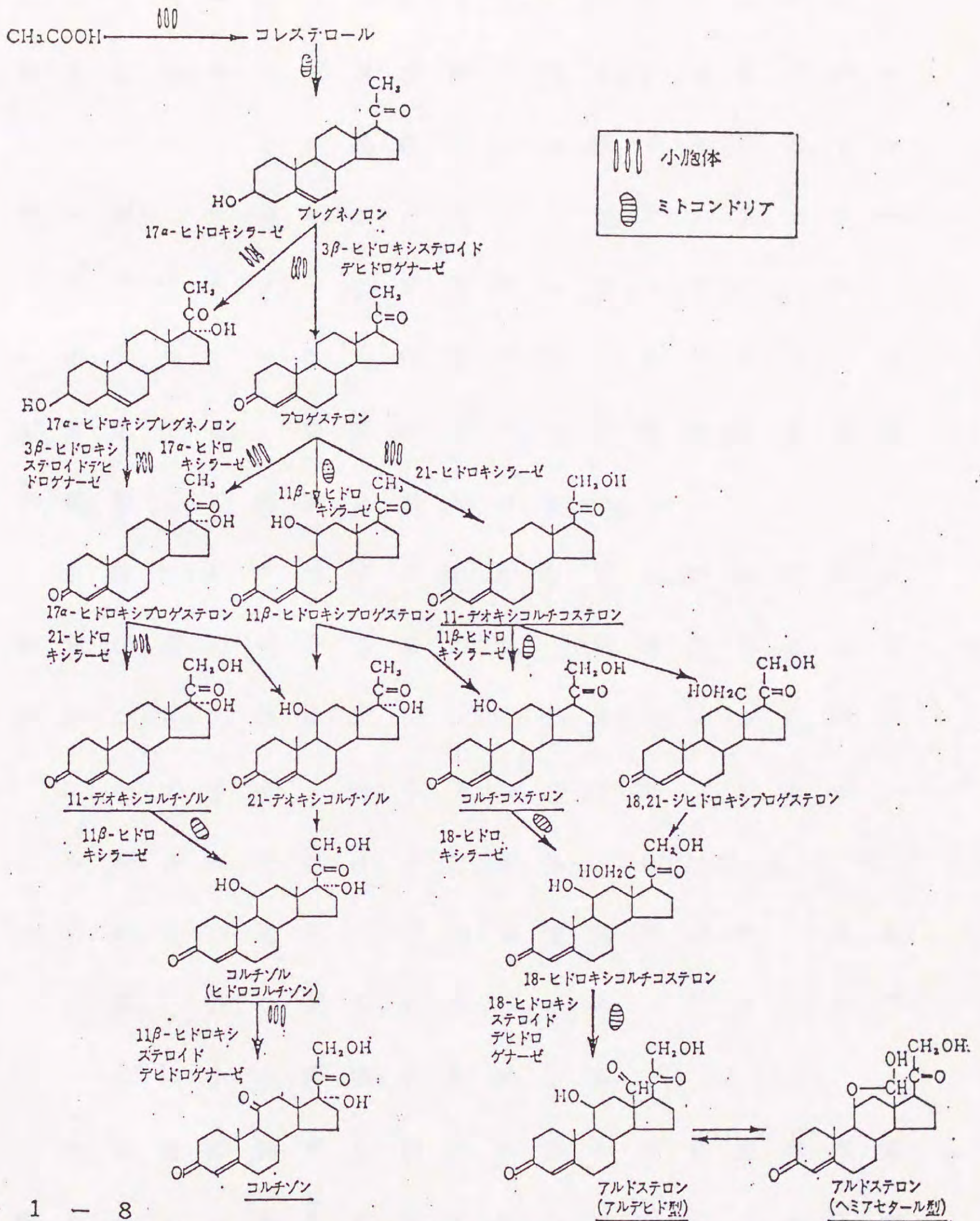


図 - 1 - 8

副腎皮質ホルモンの生合成. 図の中で名前の下にアンダーラインをしてあるのが副腎皮質ホルモンである. 太い矢印は主要経路を示し, そのそばに必要な酵素名が付記されており, その酵素がミトコンドリアにあるか小胞体にあるかを図で示してある

と鈹質コルチコイドである。糖質コルチコイドの主な作用は糖質代謝に関するものでグルココルチコイドで誘導される肝の酵素はアルギナーゼ、チロシンアミノトランスフェラーゼ、トリプトファンピロラーゼなどがあり、肝へのグリコーゲン貯留やコレステロール産生を促進する。筋肉内のアミノ酸遊出を促進して糖新生の基質を増加させる。

鈹質コルチコイドの主な作用は鈹質特に電解質代謝に対するもので、代表的なホルモンはアルドステロン、11-デオキシコルチゾール、11-デオキシコルチステロンである。

ミネラルコルチコイドによる Na^+ の再吸収、 K^+ の排出の増加の現象は遠位尿細管、唾液腺、汗腺、腸などにも見られる。 Na^+ の吸収とともに水の再吸収も起こる。

内因性の副腎皮質ホルモンが変態の調節に関わっていることはこれらホルモンの合成酵素の阻害剤により変態が遅れ、副腎皮質ホルモンを補うことにより回復がみられること

から明らかになった (Kikuyama et al. (1982)). またこの場合の副腎皮質ホルモンの作用機序は甲状腺ホルモンのリセプターを増加させることであることも証明された (Niki et al. (1981) Suzuki and Kikuyama (1983)).

一方、変態を抑制するホルモンも知られるようになり、その本体はプロラクチンであることがわかった (Etkin and Gona (1967) Derby and Etkin (1968)). このホルモンは変態抑制作用の他に成長促進作用 (特に幼生に特有の器官の) があり (Berman et al. (1964) Bern et al. (1967)), 幼生時はこのホルモンにより成長が促進され、変態が急激に起こるのを防いでいると考えられている (Etkin (1970) Dodd and Dodd (1976)). 両生類におけるプロラクチンの生理作用は前記のもの他にイモリの水辺移動行動、水の皮膚への透過性低下、鰓や膀胱の Na^+ の再吸収促進、皮膚の粘液、輸卵管のゼリー-肛門腺の分泌促進などがあげられる。このホルモンは哺乳類で

は乳腺におけるミルクの分泌に欠かせぬホルモンとして知られているが、下等脊椎動物では実に多様な生物活性を示すことが明らかになってきている (Nicoll and Bern (1971)) (表-1-2)。両生類のプロラクチンはウシガエル、ヒキガエル、イモリで単離され、物理化学的性質が明らかにされた (表-1-3) (Yamamoto and Kikuyama (1981) Yamamoto and Kikuyama (1986) Matsuda et al. (1990))。特に、ウシガエルのそれは遺伝子の塩基配列およびアミノ酸配列も決定されている (Takahashi et al. (1990) Yasuda et al. (1991)) (図-1-9)。

G H は成長を促進するホルモンとして脳下垂体前葉より抽出された分子量約20,000のタンパク質であるが、G H の成長促進作用は肝臓で作られるソマトメジンを介することが知られている。ただし、G H の持つ生理作用のうちソマトメジンを介さない直接の作用もいくつか知られている。両生類では1989年純

表 - 1 - 2 プロラクチンの作用

円口類	4. 脂肪蓄積
1. 水・電解質代謝	5. 精子形成阻害
板鰓類	6. 色素胞の増殖および拡散
1. 水・電解質代謝	爬虫類
(水透過性および血中 Na^+ , 尿酸の低下)	1. 水・電解質代謝
硬骨魚類	(血中 Na^+ の維持)
1. 水・電解質代謝—淡水適応	2. 体成長および脂肪蓄積
(鰓・腸・腎臓・膀胱における水あるいは塩	(尾の再生, 脱皮促進)
透過性の低下, およびコルチゾルとの相互作用	3. 抗生殖腺刺激作用
による Na^+ の再吸収促進)	鳥類
2. 粘液分泌	1. 哺乳乳生産および哺育斑形成
(皮膚・口腔・鰓の粘液, 貯精袋の発達およ	2. 水・電解質代謝
び分泌促進)	(塩腺の Na^+ 分泌促進)
3. 脂肪蓄積	3. 羽の発達刺激
4. 生殖腺・副腎皮質刺激およびステロイドとの	(換羽抑制)
相互作用	4. 脂肪蓄積
5. 哺育行動	5. 抗生殖腺刺激作用およびステロイドとの相互
(巣づくり・口腔内孵卵・哺育)	作用
6. 色素胞の増殖および拡散	6. 哺育行動および渡りの衝動
両生類	哺乳類
1. 水・電解質代謝—水辺への移動	1. 乳腺の発達および乳汁分泌
(皮膚の水透過性の低下, 鰓, 膀胱からの Na^+	2. 水・電解質代謝
再吸収促進)	(腸, 腎臓の水・ Na^+ の再吸収促進)
2. 粘液分泌	3. 皮脂腺, 包皮腺の分泌
(皮膚の粘液, 輸卵管のゼリー, 肛門腺の分	(陰の粘液分泌)
泌促進)	4. 成長および脂肪蓄積
3. 幼生の成長	(毛の成熟, 内臓肥大)
(チロキシンと拮抗して, 尾・鰓などの成長	5. 生殖腺刺激およびステロイドとの相互作用
を促進し, 幼生型—水中生活を保つ)	6. 哺育行動
	(生殖行動抑制)

Nicoll and Bern (1971)より引用.

表 - 1 - 3 各種プロラクチンの物理化学的性質

	プロラクチン		
	イモリ	ヒキガエル	ウシガエル
分子量	23KD	23KD	23KD
等電点	4.7	5.3	5.8
S - S 結合の数	3	3	3
N 末端のアミノ酸残基	blocked	blocked	blocked (pyroGlu)

Chum salmon PRL-1

H-

Bullfrog PRL

pGlu Pro Ile Cys Pro Asn Thr Gly Ser Gly Cys Gln
H Thr Phe Val Cys Pro Asn Gly Pro Gly Asp Cys Gln

Ovine PRL

Ile Gly Leu Ser Asp Leu Met Glu Arg Phe Ser Gln Arg Ser Asp Lys Leu His Ser
Thr Ile Asn Pro Ala Leu Phe Asp Arg Ala Val Lys Leu Ser His Tyr Ile His Ser
Val Ser Leu Arg Asp Leu Phe Asp Arg Ala Val Met Val Ser His Tyr Ile His Asn Leu

Ser Thr Ser Leu Thr Lys Asp Leu Asp Ser His Phe Pro Phe Met Gly Phe Val Met Met
Ser Ser Glu Met Phe Asn Glu Phe Asp Glu Arg Phe Thr Phe Gly Arg Arg Phe Leu Ala
Ser Ser Glu Met Phe Asn Glu Phe Asp Lys Arg Tyr Ala Gln Gly Lys Gly Phe Ile Thr

Pro Arg Pro Ser Met Cys His Thr Ser Ser Leu Gln Thr Pro Lys Asp Lys Glu Gln Asn
Lys Ser Gly Ile Ser Cys His Thr Ser Ser Leu Asn Thr Pro Glu Asp Lys Glu Gln Val
Met Ala Leu Asn Ser Cys His Thr Ser Ser Leu Pro Thr Pro Glu Asp Lys Glu Gln Asn

Leu Lys Val Ser Glu Asn Glu Leu Ile Ser Leu Ala Arg Ser Leu Leu Leu Ala Phe Asn
Arg Gln Ile Gln His Glu Asp Leu Leu Asn Leu Val Leu (Lys) Val Leu Arg Ser Thr Asn
Gln Gln Thr His His Glu Val Leu Met Ser Leu Ile Leu Gly Leu Leu Arg Ser Thr Asn

Asn Pro Leu Leu Leu Ser Ser Glu Ala Pro Thr Leu Pro His D Phe Ser Asn Gly
Asp Pro Leu Val His Met Val Ser Glu Val Gln Asp Ile Arg Glu Ala Phe Asp Thr Phe
Asp Pro Leu Tyr His Leu Val Thr Glu Val Arg Gly Met Lys Gly Val Phe Asp Ala Ile

Asp Ile Ser Ser Lys Ile Arg Glu Leu Gln Asp Tyr Ser Lys Ser Leu Gln Asp Gly Leu
Ser Lys) Thr Val Gln Val Gln Gln Gln Thr Lys Arg Phe Leu Gln Gly Met Glu Arg
Ser Arg Ala Ile Gln Ile Gln Gln Glu Asn Lys Arg Phe Leu Glu Gly Met Gln Met

Asp Phe Met Val Asn Lys Met Gly Pro Ser Ser Gln Tyr Ile Ser Ser Ile Phe Phe Lys
D Phe Ile Gly Arg Ile Gln Pro Gly Asp Leu Gln Asn Gln Ile Lys Ser Phe Phe D
D Phe Phe Gly Gln Val Ile Pro Glu Ala Lys Gln Thr Gln Pro Lys Pro Val Thr Ser

Gly Gln Asp D Leu Gly Asn Asp Lys Thr Ser D Arg Leu Ile Asn Phe His Phe Leu
Pro Gly Pro Ala Ser Ile Pro Gly Asp Gln Asn Ser Arg Leu Phe Ala Phe Tyr Asn Leu
Gly Leu Pro Ser Leu Gln Thr Lys Asp Gln Asp Ala Arg His Ser Ala Phe Tyr Asn Leu

Met Ser Phe Phe Arg Arg Asp Ser His Lys Ile Asp Ser Phe Phe Lys Val Leu Arg Cys
Leu His Cys Leu Arg Arg Asp Ser His Lys Ile Asp Asn Tyr Leu Lys Ile Leu Lys Cys
Leu His Lys Leu Arg Arg Asp Ser Ser Lys Ile Asp Thr Lys Leu Lys Leu Leu Asn Cys

Arg Ala Thr Lys Met Arg Pro Glu Thr Cys OH
Arg Leu D D Ile His Glu Gly Asn Cys OH
Arg Ile D D Ile Tyr Asn Asn Asn Cys OH

☒ - 1 - 9

ウシガエルプロラクチンの一次構造と他の動物のプロラクチンの一次構造の比較。他の動物のプロラクチンの一次構造で、ウシガエルプロラクチンと相同なアミノ酸を網掛けにより示してある。 () : 未確定、D: 欠如

小林 (1990) より引用

化され、物理化学的性質が明らかにされた (Kobayashi et al. (1989 a)) (図 - 1 - 10)
。そして、両生類成体における成長が GH の
間接作用であることも示されている (Kobaya
shi et al. (1989 b))。また脳下垂体除去の
幼生に両生類プロラクチンや GH を注射する
とプロラクチンでは後肢の成長を促進しない
が、GH では有意に後肢の成長を促すことが
知られている。

さて、両生類無尾目には変態後も水中に
生活する水生種 (例としてアフリカツメガエ
ル: Xenopus laevis)、変態後水中および陸
上の両方に生活する半水生種 (例としてウシ
ガエル: Rana catesbeiana)、生殖期以外は
主に陸上に生活する陸生種 (例としてヒキガ
エル: Bufo japonicus) が存在する。陸生種
のヒキガエルはすでに変態最盛期の途中から
生活圏として陸上を選択し、変態期間が極め
て短いことが特徴である。筆者は先に述べた
変態に関与している主なホルモンについてヒ

GH H Phe Pro ~~GLN~~
PRL pGlu Pro Ile Cys Pro Asn Thr Gly Ser Gly Cys ~~GLN~~

Met Ser Leu Ser Asn ~~Leu Phe~~ Thr Asn ~~Ala Val~~ Ile Arg Ala Gln His Leu ~~His~~ Gln Met
Thr Ile Asn Pro Ala ~~Leu Phe~~ Asp Arg ~~Ala Val~~ Lys Leu Ser His Tyr Ile ~~His~~ Ser Leu

Val Ala Asp Thr Tyr Arg Asp Tyr Glu Arg Thr Tyr Ile ~~Pro~~ Glu Asp Gln ~~Arg Phe~~ Ser
Ser Ser Glu Met Phe Asn Glu Phe Asp Glu Arg Phe Thr ~~Pro~~ Gly Arg D ~~Arg Phe~~ Leu

Asn ~~Lys~~ His Ser Tyr ~~Ser~~ Val Tyr ~~Cys~~ Tyr Ser Glu(Thr)Ile Pro Ala ~~Pro~~(Thr Gly) ~~Lys~~
Ala ~~Lys~~ Ser Gly Ile ~~Ser~~ D D ~~Cys~~ His Thr Ser Ser Leu Asn Thr ~~Pro~~ Glu Asp ~~Lys~~

Asp Asp Thr Glx Glx Lys)Ser Asp Ile Glu ~~Leu~~ Arg Phe Ser ~~Leu~~ Leu ~~Leu~~ Gln
Glu Gln Ala Arg Gln Ile Gln His Glu Asp Leu ~~Leu~~ Asn Leu Val ~~Leu~~(Lys)Val ~~Leu~~ Arg

~~Ser Met~~ Met Asn ~~Pro~~ Ile Gln Ile D ~~Val~~ Asn Arg ~~Val~~ Phe Gly Asn Asn Gln Val Phe
~~Ser Met~~ Asn Asp ~~Pro~~ Leu Val His Met ~~Val~~ Ser Glu ~~Val~~ Gln Asp Ile Arg Glu Ala Pro

Gly Asn ~~Met~~ Asp Arg(Val Tyr Asp Arg) Asp Leu Asp Glu Gly D ~~Leu~~ His Ile
Asp Thr ~~Met~~ Leu(Ser Lys)Thr Val Glu Val Glu Glu Gln Thr Lys Arg Leu ~~Leu~~ Gln Gly

Leu Ile ~~Met~~ D Glu Leu Asp Asp Gly Asn Val Arg Asn Tyr Gly Val Leu Thr Phe
Met Glu ~~Met~~ Ile Ile Gly Arg Ile Gln Pro Gly Asp Leu Glu Asn Glu Ile Tyr Ser Pro

Phe Asp Val Asn Leu Arg Ser ~~Glu~~ Glu Gly ~~Arg~~ Ala Lys Asn D ~~Lys~~ Gly
Trp Pro Gly Pro Ala Ser Ile Pro Gly Asp ~~Glu~~ Asn Ser ~~Arg~~ Leu Phe Ala Phe ~~Lys~~ Asn

~~Leu Leu~~ Ser ~~Cys~~ Phe Lys Lys ~~Asp~~ Met ~~His Lys~~ Val Glu Thr ~~Tyr Leu Lys~~ Val Met ~~Lys~~
~~Leu Leu~~ His ~~Cys~~ Leu Arg Arg ~~Asp~~ Ser ~~His Lys~~ Ile Asp Asn ~~Lys Leu Lys~~ Leu Leu ~~Lys~~

~~Val Met~~ Arg Phe Val ~~GLN~~ Ser ~~Asn Cys~~ Thr Phe OH
~~Cys Met~~ Leu Ile His ~~GLN~~ Gly ~~Asn Cys~~ OH

図 - 1 - 1 0

ウシガエル成長ホルモンとプロラクチンの一次構造の比較。
システインであわせ、最大の相同性を示すように比較してある。等
しいアミノ酸部位は網掛けで示してある。

() : 未確定、 D : 欠如、 空白 : 未分析

小林 (1990) より引用

キガエルの場合のホルモンレベルの変化と、
比較的変態に時間を要するウシガエルの場合
の変化とを比較し、ヒキガエルにおける変態
のホルモン調節について考察することを目的
として研究を行った。

第二章 ヒキガエル幼生の甲状腺ホルモンレベルについて

従来、無尾両生類幼生の甲状腺ホルモンレベルの測定には、主として比較的血液量の多い大型のウシガエル幼生が用いられてきた (Miyachi et al. (1977) Regard et al. (1978) Mondou and Kaltenbach (1979) Suzuki and Suzuki (1981))。これは採血が容易なため、ラジオイムノアッセイでの測定に好都合であるためである。ウシガエル以外では、幼生期における甲状腺ホルモンレベルの報告はわずかにアフリカツメガエル (Leloup and Buscaglia (1977)) とミドリウシガエル (Rana clamitans) (Weil (1986)) の2種があるだけである。すでに述べたように、成体になって陸生となるヒキガエルの変態様式が上記の種に比べてすみやかに変態が完了すること、その際の体のサイズが小さいことなどの点で

異なることから、まずヒキガエルにおける変態期の甲状腺ホルモンレベルの測定を行い、他の種で得られているデータと比較することにした。ヒキガエル幼生はウシガエル幼生よりはるかに小型で、個々の動物から得られた血清サンプルはあまりに少量すぎて、測定不能である (Just et al. (1981))。そこで、筆者は個々の動物組織から甲状腺ホルモンを抽出して測定に用いた (Tagawa and Hirano (1987) Tagawa and Hirano (1990))。チロキシン (T_4) とトリヨードチロニン (T_3) の測定はラジオイムノアッセイ (RIA) 法を用いて行った。

材 料 と 方 法

動 物

東京都内の池において、2月中旬から3月上旬にかけて採取されたヒキガエルの卵を

当研究室に持ち帰り 23℃ でふ化させ、幼生は常時餌（ゆでたホウレン草）を摂取できる状態で飼育した。水は水道水を一日以上通気したものを用了。Limbough and Volpe (1957) 発生段階表によりヒキガエル幼生をステージ 36、38、40、42、44、46に分けて、各々のステージごとに凍らせ、-80℃ で保存したものをサンプルとした。それに加え、ステージ 42 のヒキガエル幼生において 5 匹分を下顎の部分とその他の組織の部分とに分けて、同様に凍らせて保存し、甲状腺含有部と非含有部の T_4 と T_3 の濃度の違いを調べるための材料とした。

甲状腺ホルモンの抽出

チロキシン (T_4) とトリヨードチロニン (T_3) の抽出は以下のように行った (Gordon et al. (1982) Greenblatt et al. (1989))。

ヒキガエル幼生サンプルを4 mlのメタノール中でホモジェナイズし、これを半量に分け、各々に ^{125}I ラベルの T_4 (150 $\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$, Amersham) と ^{125}I ラベルの T_3 ([L-3,5,3', ^{125}I] T_3 150 $\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$, Amersham) を加える。これは T_4 と T_3 の回収率をみるためである。遠心後上清を取分け、上清にさらに1 mlのメタノールを加える。これに7 mlのクロロホルムと2 mlの0.05%の塩化カルシウムを加え、攪はん後遠心する。上清を取り、これをエバポレートし、バルビタール緩衝液1 mlを加えてRIAに用いた。なお、回収率は T_4 が50-70%、 T_3 が60-70%であった。

T_4 および T_3 の RIA 法

T_4 の定量にはラジオイムノアッセイ法を用いた (Dickhoff et al., (1978) Tagawa and Hirano (1987))。 T_4 の抗体には Wien Laboratories Inc. の抗チロキシン-ウサギ血

清を使用した。この抗体の T₃ との交叉率は 3.4% 以下であった。抗体や標識ホルモンの希釈には 0.1% のトライトン X-100 と 0.1% アジ化ナトリウム、0.25% のウシγ-グロブリンを添加した pH 8.6 の 0.11 M バルビタール緩衝液（緩衝液 A）、および 0.14 M 塩化ナトリウムと 0.1% アジ化ナトリウムを加えた pH 7.6 の 0.01 M リン酸緩衝液（緩衝液 B）を用いた。

まず、チューブに緩衝液 A で溶解したサンプル 10 μl と緩衝液 B で希釈した 50 μl の抗体および緩衝液 A で希釈した標識ホルモン 50 μl（約 20,000 cpm）を加え、140 μl の緩衝液 A を加えて液量を 250 μl とする。これを攪はん後、4°C で 24 時間 インキュベーションを行った。抗体の濃度は標識していないチロキシンなしで標識ホルモンと抗体の結合率が 30-40% となる希釈で行った。インキュベーション終了後、50 mM EDTA と 20% のポリエチレングリコール 6000 を含む緩衝液 B で

60倍に希釈した抗ウサギ血清を200 μ l加えて攪はんし、氷冷下緩衝液Bを500 μ lを加え、再び4 $^{\circ}$ Cで30分間放置した。抗体と結合したホルモンと結合していないホルモンとを分離するため4 $^{\circ}$ Cで30分間遠心分離(3,000 r.p.m.)した。上清を吸引によって取り除き、沈澱の放射活性をガンマカウンタで測定した。なお、RIAの測定内変動は2.9%、測定間変動は5.9%である。

T₃の定量に用いた抗体は抗トリヨードチロニン—ウサギ血清(Endocrine Sciences)で、T₄との交叉率は2.7%以下であった。抗体および標識ホルモンの希釈は0.5%の牛血清アルブミンと0.05%のアジ化ナトリウムを加えたボレート緩衝液(緩衝液C)で行った。緩衝液Aで溶解したサンプル100 μ lと100 μ lの8-anilino-1-naphthalene-sulfonic acid sodium salt(0.25%)を加えた緩衝液C、および100 μ lの300倍希釈した抗体をチ

ューブに入れ、 37°C で1時間震蕩しながらさらに $100\mu\text{l}$ の標識ホルモン(約 $14,000\text{cpm}$)を加え、再び 37°C で1時間インキュベーションした。抗体と結合しているホルモンと結合していないホルモンの分離には 1ml のデキストランでコートしたチャコールの懸濁液(1ml)を用いた。このRIAの測定内変動は 7.4% 、最少検出量は 6pg/ml であった。図-2-1に示すように、組織抽出物の結合阻害曲線は T_4 の場合も T_3 の場合も標準曲線と平行性を示した。

甲状腺への放射性ヨウ素の取り込み

各発生段階におけるヒキガエル幼生を 1ml 中に $0.2\mu\text{Ci}$ の Na^{131}I (Amersham)を含む飼育水で 22°C にして飼育した後、各々の幼生から甲状腺を取り出した。この取り出した甲状腺からガンマカウンターで放射活性を測定した。図-2-2に示すように、ヨウ

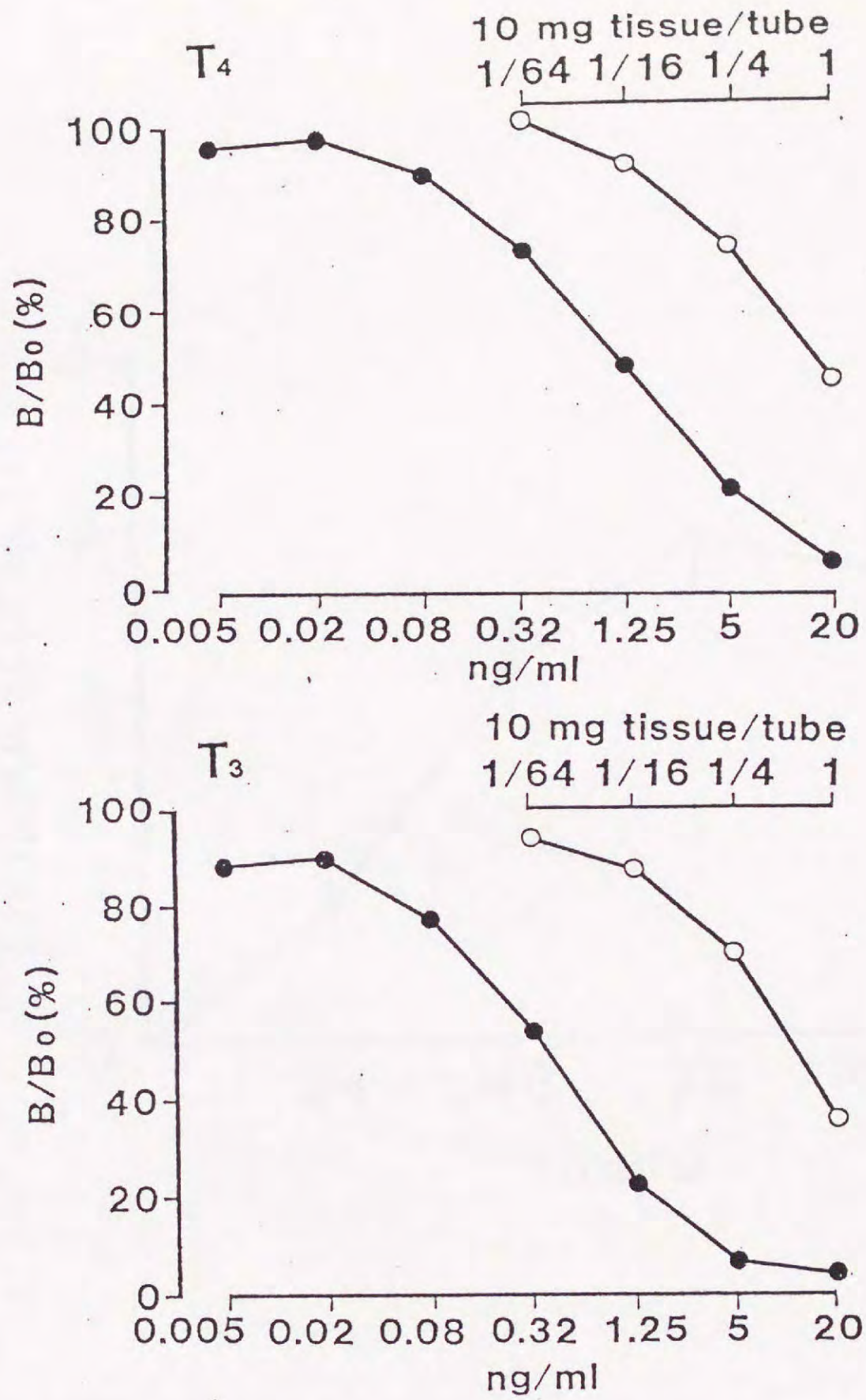


図 - 2 - 1 甲状腺ホルモン (T₄, T₃) R I A 系の標準曲線 (●) とヒキガエル幼生の組織抽出物 (○) との競合阻害反応
ヒキガエル幼生の組織抽出物は標準曲線に平行に反応している。

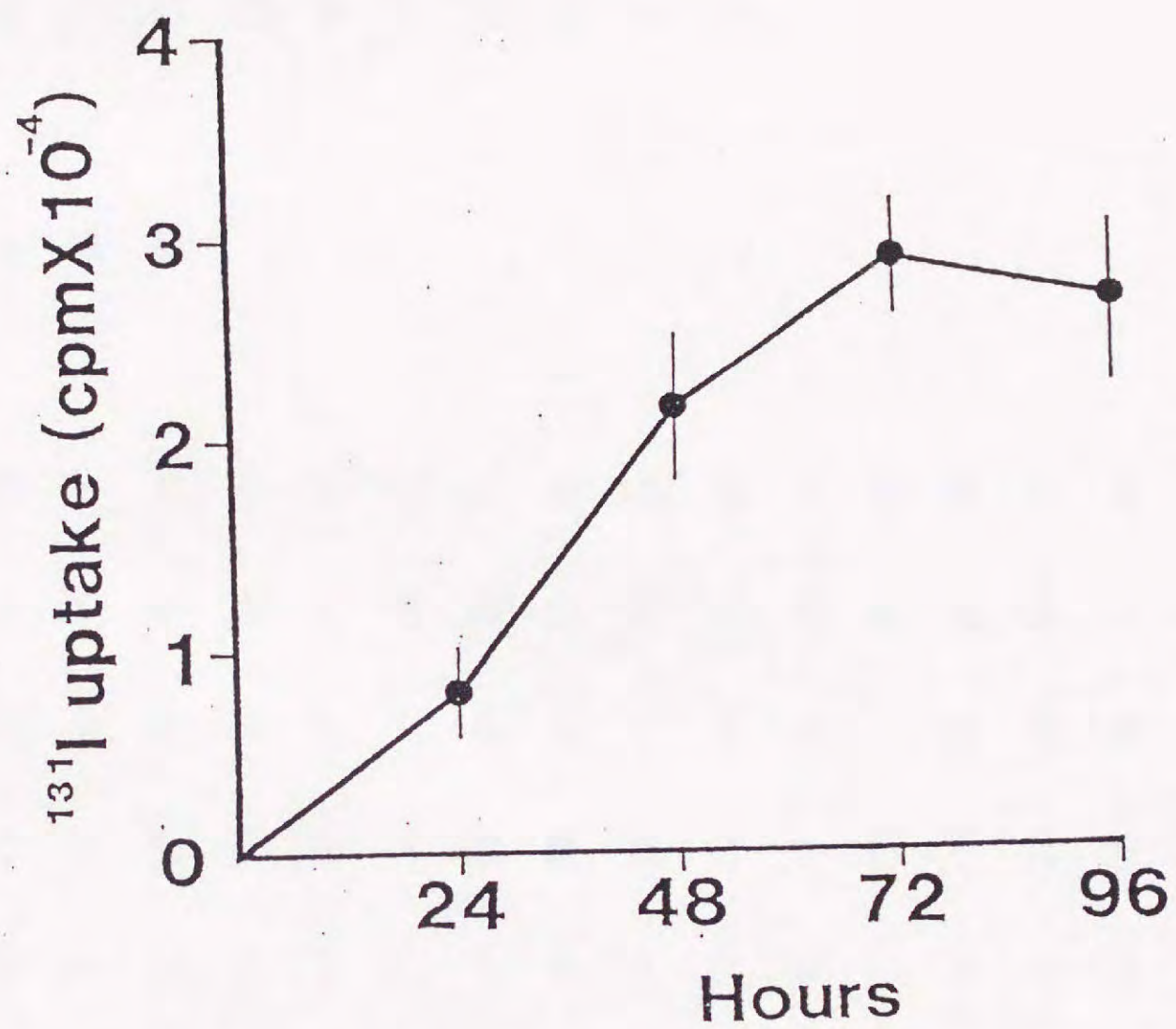


図 - 2 - 2 ヒキガエル幼生甲状腺へのヨウ素の取り込みの時間の経過によるの変化
 動物は ^{131}I を含む飼育水におかれたステージ 40 の幼生を使用した。各々の値は 4 例の平均値とその標準誤差である。

素の取り込みは72時間まで時間とともに増加することがわかったので、オタマジヤクシの各変態段階における甲状腺への ^{131}I の取り込みは72時間目に測定した。

結果と論議

図一2-3は変態各発生段階におけるヒキガエル幼生の組織全体の甲状腺ホルモン濃度の変化を示したものである。甲状腺除去を行った幼生と脳下垂体除去を行った幼生ではチロキシン(T_4)もトリヨードチロニン(T_3)も検出できなかつた(0.2 ng/g tissue以下)。このことは放射免疫測定法で測定しうる物質が甲状腺由来のものであり、組織中へ同物質の放出において、脳下垂体が存在しないと十分に行われていないことを示している。また、変態前期のステージ36ではチロキシン(T_4)もトリヨードチロニン(T_3)も検出できなかつた(0.2 ng/g tissue以下)

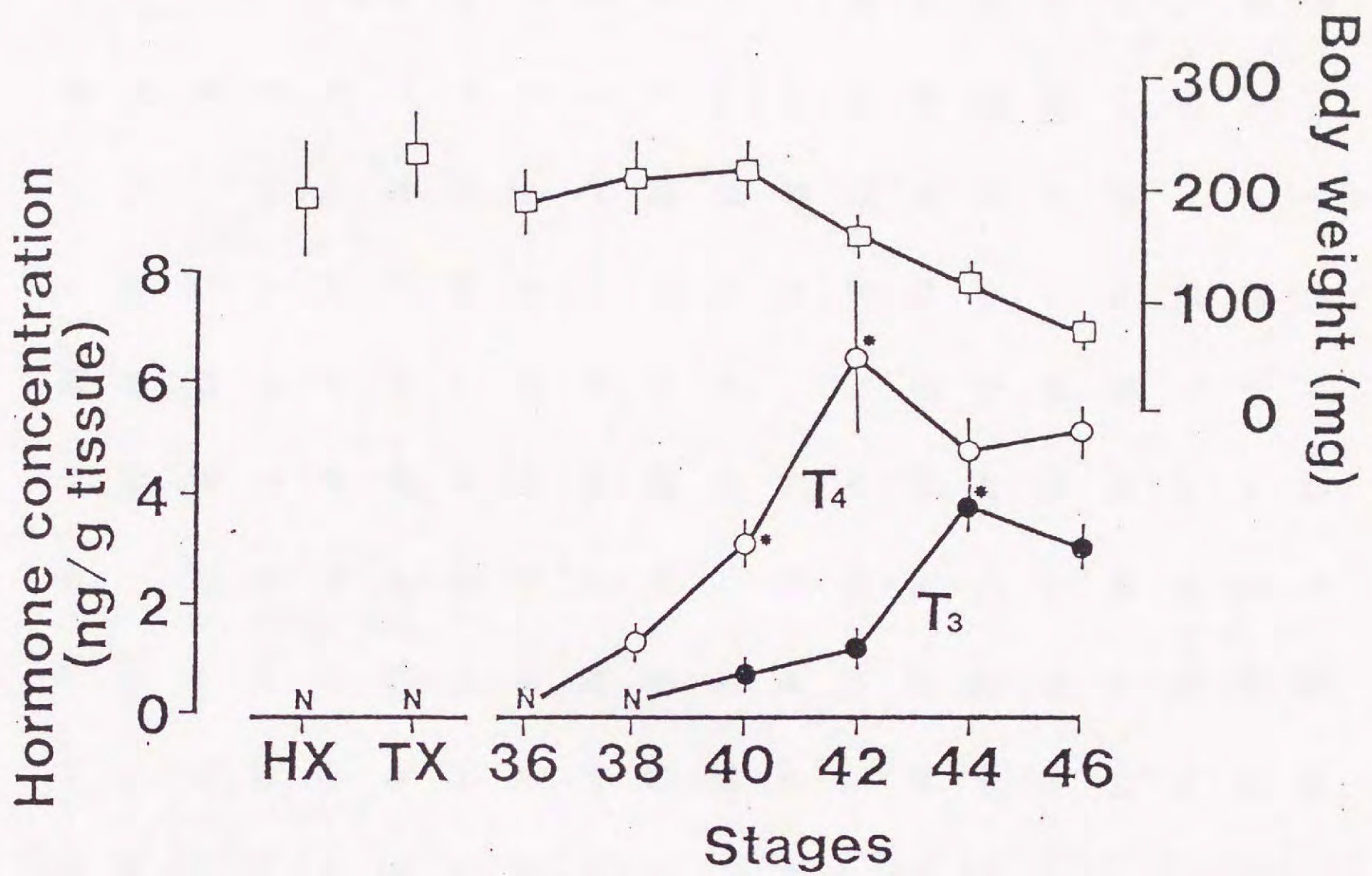


図 - 2 - 3 ヒキガエル幼生の変態期における体重 (mg) とチロキシン (○)、トリヨードチロニン (●) の組織中濃度の変化
 各々の値は 7 ~ 8 例の平均値とその標準偏差である。
 H X: 脳下垂体除去動物、 T X: 甲状腺除去動物、 N: 検出できず (0.2 ng/g tissue 以下)、 * 直前の値にくらべて有意 $P < 0.05$ (Student's t-test)

。T₄においては、変態始動期の早いうち（ステージ38）より濃度の上昇が起こり、変態最盛期半ば（ステージ42）に最高値を示す。

一方、T₃においては変態始動期半ば（ステージ40）より濃度の上昇が起こり、変態最盛期を通して高い値を示す。この変動のパターンは他の無尾両生類幼生のそれと類似している。ヒキガエルではT₄の組織内の濃度がウシガエルの血液中濃度とほぼ同程度であるが、T₃はヒキガエルでの場合が2倍以上も濃度が高いことがわかった。T₃はT₄よりも約10倍程度生物活性が高く、T₄よりT₃への組織内での変換が阻止されると、変態が途中で停止すること（Buscaglia et al. (1985)）からT₄よりもむしろT₃が変態に重要な役割を持っていると考えられる。したがって、組織内の濃度と血液中の濃度を直接くらべることはできないが、組織中のT₃濃度がヒキガエルでかなり高いことは、同種の変態がすみやかに起こることと考え合わせて興味深い

ことである。

甲状腺を含む下顎の部分をヒキガエル幼生（ステージ42）より切り離し、下顎とそれ以外の部分から別々に甲状腺ホルモン（ T_3 と T_4 ）を抽出し、各々をラジオイムノアッセイにより測定した。その結果が表-2-1である。このように T_3 の下顎部分の濃度（ 1.8 ng/g tissue ）とそれ以外の組織の部分の濃度（ 1.7 ng/g tissue ）ではほぼ同じ濃度であった。それに対して T_4 では、下顎部分の濃度（ 9.1 ng/g tissue ）とそれ以外の組織の部分の濃度（ 5.3 ng/g tissue ）とでは甲状腺を含む下顎の組織に比較的高濃度に含まれている。このことは T_4 は甲状腺で生産され貯蔵されているが、 T_3 は主として末梢で T_4 より変換されて生成されることを示している。したがって、体全体の組織から抽出を行って測定された T_3 濃度は甲状腺内の T_3 を考慮する必要はなく、そのまま組織内濃度（の平均）ととれる。一方、 T_4 の場合

表 - 2 - 1 ヒキガエル幼生の各組織における T₄ と T₃ の濃度

組織	T ₄ (ng/g tissue)	T ₃ (ng/g tissue)
下顎の組織	9. 1	1. 8
下顎以外の組織	5. 3	1. 7
体全体の組織	5. 9	1. 7

T₄ と T₃ はステージ 42 の 5 匹の幼生から下顎の組織と下顎以外の組織とを切り離し各々をプールして抽出を行った。下顎の組織の重さは 0.12g と 0.10g で下顎以外の組織の重さは 0.64g と 0.67g であった。

組織内濃度は甲状腺内の T_4 濃度が高いので
やや割り引く必要があることを示している。
しかしながら、先にも述べたように T_3 が変
態の主導権を握っているので、 T_4 について
は余り考慮する必要がなく、本研究ではあえ
て甲状腺を含めた全体の組織中の濃度を示す
ことにした。

幼生の各ステージにおける甲状腺ホルモ
ンの合成は変態最盛期の前まで増加を続け、
変態最盛期前半に最高値を示す(図-2-4)
。このことは、甲状腺ホルモンの合成が変態
の進行とともに高まることを示しており、他
の種における結果とも一致する(Saxen et al
.(1957 a) Kate (1961) Hanaoka (1966) Han
aoka et al. (1973))。その後取り込みは減
少の傾向を示した。これは甲状腺ホルモンの
組織レベルの濃度が高いことから、甲状腺の
合成能が低下したとは考えられず、他に原因
があるとみられる。すなわち、Dod d and Dod
d (1976)によって指摘されてるように、変態

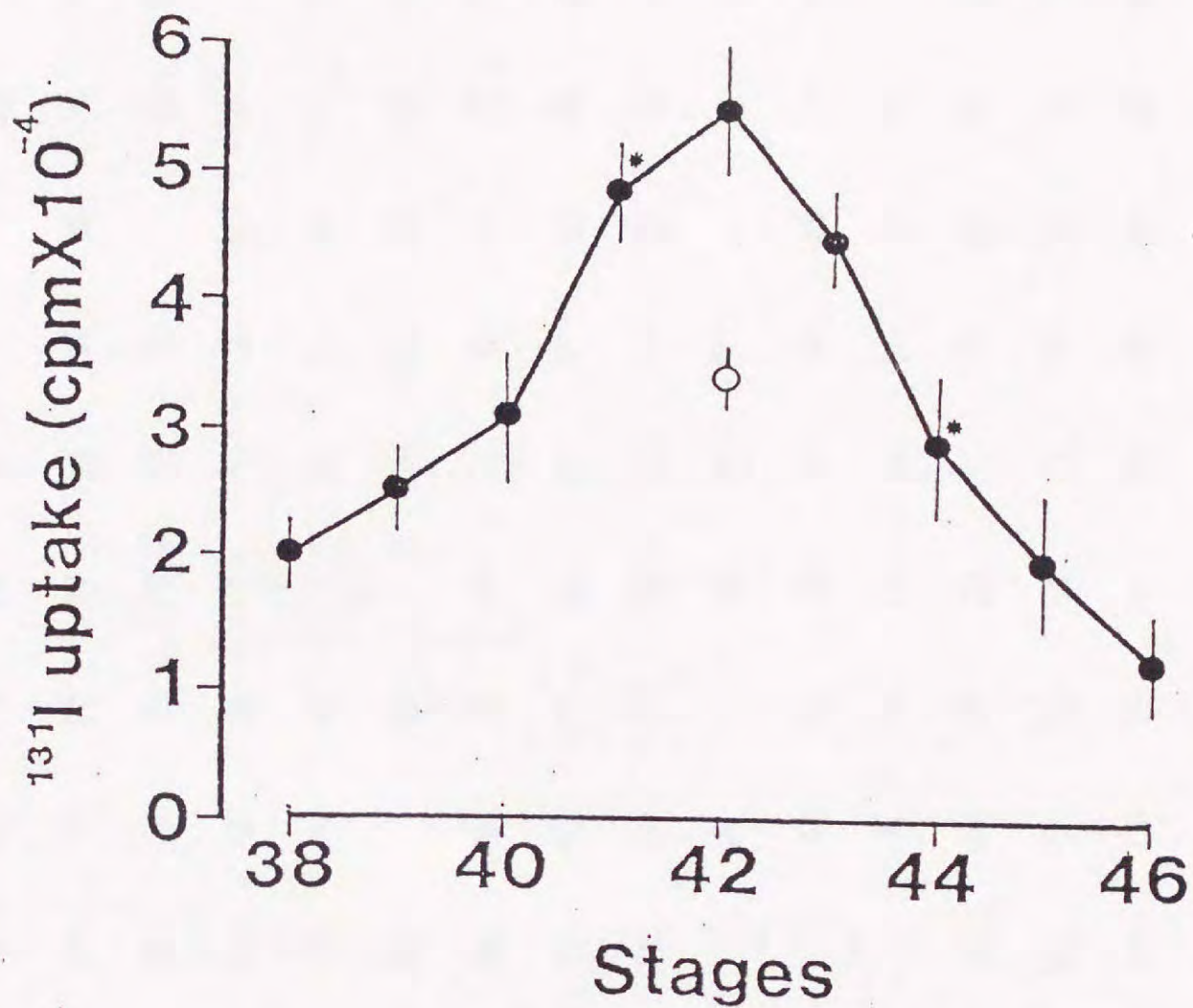


図 - 2 - 4 ヒキガエル幼生甲状腺への放射性ヨウ素の取り込み
 動物は ^{131}I を含む飼育水に72時間おかれた後、甲状腺が取り出され、測定に供された。各々の値は5例の平均値とその標準誤差である。●：正常動物、○：脳下垂体原基を取って尾のつけ根に移植された動物、* 直前の値にくらべて有意 $P < 0.05$ (Student's t-test)

にともなって皮膚が肥厚し、物質を透過しにくくなること、鰓が消失するため全体として¹³¹Iの取り込みが減ること、餌を食べなくなるので餌とともに体内に入る分がなくなること、取り込みは十分あっても放出も盛んなため、見かけ上減少しているようになることなどが原因であろうと思われる。この点を解決するには¹³¹Iを直接動物に投与して測定することが考えられるが、ヒキガエル幼生はサイズが小さく、体からもれやすいことなどの点からあえて飼育水に¹³¹Iを加える方法をとった。いずれにしても変態最盛期よりも前の期間における甲状腺の活性は得られたデータより推定可能である。

第三章 ヒキガエル幼生の視床下部と変態

一般に、甲状腺ホルモンの分泌は主として甲状腺刺激ホルモン (TSH) によって引き起こされる。さらに TSH の分泌は視床下部の TSH 放出ホルモンによって調節されている。両生類では TSH 放出ホルモンの本体が哺乳類と同様な pGlu-His-Pro-NH₂ であるかどうかはわかっていない。いずれにしても両生類幼生で脳と下垂体の連絡を断つと変態が中断されてしまうことがしばしば観察され、これは視床下部からの TSH 放出ホルモンが十分に TSH 細胞に到達できぬためと考えられてきた。ところが、ヒキガエル幼生では胚期に下垂体原基を取って尾に移植しておいても変態が進行する。そして変態の進行はやや正常のものより遅いが変態は完了する。ヒキガエル幼生でも下垂体または甲状腺が無ければ、変態の兆候がみられないことから、T S

H によつて放出される甲状腺ホルモンが変態には不可欠であるはずである。ヒキガエル幼生で視床下部から切り離された下垂体によつても変態を完了させうるのはどの様な理由によつてかを探るための実験を行った。その一つは尾のコラーゲン合成能を測定する実験である。プロラクチンが尾のコラーゲン合成能を高めることは知られており、プロラクチンは後の章で詳述するように変態抑制効果を持つ。そこで尾部に移植された下垂体を持つ動物でプロラクチン活性を測定すれば、プロラクチン活性が低いため甲状腺ホルモンレベルが低くても変態が起こるかどうかが推測できる。もう一つは尾部に下垂体を持つ動物が変態最盛期に達したときに第二章で述べた方法で甲状腺への ^{131}I の取り込みを調べ、甲状腺の活性が正常のそれと同程度か否かを検討することである。

材 料 と 方 法

尾芽期のヒキガエル胚より下垂体原基を取り除いたもの、同様に原基を切り出して尾部の皮下に移植したものを発生させて材料とした。これらの幼生が変態始動期に達したとき、プロラクチン $1 \mu\text{g}$ または食塩水を1日おき3回投与する。翌日に尾部を切り出して細切し、 ^{14}C -プロリン (Specific activity: 295 mCi/mmol , Amersham) $0.2 \mu\text{Ci}$ を含む 2 ml 培養液中で3時間インキュベートしたのち、Yoshizato and Yasumasu (1970) の方法により、コラーゲン画分を尾部より抽出し、放射活性を測定した。一方、尾に下垂体移植片を持つ幼生が変態最盛期にさしかかったとき、第二章で述べた方法により ^{131}I を含む水で飼育し、72時間後に甲状腺を取り出して甲状腺の放射活性を測定した。

結果と論議

図一三—1に示すように、脳下垂体除去動物のコラーゲンへの ^{14}C -プロリンの取り込みは有意に正常なものより低く、それにプロラクチンを投与すれば、取り込みが正常動物なみに上昇した。脳下垂体を尾に移植された動物は正常なものとは比べて統計的に有意な ^{14}C -プロリンの取り込みの変化を示さなかった。このことから、脳下垂体を視床下部から切り離された動物では正常なものに比べ、血液中プロラクチンのレベルに大きな差が無いと推測された。一方、 ^{131}I の甲状腺への取り込みは図一三—2に示すように、同じ変態段階の正常個体に比べて有意に低い値を示した。このことから、脳下垂体を尾に持つ動物は甲状腺の活性は決して正常のものより高くないにもかかわらず変態が完了することが確かめられた。したがってヒキガエル幼生の場合には正常の動物の場合より甲状腺ホルモン

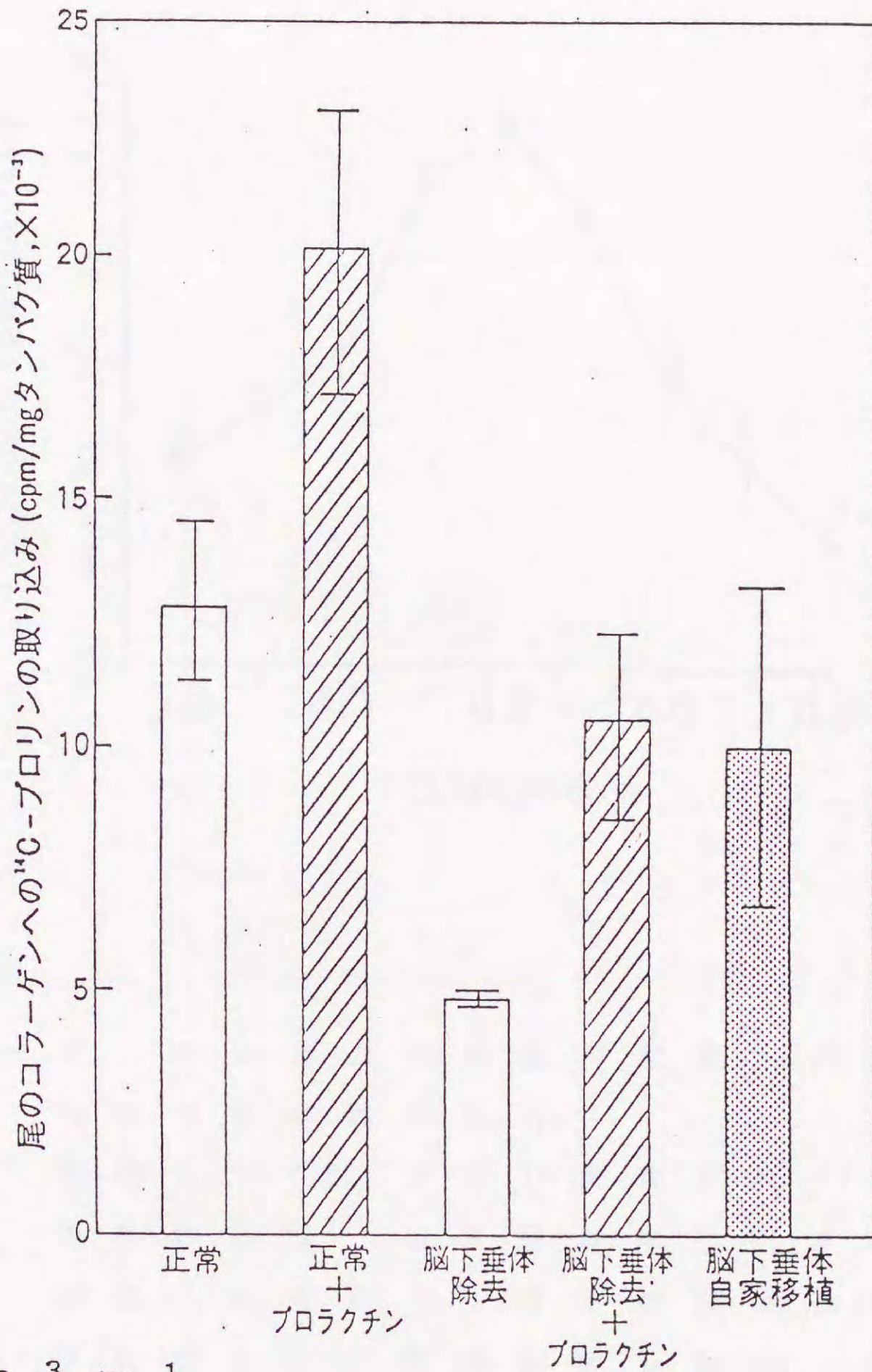


図 - 3 - 1

ヒキガエル幼生の尾のコラーゲン合成に及ぼす脳下垂体およびプロラクチンの影響。プロラクチン(1 μ g)を隔日3回投与し翌日尾を切り出して試験管内で 14 C-プロリンを3時間取り込ませた

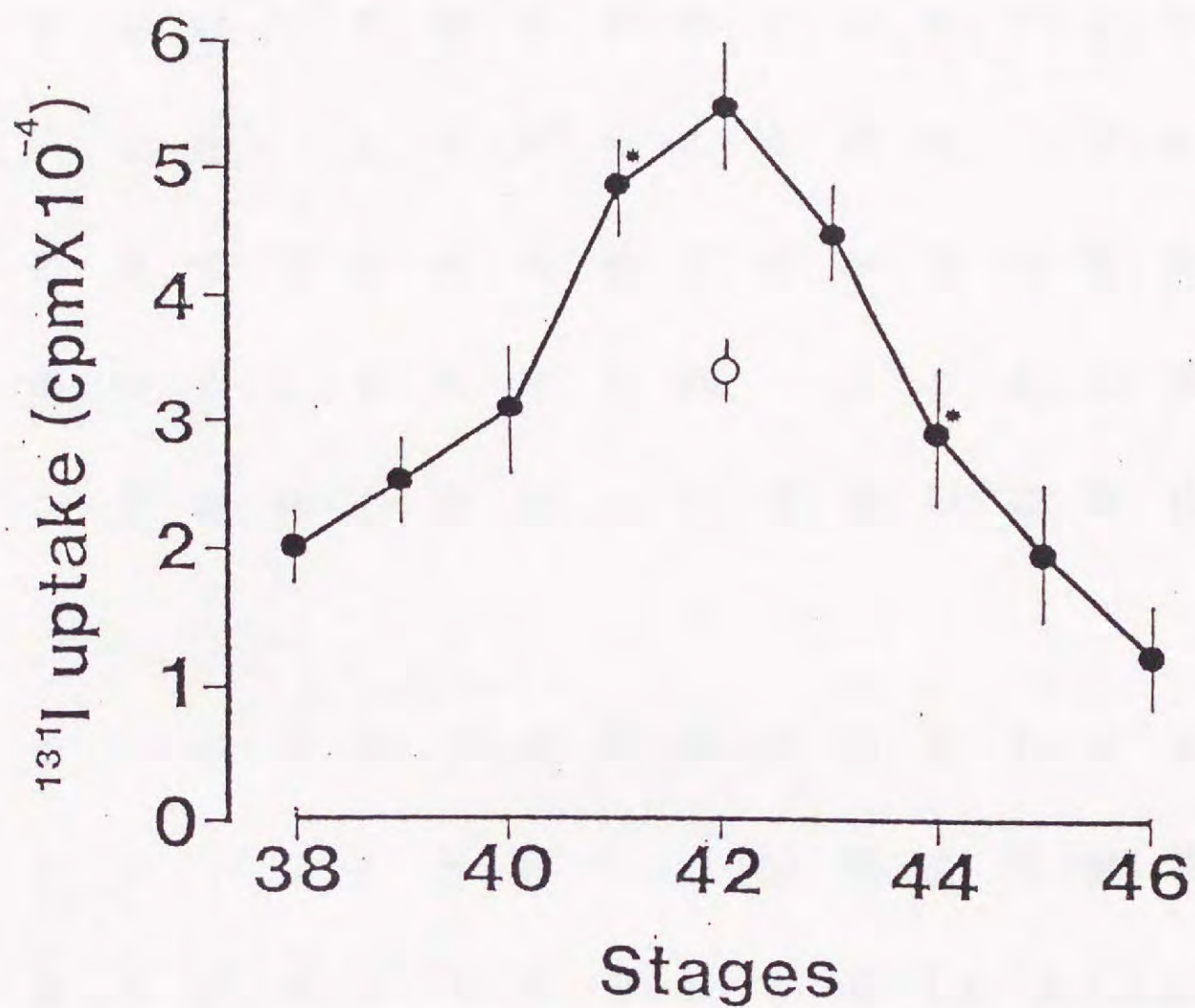


図 - 3 - 2 ヒキガエル幼生甲状腺への放射性ヨウ素の取り込み
 動物は ^{131}I を含む飼育水に72時間おかれた後、甲状腺が取り出され、測定に供された。各々の値は5例の平均値とその標準誤差である。●：正常動物、○：脳下垂体原基を取って尾のつけ根に移植された動物、* 直前の値にくらべて有意 $P < 0.05$ (Student's t-test)

レベルが低くても変態を完了させるわけで、正常の場合にはえき値以上の甲状腺ホルモンが分泌されていて変態を早めていることが推測できる。また、ヒキガエルの場合、甲状腺ホルモンに対する組織の感受性が他の動物の場合より高いことも考えられ、この点に関してホルモン受容体の面からの研究の必要性がある。

最近、両生類では生殖腺刺激ホルモン放出ホルモン (GnRH)、副腎皮質刺激ホルモン放出ホルモン (CRH) を *in vitro* で下垂体に作用させると、その培養液中に甲状腺を刺激する (T_4 を放出させる) 物質が増加することが報告されている (Denver and Licht (1989))。 Sakai et al. (1990) は脳下垂体前葉ホルモンすべて純化したウシガエル由来のものを用いて、それらとウシガエル甲状腺とをインキュベートし、脳下垂体ホルモンの甲状腺刺激活性を検討した。それによれば、TSHの他にLHが甲状腺より T_4 を放出さ

せる活性があるが A C T H には活性が無いことがわかった。したがって、L H R H によって起こる甲状腺からの T₄ の放出は L H を介していること、C R H は A C T H 以外の脳下垂体ホルモンを介して甲状腺より T₄ を放出させると見なすことができる。このように甲状腺が多種の因子によって調節されていることから考えて、そのような物質の生成源を視床下部あるいは脳下垂体に限定することは、必ずしも正しくないかもしれないわけである。ヒキガエル幼生の脳下垂体が視床下部と離れていても、ある程度甲状腺を刺激して変態を完了させうるのは、視床下部由来でない脳下垂体を刺激するものが、一般循環に存在するためかも知れず、今後の研究が待たれる。

第四章 ヒキガエル幼生の変態の各段階における副腎皮質ホルモンの血中レベルの変化

両生類では、副腎皮質ホルモンは甲状腺ホルモンの作用をその受容体を増加させることにより強めることが知られており、ヒキガエル幼生でもそのことは確かめられている。そこで、副腎皮質ホルモンのうち上記の点で最も活性の強いアルドステロンの血液中濃度を測定し、変態の各段階における濃度変化を調べ、ヒキガエル幼生が他の種に比べて、より副腎皮質ホルモンが変態に寄与している可能性があるか否かを検討することにした。

材料と方法

各発生段階のヒキガエル幼生の胸部を切り開き、体液をろ紙で吸い取った後、ピンセ

ットで心臓の心室部に傷をつける。このようにすると、血液が心臓の収縮ごとに心臓外へ放出される。これをヘパリン処理（コート）したヘマトクリット管で吸い上げ、約5匹分の血液（約100 μ l）を氷冷下のスピッツ管にプールした。このプールした血液を4・C 20分間3,000 r.p.m.で遠心し、上清（血清）を得た。血清50 μ lに1 mlのジクロロメタンを加えて攪はんし、ジクロロメタン中に移行したステロイド（アルドステロン）を抽出した。³H-アルドステロンをトレーサーとして回収率を測定したところ、抽出効率は90%であった。ジクロロメタン画分を取り、それに窒素ガスを吹き付けて乾燥したものをRIAのサンプルとした。

RIAのための抗体はMiles-Yeda社より得られたもので、同社のRIAマニュアルに従ってアッセイを行った。この抗体とアルドステロン以外のホルモンとの交叉率は0.1%以下で、200 μ lアッセイバッファー中に6.7

pgが検出限界であった。測定内および測定間変動係数はそれぞれ9.2%および8.0%であった。

結果と論議

図一四一に示すようにアルドステロンの血液中濃度は変態の進行とともに上昇し、変態最盛期の中ごろにピークに達した。すでに第二章で明らかかなように、甲状腺ホルモンの組織中のレベルもほぼ同じような経過をたどって上昇することから、アルドステロンが甲状腺ホルモンの作用を強めるとすれば、それは変態最盛期に最も効果があることになり、変態がすみやかに起こることにアルドステロンが寄与していることが伺われた。ところで、アルドステロン血液中レベルはウシガエルでも測定されており、それによれば、ウシガエルのレベルの方がヒキガエルのそれより約2倍高いことがわかる。したがって、ホルモン

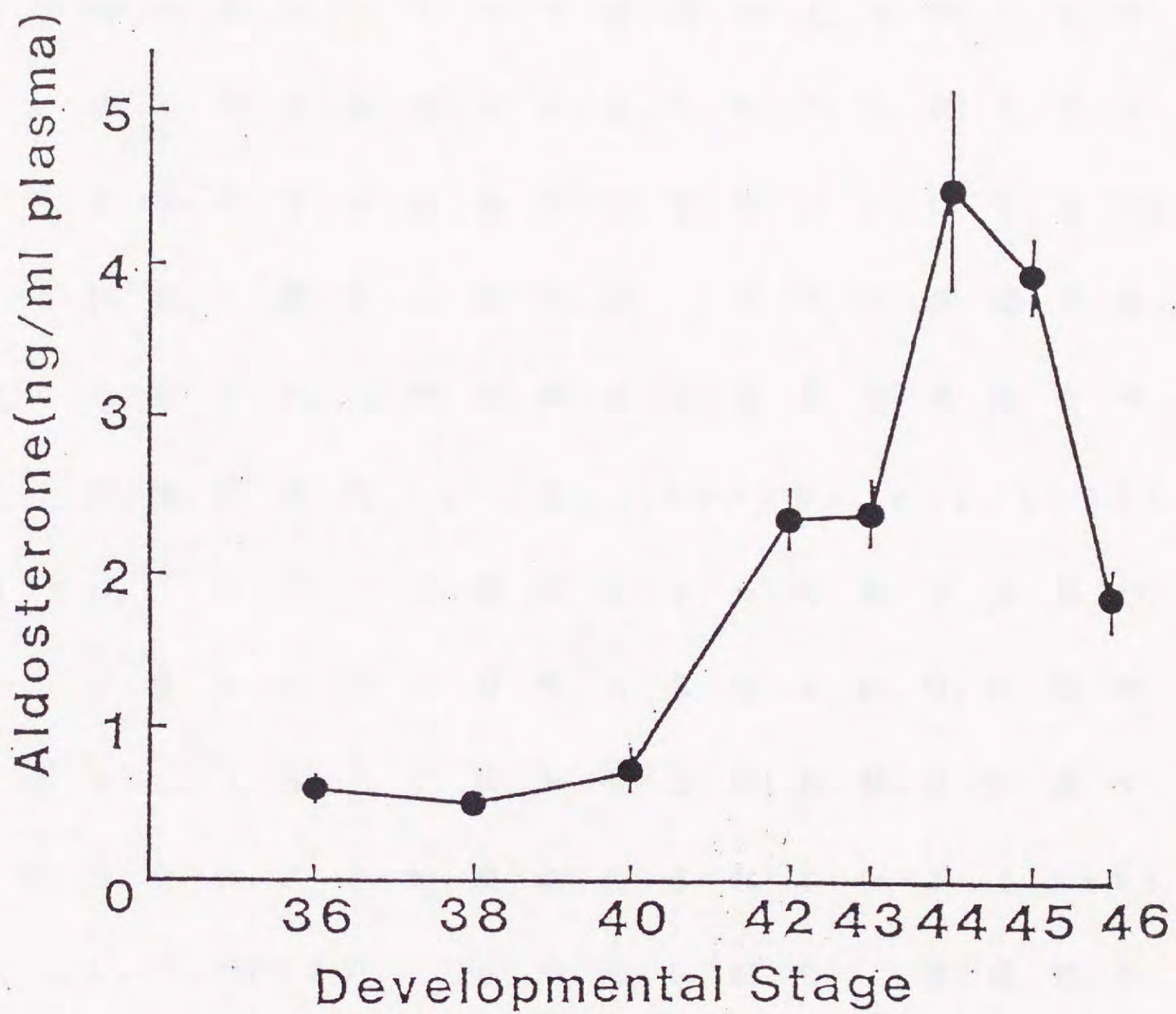


図 - 4 - 1 ヒキガエル幼生の血液中に含まれるアルドステロン量の変態に伴う変化
 各ステージの幼生から採血し、約5匹分の血液をプールし測定した。各々の値は5例の平均値とその標準誤差である。

感受性に関する点は不明であるが、ホルモンレベルの点だけから考えれば、ヒキガエル幼生で他の種にくらべて変態の変化が、より有利にはたらくようなかたちでアルドステロンが分泌されているわけではないといえよう。すでに第一章でふれたが、CRHが脳下垂体にはたらいて、甲状腺ホルモンを放出させることが報告されている (Denver and Licht (1989))。一方、CRHによって脳下垂体から放出が盛んになると考えられる副腎皮質刺激ホルモン (ACTH) には甲状腺を刺激する作用のないことが確かめられている (Sakai et al. (1990))。しかしながら、変態時に副腎皮質ホルモンの血液中レベルが上昇し、これが脳下垂体依存の、おそらくACTHによることであることが確かめられている (Kikuyama et al. (1986))。ACTHは視床下部由来のCRHに依存しているので、変態時にCRHが比較的多量に分泌されていることが予想される。したがって、CRHは間接的に

一方で甲状腺ホルモン、もう一方で副腎皮質ホルモンの放出を促進することになり、変態の促進にCRHがかなり重要な役割を果たしていることが考えられる。今後CRHのpassive immunizationなどの手法を使って、CRHがどの程度変態に関与しているかを検討すれば、より変態のホルモン調節機構が明らかになるものと思われる。

第五章 ヒキガエル幼生の変態の各発生段階
におけるプロラクチンレベルとプロ
ラクチンの合成能の変化について

すでに述べたように、プロラクチンは幼生の成長を促進し (Berman et al. (1964) Bern et al. (1967))、変態を抑制する働き (Etkin and Gona (1967) Derby and Etkin (1968)) を持つ前葉ホルモンである。ウシガエルではすでに幼生の血液中濃度が測定されている (図-5-1)。変態前期から変態最盛期まではレベルが比較的低い (Yamamoto and Kikuyama (1962 a)) ものの、内因性プロラクチンをプロラクチン抗体を投与してイムノニューートライズすると変態がはやまる (Clemons and Nicoll (1977 b) Yamamoto and Kikuyama (1982 b)) ことから、変態の抑制には、ある程度働いていることがわかる。変態の最盛期半ばよりプロラクチンレベルは急上昇し、

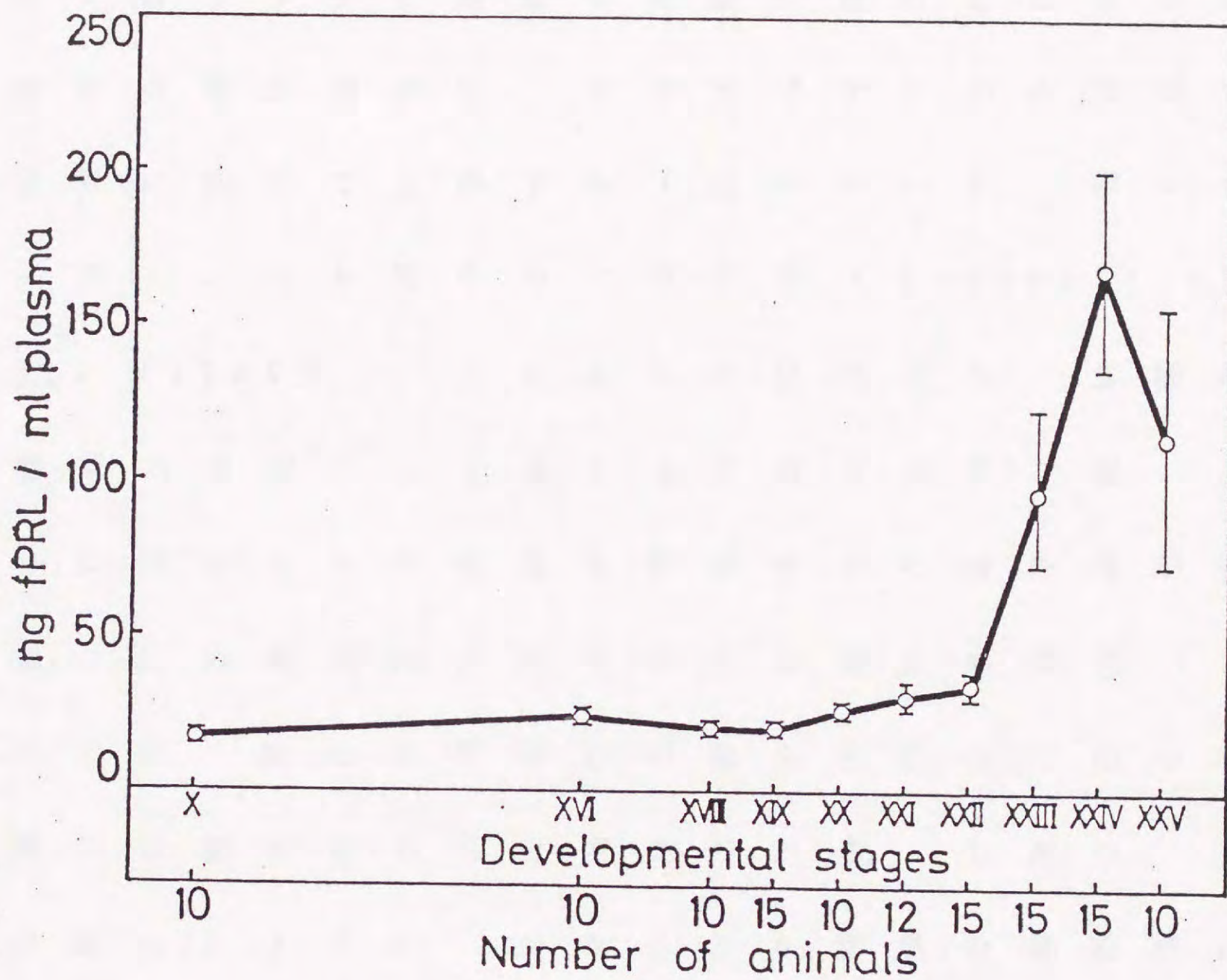


図 - 5 - 1 ウシガエル幼生の血液中に含まれるプロラクチン量の変態に伴う変化
 (Yamamoto and Kikuyama (1986) より引用)

変態終了時にやや下がる (Clemons and Nicol
1 (1977 a) Yamamoto and Kikuyama (1982 a
))。また、筆者らの研究によれば、脳下垂体
のプロラクチン含量も変態の進行とともに濃
度や含量が増加し、プロラクチンの合成能も
変態に応じて上昇する (図 - 5 - 2、 図 - 5
- 3) ことが明らかにされた (Yamamoto et
al. (1986))。これまでの研究より、変態最
盛期の半ばから上昇するプロラクチンは、す
でに開始された変態を抑制するには時期が遅
く、この時期のプロラクチンは他の役目、た
えば、肺の成熟などの陸上生活のための準
備に必要とされると考えられる。しかし、先
に述べたように、少なくとも変態の最盛期に
入る前後までは、変態の抑制に寄与している
わけで、ヒキガエル幼生の変態の過程でプロ
ラクチンがどのような濃度変化をするかは興
味深い。そこで、幼生からプールした血液と
脳下垂体を用いて、血液中および脳下垂体
中のプロラクチンを測定した。

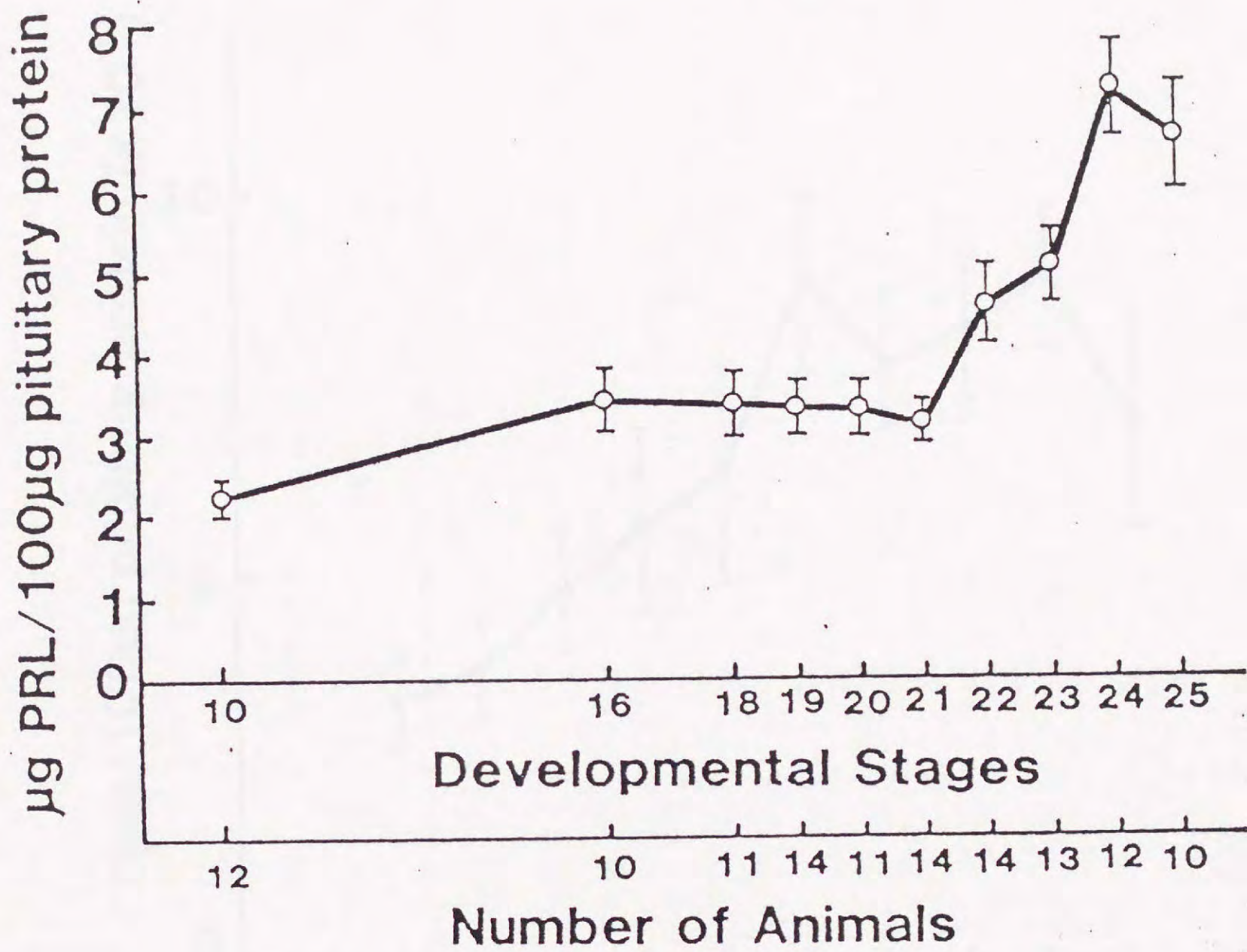


図 - 5 - 2 ウシガエル幼生の脳下垂体に含まれるプロラクチン量の変態に伴う変化

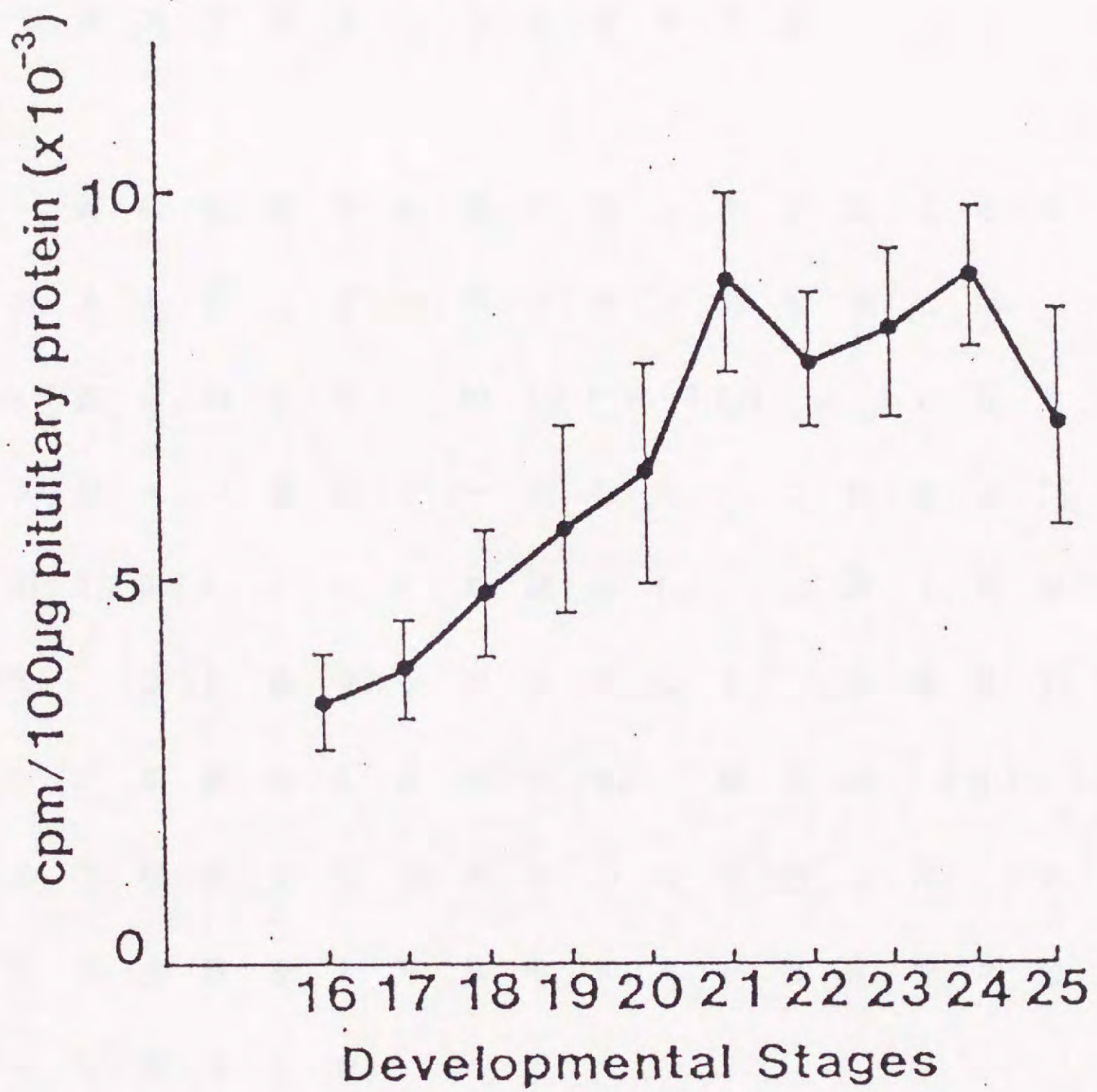


図 - 5 - 3 ウシガエル幼生脳下垂体への³H
-ロイシンの取り込み

材 料 と 方 法

ヒキガエル幼生からの採血方法

採血法は第四章に記したのとほとんど同じであるが、プロラクチン測定用には、約20—30匹分の血液（約400—800 μ l）を氷冷下のスピッツ管にプールした。これを4°C 20分間3,000 r.p.m.で遠心し、上清（血清）を得て、これをサンプルとした。各発生段階のサンプル数は5点である。採血は1983—1985年の3年間2—5月にかけて行った。RIA法には血清を1% BSA—PBSで2倍に希釈して使用した。

ヒキガエル幼生の脳下垂体の採取方法

採血した個体とは別の各発生段階のヒキガエル幼生の上顎をハサミで切り取り、口腔

内側より脳下垂体を確認し、ピンセットにより上顎の骨を割り、脳下垂体をつまみ上げ、エッペンドルフに500 μ lのD. W.を加えた中にその脳下垂体を入れる。脳下垂体10個をエッペンドルフに集め、ホモジェナイズした後、サンプルとした。各発生段階のサンプル数は5点である。血液と脳下垂体採取は1983-1985年までの3年間2-5月にかけて行った。

抗体の作製法

抗体作製に使用したヒキガエルプロラクチンはYamamoto and Kikuyama (1981)の精製方法により、ヒキガエル成体の脳下垂体前葉から単離精製したものである。免疫は成熟した雌の白ウサギに行った。1.5 mlの0.9%生理食塩水に1 mgの高純度ヒキガエルプロラクチンを溶かし、これと等量のFreund's complete adjuvant (Difco, Detroit, MI)を混ぜ

合わせ、1匹のウサギにつき10から20カ所、
背中 of いたるところに皮下注射をした。注射
は2週間おきに3回行った (Vaitukaitis et
al. (1971))。2回目の注射後に、耳周辺の
血管より採血をし、タイターチェックを行っ
た。3回目の注射から1週間後に、頸動脈よ
り全採血を行った。採血した血は遠心後、上
清 (血清) を取り、 -70°C で保存した。

ヒキガエルプロラクチンの ^{125}I での標
識はラクトペルオキシダーゼ法 (Sakai et al
. (1975)) により室温で標識を行った。標識
したヒキガエルプロラクチンの Specific Act
ivityは約 $40-50\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$ であった。ヒキガエ
ルプロラクチンに対する抗体と標識ヒキガエ
ルプロラクチンとの結合は、4,000倍に希釈
した抗体 (反応時の最終濃度は20,000倍) で
30%であった。よって以後のヒキガエルプロ
ラクチンの濃度測定にはこの濃度の抗体を用
いた。また、このラジオイムノアッセイの特
異性を調べるために、下垂体除去をして7日

経った成体ヒキガエルの血液中プロラクチン量を測定した。この他に、ヒツジプロラクチン (N I A M D D o P R L - 18)、ウシプロラクチン (N I A M D D b P R L - 6)、ヒツジ成長ホルモン (N I A M D D o G H - 14)、ヒキガエル下垂体中後葉のホモジエネート、ウシガエル下垂体前葉のホモジエネートについても測定を行った。その結果は図 5-4 および 5 のようになっており、特異性が示された (Y a m a m o t o e t a l. (1989))。

プロラクチン R I A 法

まず、1% B S A - P B S (p H 7.5) で希釈した (もしくはそのままのサンプル) 検体 (もしくはスタンダード) を加え、次に、1% N R S - 0.05 M E D T A - P B S で 4,000 倍に希釈したヒキガエルプロラクチンに対する抗体 (Antiserum: Vaitukaitis et al. (1971) の方法によって作製された) を 100 μ

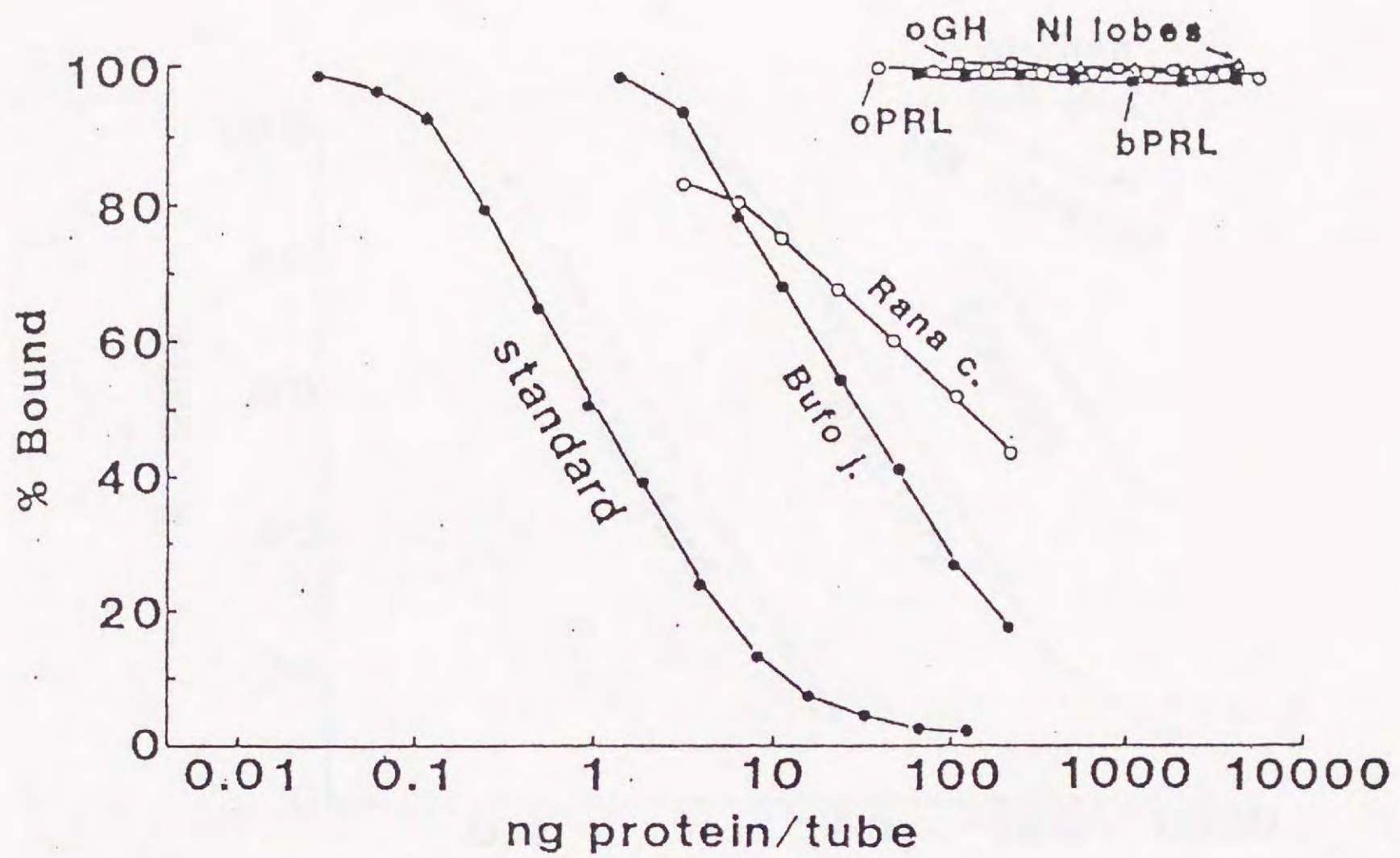


図 - 5 - 4 ヒキガエルプロラクチンRIA
 系の標準曲線とヒキガエル前葉と中
 後葉、ウシガエル前葉のホモジェネ
 ート、ヒツジプロラクチンと成長ホ
 ルモン、ウシプロラクチンとの競合
 阻害反応
 ヒキガエル前葉のホモジェネートは
 標準曲線に平行に反応している。
 (Yamamoto et al. (1989))より引用

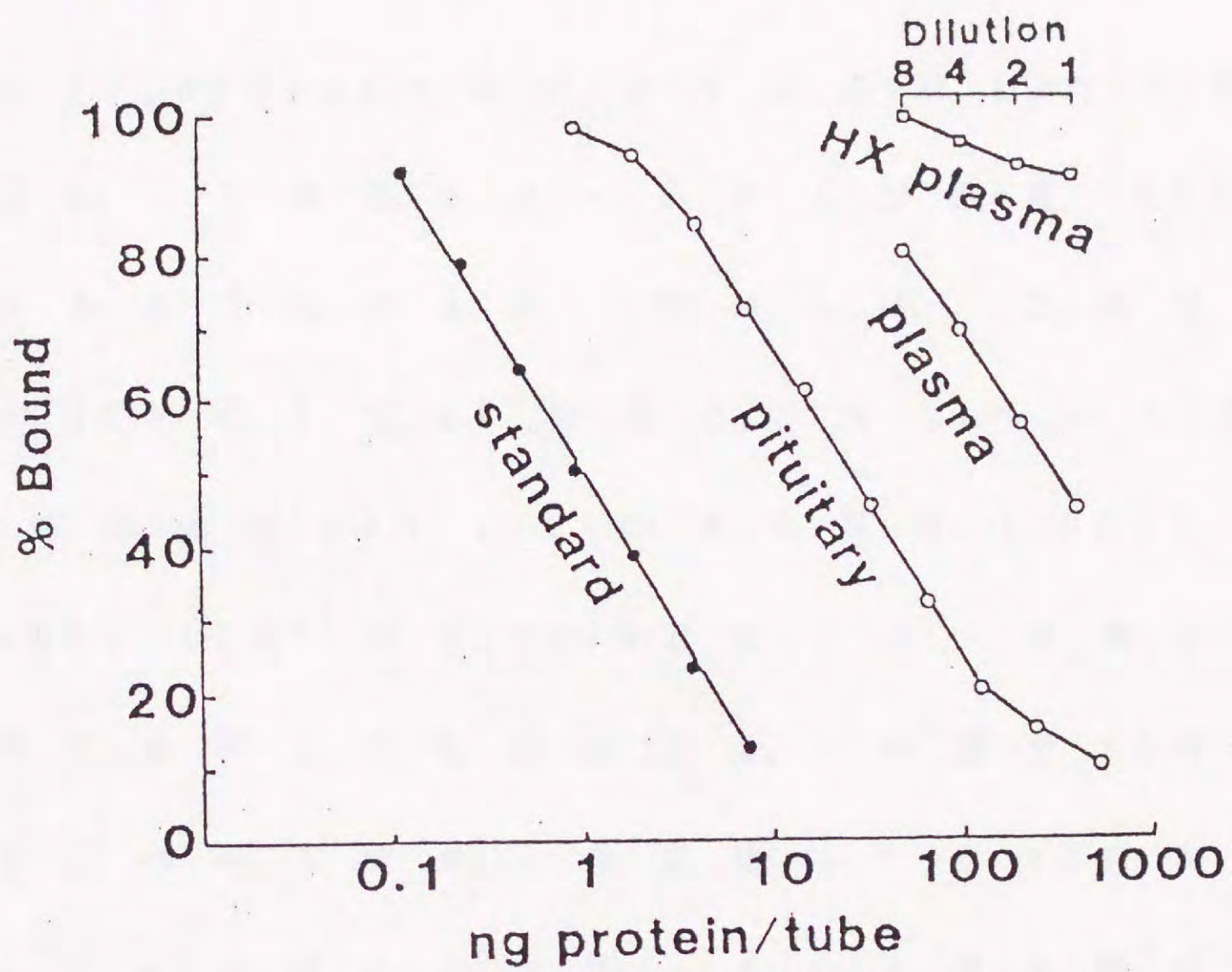


図 - 5 - 5 ヒキガエルプロラクチンRIA系の標準曲線とヒキガエル脳下垂体ホモジェネートと血清、下垂体除去動物の血清との競合阻害反応ヒキガエル脳下垂体ホモジェネートと血清は標準曲線に平行に反応している。

(Yamamoto et al. (1989))より引用

1 加 え、 ラ ク ト ペ ル オ キ シ ダ ー ゼ 法 (S a k a i e t
a l . (1 9 7 5)) で 標 識 し た 標 識 プ ロ ラ ク チ ン (
1 2 5 I - t P R L) を 1 0 0 μ l 加 え (各 チ ュ ー
ブ 約 2 0 , 0 0 0 c p m に な る よ う に 希 釈 し た も の)、
最 後 に、 1 % B S A - P B S で 液 量 5 0 0 μ l
と な る よ う に 加 え る。 攪 は ん 後、 こ れ を 室 温
(約 2 5 ° C) で 2 4 時 間 イ ン キ ュ ベ ー ト す る。
2 4 時 間 後 に 2 0 0 μ l の 第 2 抗 体 (G o a t a n t i
R a b b i t I g G) を 0 . 0 5 M E D T A - P B S で 1 0
0 倍 に 希 釈 し た も の を 加 え、 室 温 で 2 4 時 間 イ
ン キ ュ ベ ー ト す る。 反 応 後 4 ° C 3 0 分 間 3 , 0 0
0 r . p . m . で 遠 心 し た 後、 そ の 上 清 を 吸 引 除 去
し て、 沈 澱 物 を ガ ン マ ー カ ウ ン タ ー (A l o k a
a u t o w e l l g a m m a s y s t e m) で カ ウ ン ト し、 ス
タ ン ダ ー ド ホ ル モ ン よ り 作 製 さ れ た 標 準 曲 線
よ り 各 発 生 段 階 の ホ ル モ ン 量 を 測 定 し た。 な
お、 こ の ア ッ セ イ の 最 小 測 定 可 能 値 は 0 . 1 2 n g
/ 1 0 0 μ l a s s a y b u f f e r で、 測 定 間 変 動 は 8 .
0 %、 測 定 内 変 動 は 9 . 2 % で あ る。

プロラクチン合成能の測定

ヒキガエル幼生の種々の発生段階の脳下垂体を用い、試験管内でプロラクチンの合成能を調べた (Yamamoto et al. (1986 b))。培養液は 67% Eagle MEM (Gibco社アミノ酸キット) で 5 mM HEPES を含むものを用いた。なお、アミノ酸のうちロイシンは通常の濃度の 100 分の 1 に減らしてある。これは培養中に加えた ^3H -ロイシンを効率よく取り込ませるためである。培養液 150 μl に 1 μCi L-[4,5- ^3H]-ロイシン (Specific Activity 145 $\mu\text{Ci}/\text{mmol}$ NEEN) を加え、その中で 50 個の下垂体を 25°C 下で Dabnoff-Shaker を用いてインキュベートした。気換は 95% 酸素 - 5% 二酸化炭素で、培養液の pH は 7.4 であった。培養後、ホモジナイズし、一部をタンパク定量に使用した (Lowry et al. (1951))。その残りを凍結保存してプロラクチン分離用のサンプルとした。

電気泳動によるプロラクチンの分離とその画 分の放射活性の測定

電気泳動は Davis (1964) によるポリアクリルアミドゲル電気泳動法を用いた。泳動用のゲルガラスカラムは内径 5 mm で、長さ約 7 cm であり、分離ゲル (5 cm)、濃縮ゲル (1 cm)、試料ゲル (1 cm) の三層からなる。分離ゲルは 7% アクリルアミドで、泳動用緩衝液は Tris-Glycine (pH 8.3) を用いた。前述のサンプルを 100 μ l、試料用ゲル濃度より 2 倍濃いものを 100 μ l 混合させ、試料ゲルとした (Zanini and Giannattasio (1972))。電気泳動用のフロントマーカーは 0.01% Bromo-Phenol-Blue (BPB) を使用した。フロントマーカーがすべてのカラムにおいて濃縮ゲルに達するまでは 1 本のカラム当り 2 mA の電流、その後は 5 mA で電気泳動を流した。電気泳動終了後、分離ゲルを 1% アミドブラッ

ク 10 B / 7 % 酢酸で染色した。その後、メタノール酢酸溶液（酢酸：メタノール：水 = 1 : 5 : 5）で脱色を約 24 時間行った。すでに Kikuyama et al. (1980) によって同定されているプロラクチンのバンドを切り出し、各分離ゲルごとにバイアル中で乾燥させ、これを 30 % 過酸化水素水 200 μ l 中で 80 ° C 2 時間、ゲルを溶解させる。常温に戻した後、3 ml の液体シンチレーター（Aquasol 2 : N E N）を加え、液体シンチレーションカウンター（Aloka, Liquid scintillation system）により取り込まれた ^3H -ロイシンの放射活性を測定した。なお、インキュベーションタイムは 24 時間まで取り込みが上昇したので、20 時間とした（図 - 5 - 6）。

結果と論議

図 - 5 - 7 に示すように、血液中プロラクチン濃度は変態の進行とともに緩やかに上

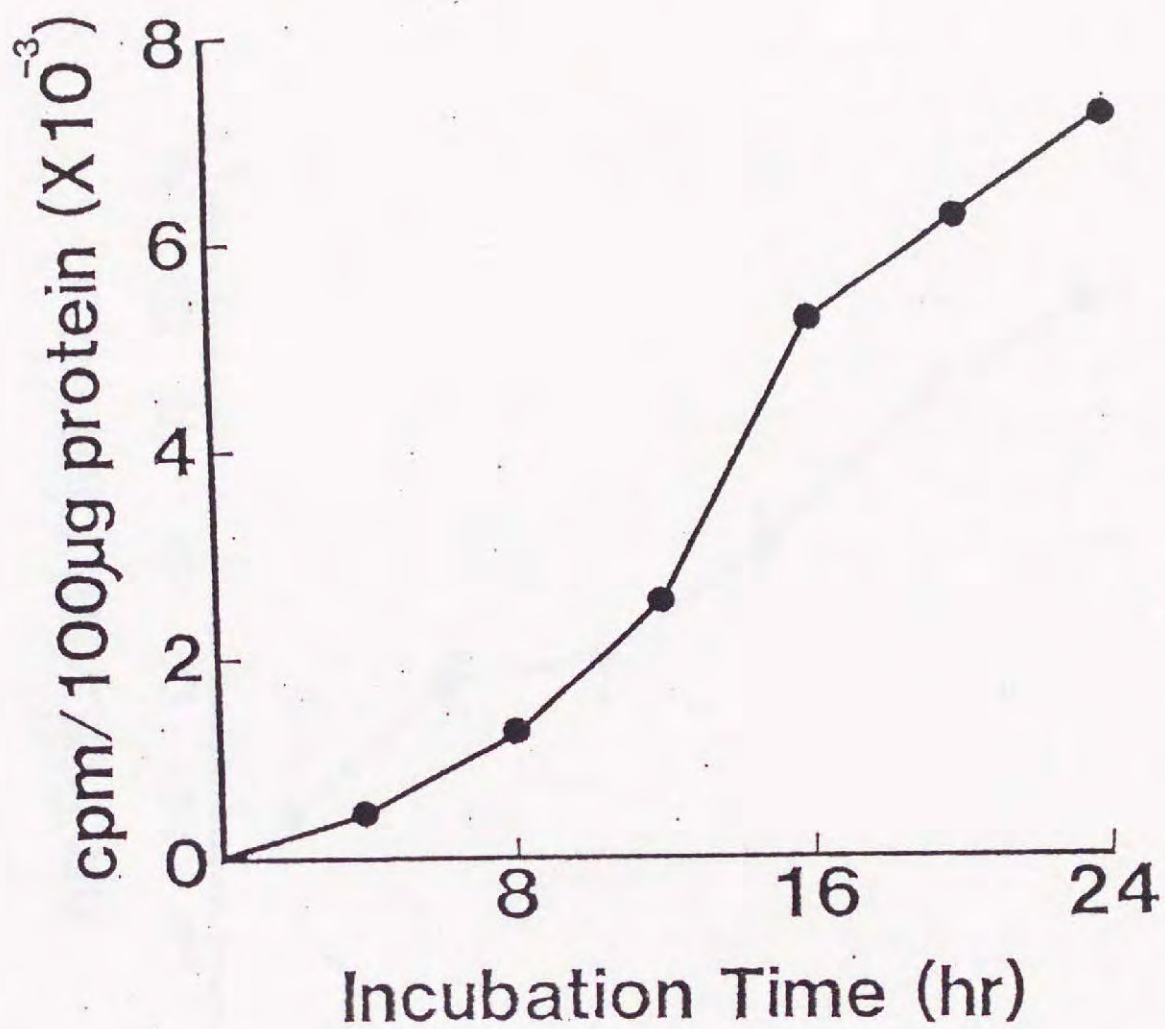


図 - 5 - 6 ヒキガエル幼生脳下垂体への
 ^3H -ロイシンの取り込みの時間による変化
 脳下垂体全体を ^3H -ロイシンを含む培養液中で 25°C で24時間までインキュベートし、培養液と脳下垂体中のプロラクチンを電気泳動で分離し、その放射活性を測定したものである。各々の値は2例の平均値である。

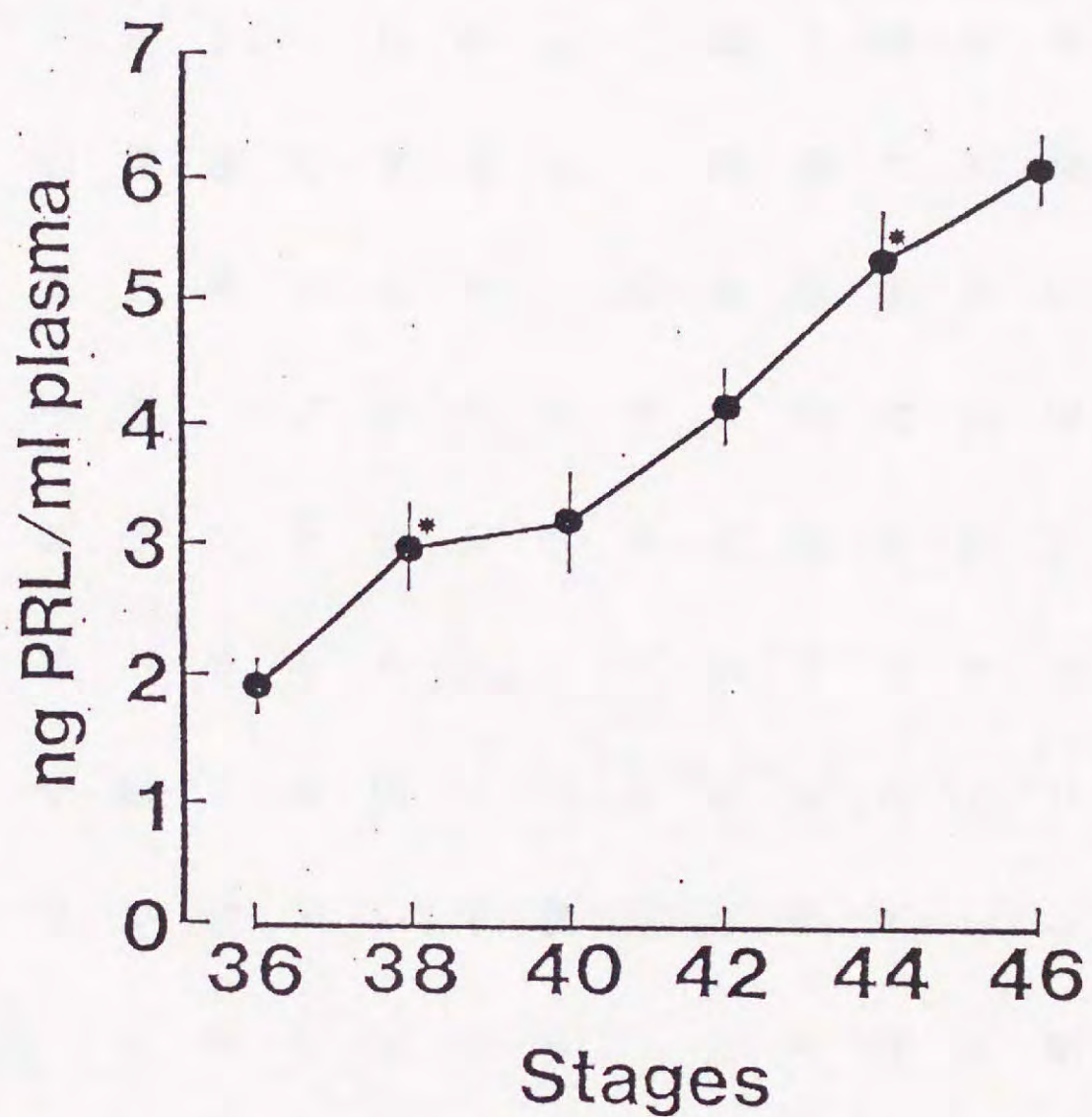


図 - 5 - 7 ヒキガエル幼生の血液中に含まれるプロラクチン量の変態に伴う変化
 各ステージの幼生より採血し、約20~30匹分をプールし測定した。各々の値は15例の平均値とその標準誤差である。* 直前の値にくらべて有意 $P < 0.05$ (Student's t-test)

昇した。一方、含量の方は変態最盛期のはじめまでは急激に上昇した後、含量はプラトーに達して変態終了まで変化を示さなかった（図一五—八）。しかし、脳下垂体のタンパク量当りの濃度にすると、同様に変態最盛期半ばまでは上昇するが、最盛期の末にはやや下がる。一方、プロラクチンの合成能は脳下垂体のプロラクチンレベルとほぼ同じ変化を示した（図一五—九）。プロラクチンの血液中レベルや脳下垂体レベルの変化のパターンはすでにウシガエルで測定されているものと似ている。しかしながら、ヒキガエルの濃度はウシガエルの濃度にくらべてかなり低いことがわかった。このように、プロラクチンレベルが相対的に低いことが変態をはやめている要因の一つと考えられる。ただし、このようにプロラクチンレベルが低くてもわずかながら変態を抑制していることは、変態始動期の幼生に、プロラクチンの放出を抑制する働きのあるドーパミンアゴニスト（エルゴコーニ

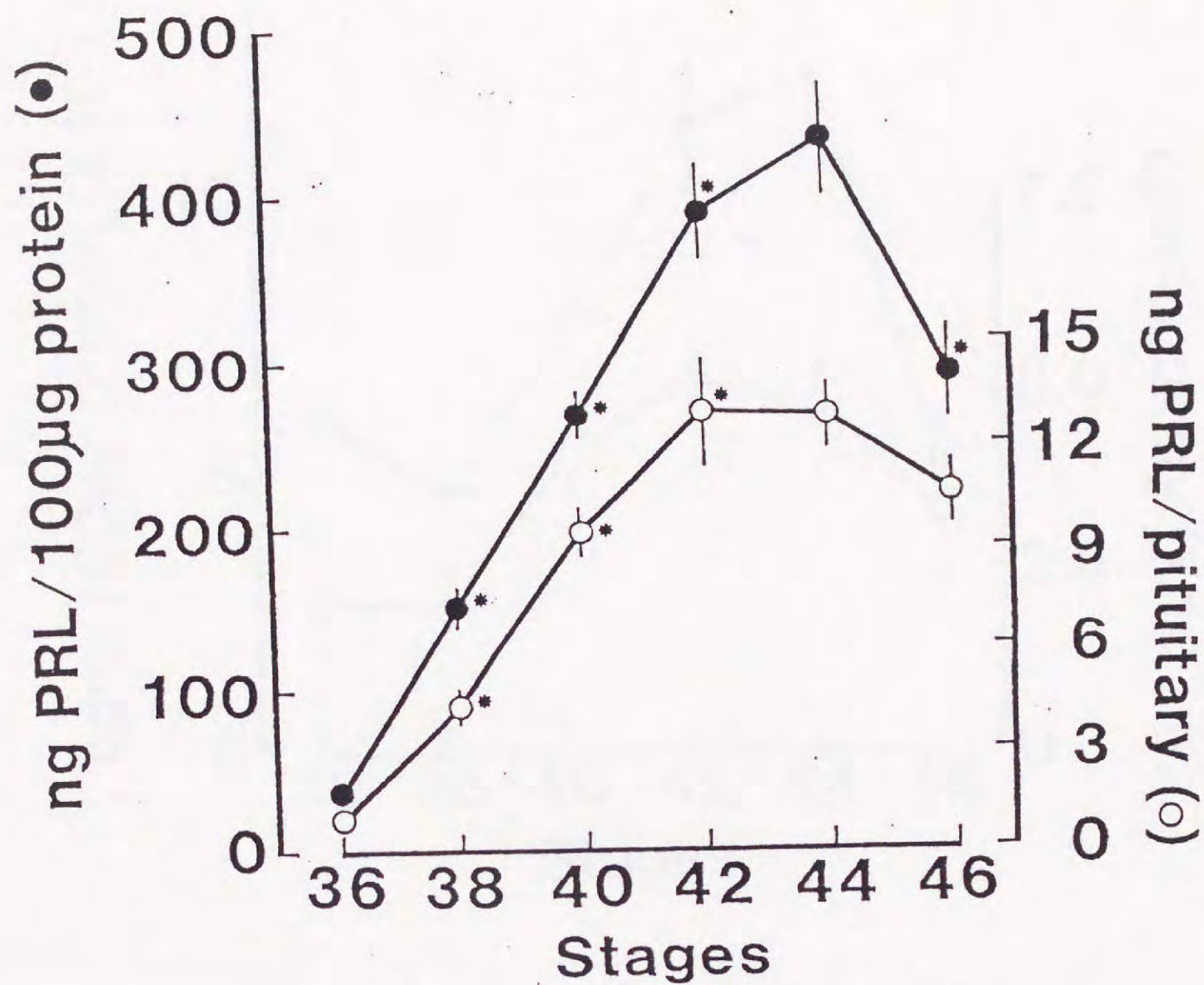


図 - 5 - 8 ヒキガエル幼生の脳下垂体に含まれるプロラクチン量の変態に伴う変化
 各ステージの幼生より脳下垂体を採取し、10個を1点とし測定した。各々の値は13例の平均値とその標準誤差である。●：脳下垂体タンパク量100µg当りのプロラクチン量、○：脳下垂体1個当りのプロラクチン量、* 直前の値にくらべて有意 P < 0.05 (Student's t-test)

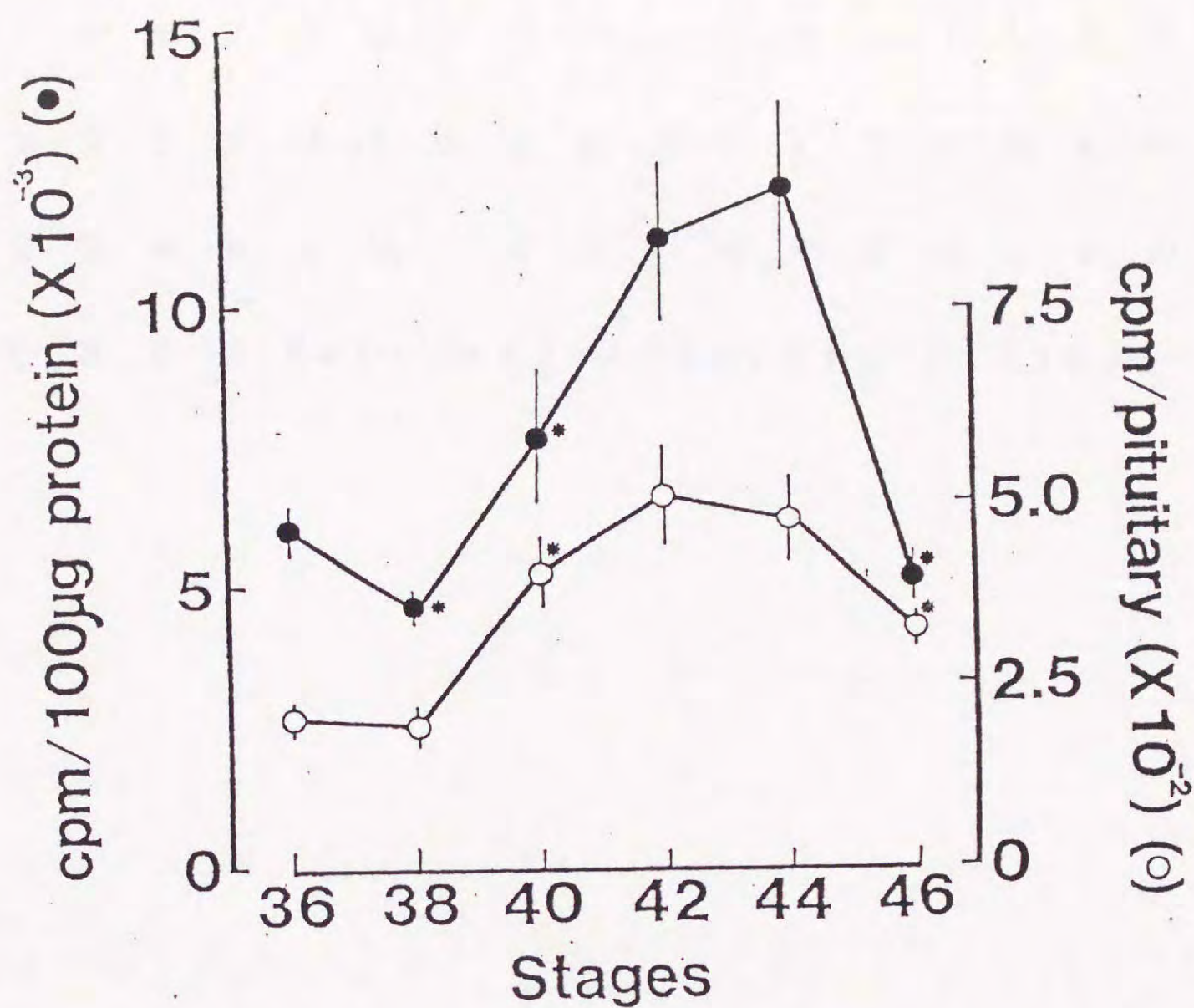


図 - 5 - 9 ヒキガエル幼生脳下垂体への

³H-ロイシンの取り込み

各ステージの幼生より脳下垂体を取り出し、20時間25°Cで培養液中でインキュベートし、プロラクチンを電気泳動で分離し、その放射活性を測定したものである。各々の値は6例の平均値とその標準誤差である。

●: 脳下垂体タンパク量100µg当りの取り込み量、○: 脳下垂体1個当りの取り込み量、* 直前の値にくらべて有意 P < 0.05 (Student's t-test)

ン) やモノアミンデフレッサー (したがって、
プロラクチンの放出を促す) であるレセルピ
ンを投与すると、変態がはやまることから明
かである (Seki and Kikuyama (1979))。

第六章　プロラクチン細胞と甲状腺刺激ホルモン
（TSH）細胞の各発生段階に
おける免疫組織学的研究

ヒキガエル幼生の脳下垂体を筆者の属する研究室で作製されたヒキガエルプロラクチンに対する抗体（Yamamoto et al. (1986 a)）とヒトTSHβ鎖に対する抗体（NIH）を用いて染色し、第五章で明らかにした脳下垂体プロラクチンの含量、および血液中レベルの変化と第二章で述べた甲状腺ホルモンの組織レベルにおける変化とあわせて、プロラクチン細胞とTSH細胞の変態時における変化を論じることとした。なお、予備実験として、これらプロラクチンおよびTSHβ鎖の抗体は各々の抗原を十分量、抗体に作用させて吸着すると、染色性がなくなることを確かめ、抗体の特異性をチェックしたうえで使用した。

材 料 と 方 法

組 織 切 片 の 作 製 と 酵 素 抗 体 法 に よ る 染 色

ヒキガエル幼生の上顎を切り離し、ブアン (Bouin) 固定液 (ピクリン酸: ホルマリン: 氷酢酸 = 75: 25: 5) 中に20時間浸して固定する。これを脱水系 (70% エタノール 1 時間、90% エタノール 30分、100% エタノール 30分 3 回、キシロール 15分) を通して、パラプラストに包埋し、6 μ m の切片を作製した。プロラクチン細胞および T S H 細胞の染色には Sternberger et al. (1970) の方法を改良した Peroxidase - Antiperoxidase (P A P) 法により行った。抗血清は 1% B S A - P B S により希釈、過酸化水素水と卵白アルブミンは P B S (0.14 M 塩化ナトリウム, 0.01 M リン酸緩衝液、pH 7.2) により希釈した。染色を行う前にヒキガエルプロラクチンに対

する抗体の場合、ウシガエル肝臓アセトンパウダーを加え、4°C 6時間インキュベートした後、4°C 30分間3,000 r.p.m.で遠心し、上清を第一抗体として使った。また、ヒトTSH β に対する抗体は前処理をせずに使った。

酵素抗体法による染色の手順は以下の通りである。

- 1 組織切片を脱パラプラスチック（キシロール2回）、吸水系（100%エタノール2回、90%エタノール、70%エタノールの順）を通し、3%過酸化水素水溶液で5分、10%卵白アルブミン溶液で30分間浸した後、PBSで3回洗う。
- 2 前述の第一抗体を希釈したもの（ヒキガエルプロラクチンに対する抗体：4000倍希釈、ヒトTSH β に対する抗体：1600倍希釈）を4°C 24時間反応させ、PB

S で 3 回 洗 う。

3 100 倍 に 希 釈 し た ウ サ ギ I g G に 対 す る ヤ
ギ の 抗 体 (第 二 抗 体) を 室 温 で 1 時 間 反
応 さ せ、 P B S で 3 回 洗 う。

4 100 倍 に 希 釈 し た P A P C o m p l e x (C a p p e l
L a b o r a t o r i e s) と 室 温 で 1 時 間 反 応 さ せ
て P B S で 3 回 洗 う。

5 ジ ア ミ ノ ベ ン チ ジ ン (D A B) 溶 液 (0 .
0 2 % ジ ア ミ ノ ベ ン チ ジ ン 四 塩 酸 塩、 0 . 0
0 5 % 過 酸 化 水 素 水、 0 . 0 5 M T r i s 緩 衝 液、
p H 7 . 6) と 室 温 で 5 - 1 0 分 間 反 応 さ せ
る。 そ の 後 D. W. で 洗 う。

6 M e y e r の ヘ マ ト キ シ リ ン で 1 分 間 核 染 色
を 行 い、 そ の 後、 水 洗 を 3 分 以 上 す る。

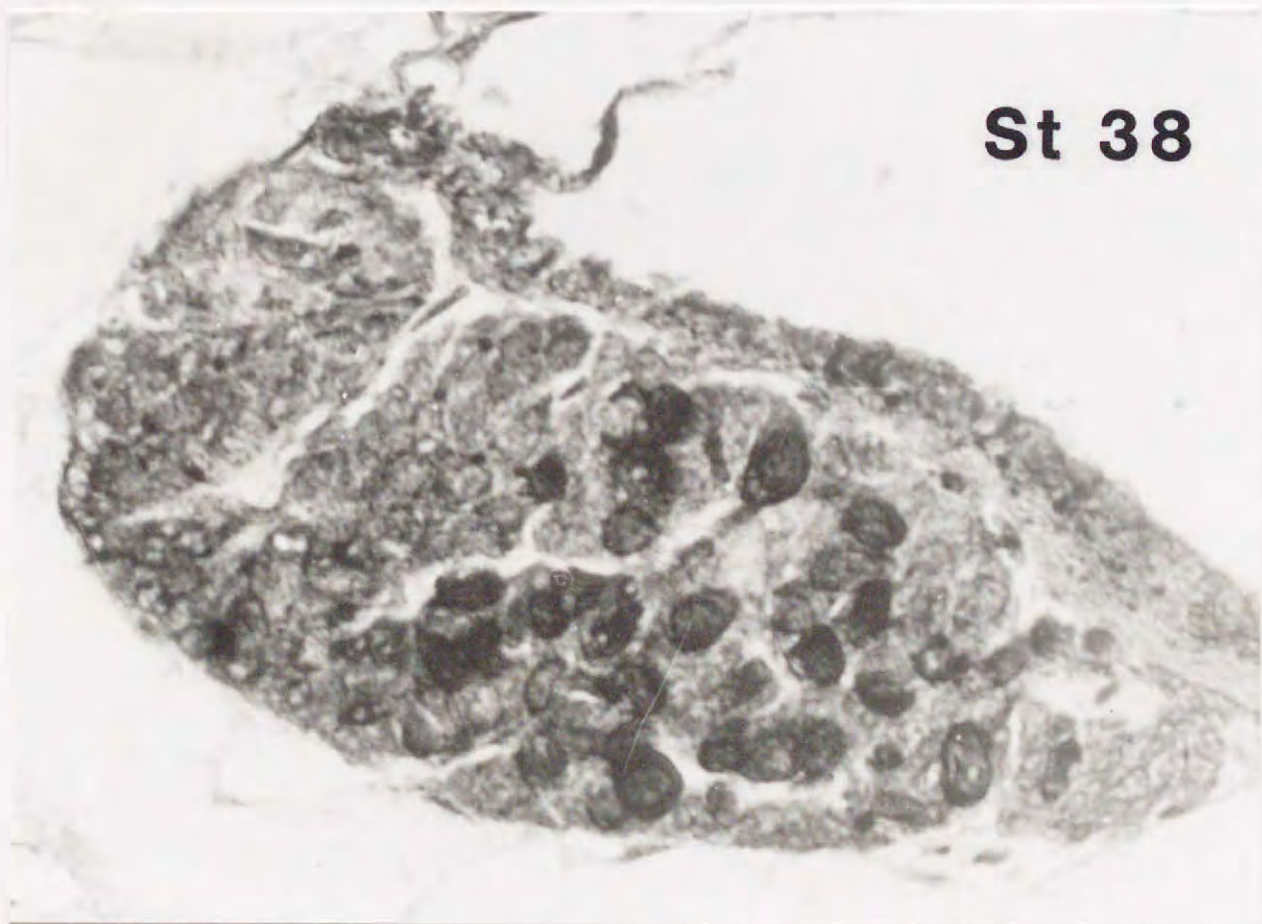
7 脱 水 系 (7 0 % エ タ ノ ー ル、 9 0 % エ タ ノ

ール、100%エタノール2回の順)を通し、キシレンで透徹後、封入する。

結果と論議

図一六—1は、ヒキガエルプロラクチン抗体により染色された脳下垂体の矢状断の写真である。変態の進行とともに陽性細胞が増加しており、これはRIAの結果と一致する。また、TSH細胞も変態の進行とともに増加の傾向がみられ、TSH細胞の発達がおそらく変態に伴う甲状腺ホルモンレベルの組織中の濃度の上昇に関連しているものと考えられる(図一六—2)。

すでに第二章で述べたように、甲状腺ホルモンの放出を促す脳下垂体ホルモンとしてTSHの他にLHがあげられている(Sakai *et al.*, (1990))。ウシガエルを用いた最近の研究によれば、LH細胞は幼生期には非常に数が少ないことが知られている(Tanaka *et*



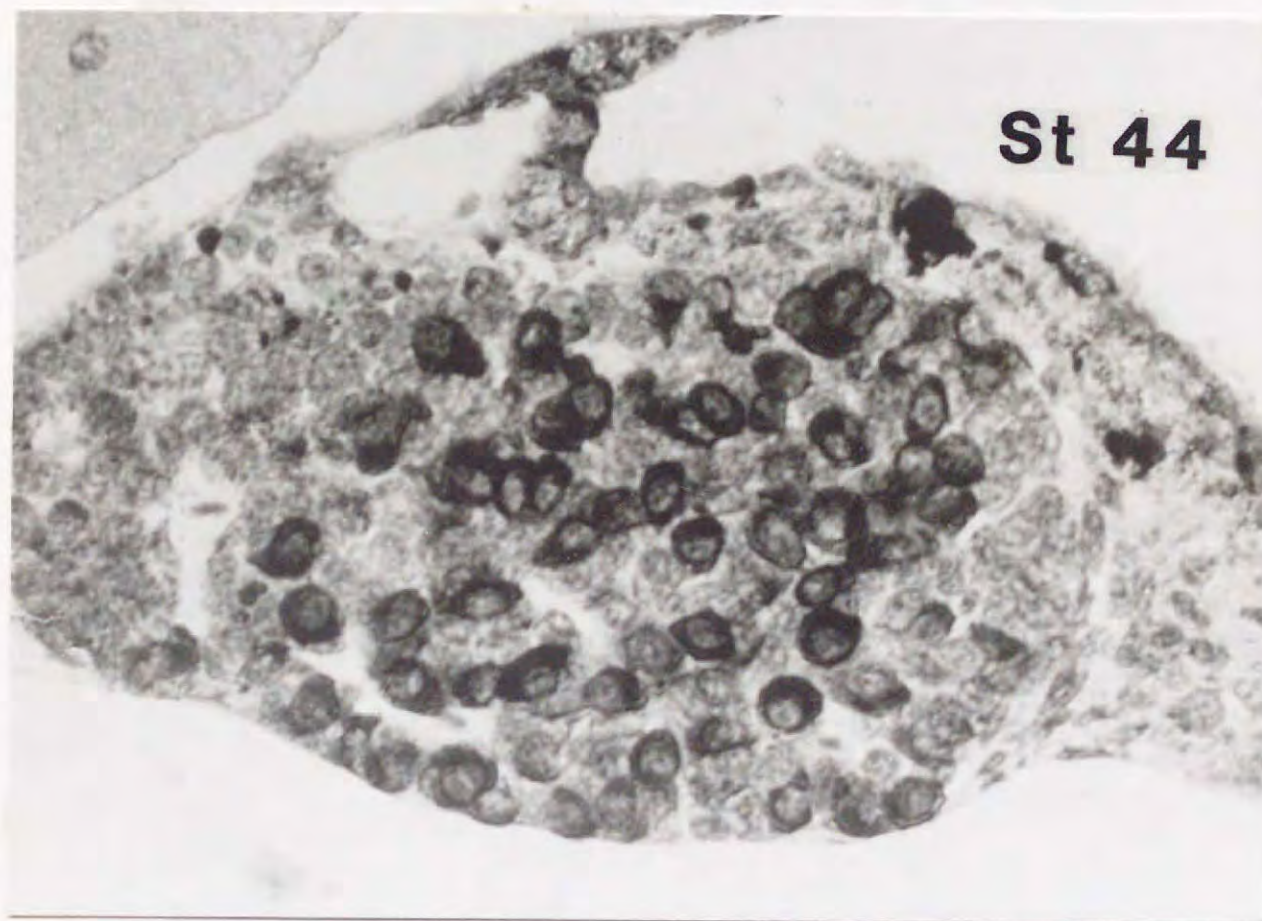
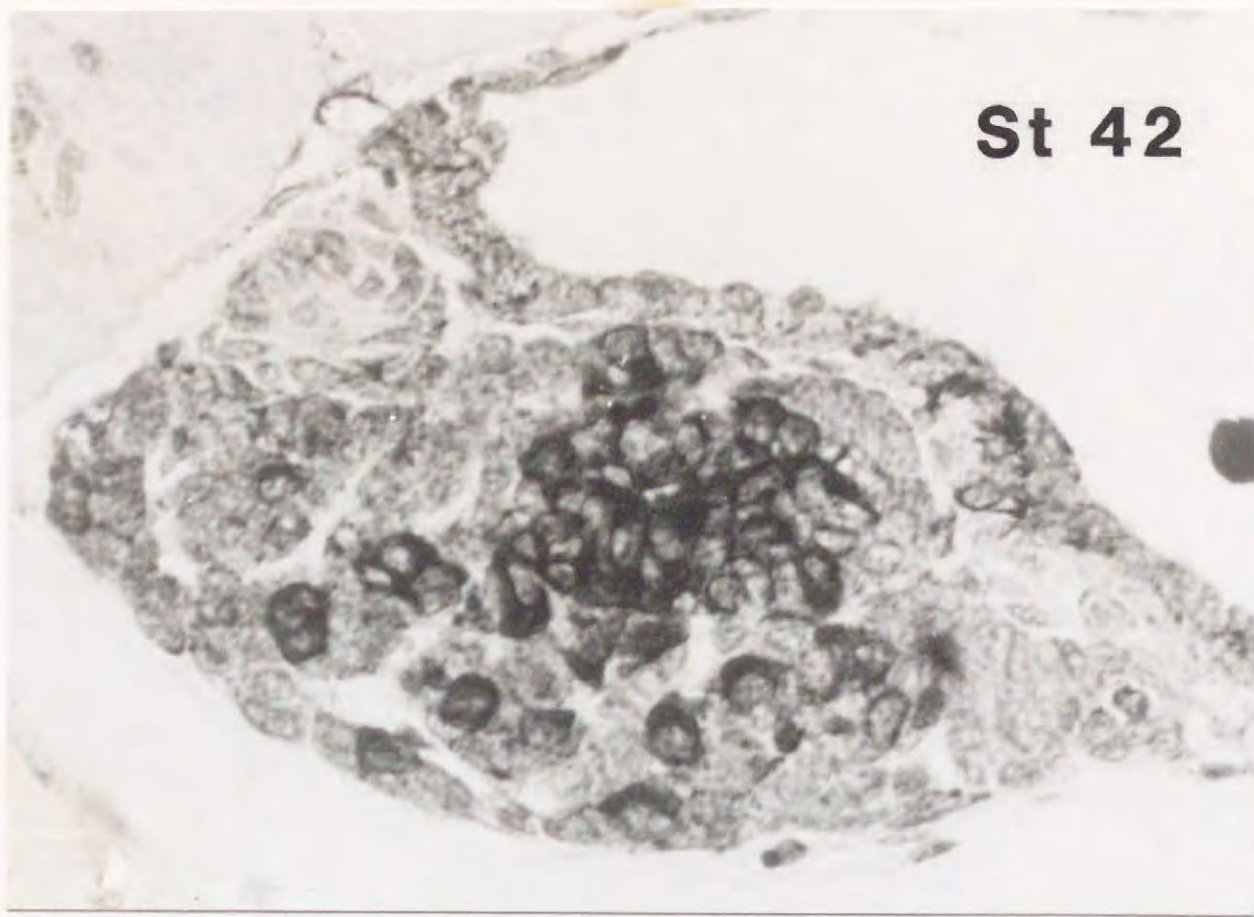
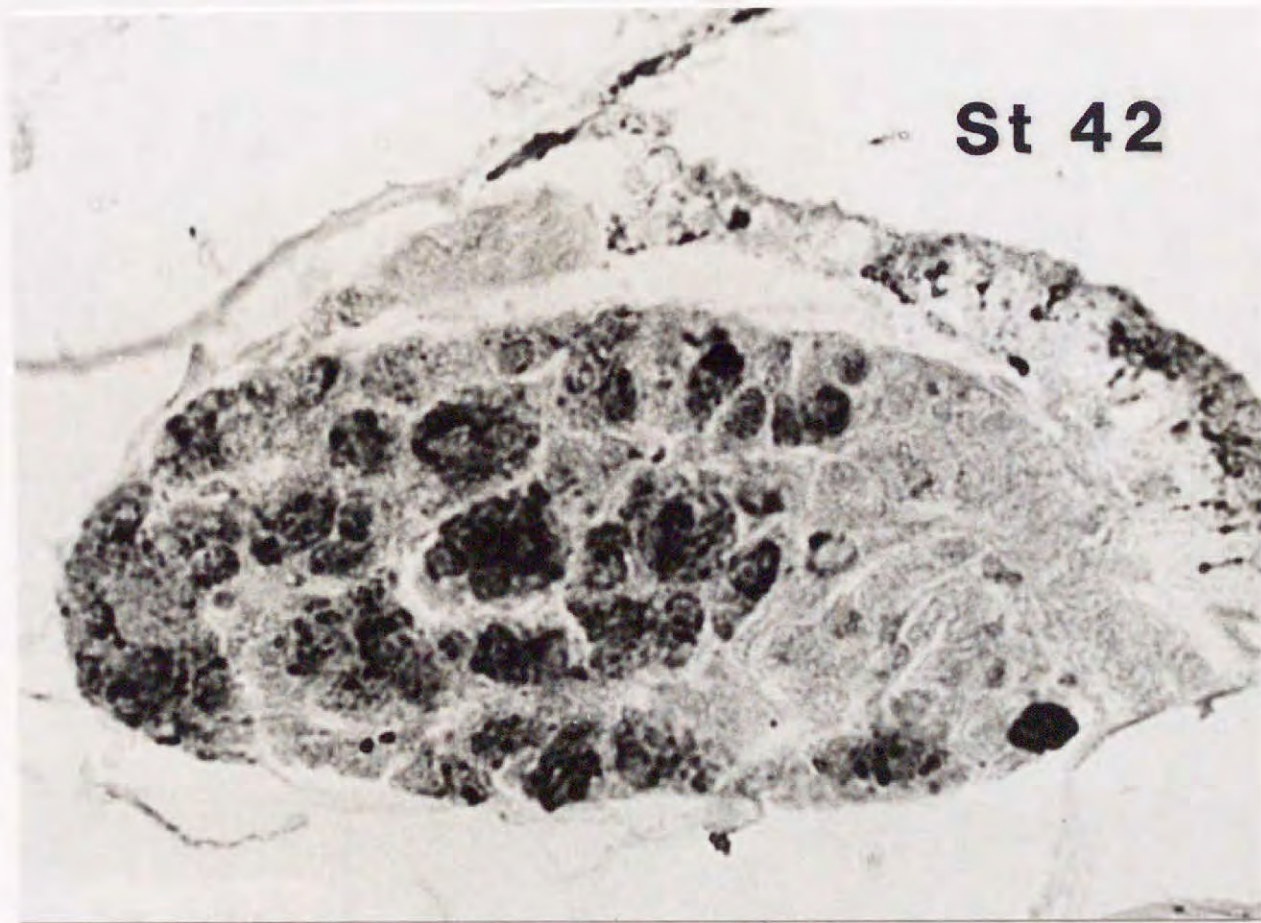


図 - 6 - 1 ヒキガエル幼生の脳下垂体のプロラクチン細胞
 黒く見えるのがウシガエルプロラクチンに対する抗体を用いてPAP法により染色されたプロラクチン細胞。変態のステージに伴いプロラクチン細胞の数が増加する。



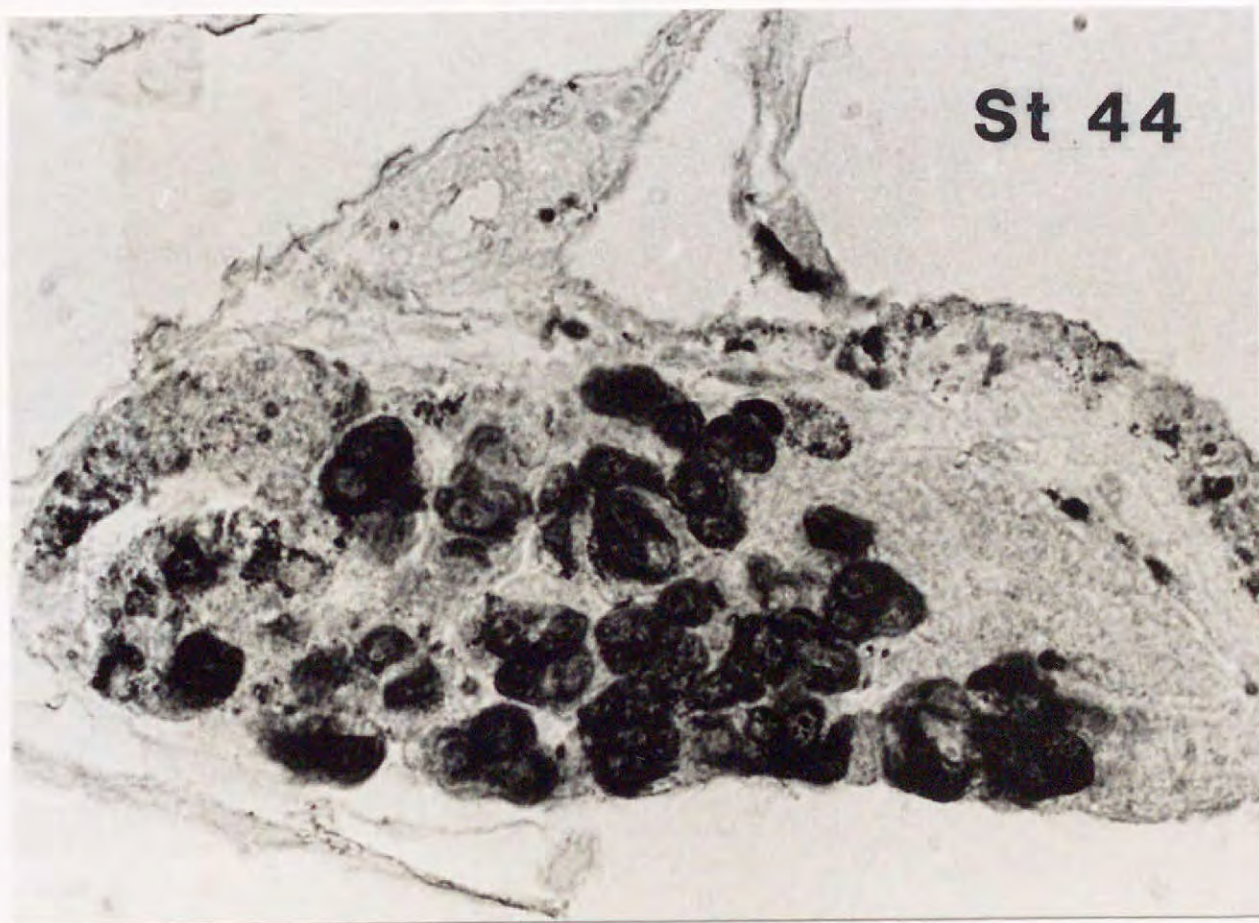


図 - 6 - 2 ヒキガエル幼生の脳下垂体の T
S H 細胞
黒く見えるのがヒト T S H β に対す
る抗体を用いて P A P 法により染色
された T S H 細胞。変態のステージ
に伴い T S H 細胞の数が増加する。

a l . i n p r e s s .) 。 し た が っ て 、 変 態 時 に L H
が 甲 状 腺 ホ ル モ ン 放 出 に 関 与 し て い る と し て
も 、 主 た る ホ ル モ ン と は 考 え ら れ な い が 、 ヒ
キ ガ エ ル 幼 生 に お い て も 、 L H 細 胞 の 発 生 を
調 べ て み る 必 要 が あ る と 思 わ れ る 。

第七章 結論と今後の展望

以上の結果から、ヒキガエル幼生の変態時における甲状腺ホルモン (T_4 、 T_3)、副腎皮質ホルモン (アルドステロン)、プロラクチンの変化、およびそれとヒキガエル特有の変態様式の発現との関連について次のような結論が得られた。

1. T_4 、 T_3 、アルドステロン、プロラクチンは変態の進行とともに、組織中もしくは血液中のレベルが上昇する。
2. プロラクチンの合成能も変態の進行とともに上昇する。
3. 甲状腺ホルモンの合成は変態最盛期のはじめに、プロラクチンの合成は変態最盛期の後半に最大となる。

4. 上記ホルモンの変動はウシガエル幼生の変態期におけるものと類似している。

5. しかしながら、ヒキガエル幼生では、プロラクチンの血液中の濃度はウシガエル幼生の変態期よりはかなり低く、変態により重要である組織中の T_3 濃度が比較的高い。このことは変態に要する時間、幼生期の体のサイズが非常に小さいこと、変態期後半における幼生の陸上生活の選択などに差を生じさせる要因の1つと考えられる。

今後の課題としては、変態後も水中にとどまり生活をする水生種のアフリカツメガエルの幼生で甲状腺ホルモン、副腎皮質ホルモン、プロラクチンなどについての変態時の組織中および血液中の濃度や各々のホルモンの合成能を測定し、成体の生活様式が陸生、半

水生、水生である無尾目両生類の変態時におけるホルモンの分泌様式に違いがあるか否かを比較検討すること、上記ホルモンのレセプターレベルでの解析を行い、本研究の結論の裏付けをすることなどが考えられる。

謝 辞

本研究を進めるにあたり御指導、御鞭撻を賜った菊山 栄教授に深く感謝を致します。

さらに、御協力くださった山本和俊博士、をはじめ、研究室のメンバーおよび東京大学海洋研究所の平野哲也教授、田川正朋博士に御礼申し上げます。

また、数々の御助言を賜った石居 進教授、並木秀男助教授、山内兄人助教授に対して深く御礼申し上げます。

参考文献

- Berman, R., Bern, H.A., Nicoll, C.S. and Strohman, R.C. (1964) Growth-promoting effects of mammalian prolactin and growth hormone in tadpoles of Rana catesbeiana. J. Exp. Zool., 156: 353-360.
- Bern, H.A., Nicoll, C.S. and Strohman, R.C. (1967) Prolactin and tadpole growth. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 126: 518-520.
- Brown, P.S. and Brown, S.C. (1987) Osmoregulatory action of prolactin and other adeno-hypophysial hormones. In "Vertebrate Endocrinology: Fundamentals and Biomedical Implications Vol. 2". Ed. by P.K.T. Pang and M.P. Schreibman, Academic Press, New York, pp. 45-84.
- Buscaglia, M., Leloup, J. and De Luze, A. (1985) The role and regulation of mono-deiodination of thyroxine to 3, 5, 3'-triiodothyronine during amphibian metamorphosis. In "Metamorphosis". Ed. by M. Balls and M. Bownes, Clarendon Press, Oxford, pp. 273-293.
- Carstensen, H., Burgers, A.C.J. and Li, C.H. (1961) Demonstration of aldosterone and corticosterone as the principal steroids formed in incubates of adrenals of American bullfrog Rana catesbeiana and stimulation of their production by mammalian adrenocorticotropin. Gen. Comp. Endocrinol., 1: 37-50.
- Clemons, G.K. and Nicoll, C.S. (1977 a) Development and preliminary application of a homologous radioimmunoassay for bullfrog prolactin. Gen. Comp. Endocrinol., 32: 531-535.
- Clemons, G.K. and Nicoll, C.S. (1977 b) Effects of antisera to bullfrog prolactin and growth hormone on metamorphosis of Rana catesbeiana tadpoles. Gen. Comp. Endocrinol., 31: 495-497.
- Davis, B.J. (1964) Disc electrophoresis 2. Method and application to serum proteins. Ann. N.Y. Acad. Sci., 121: 404-427.
- Denver, R.J. and Licht, P. (1989) Neuropeptide stimulation of thyrotropin secretion in the larval bullfrog:

- Evidence for a common neuroregulator of thyroid and interrenal activity in metamorphosis. *J. Exp. Zool.*, 252: 101-104.
- Derby, A. and Etkin, W. (1968) Thyroxine-induced tail resorption in vitro as affected by anterior pituitary hormones. *J. Exp. Zool.*, 169: 1-8.
- Dickhoff, W.W., Folmar, L.C. and Gorbman, A. (1978) Changes in plasma thyroxine during smoltification of coho salmon, Oncorhynchus kistch. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 36: 229-232.
- Dodd, M.H.I. and Dodd, J.M. (1976) The biology of metamorphosis. In "Physiology of the Amphibia: Vol. 3". Ed. by B. Lofts, Academic Press, New York, pp. 467-599.
- Etkin, W. (1970) The endocrine mechanism of amphibian metamorphosis, an evolutionary achievement. *Mem. Soc. Endocrinol.*, 18: 137-155.
- Etkin, W. and Gona, A.G. (1967) Antagonism between prolactin and thyroid hormone in amphibian development. *J. Exp. Zool.*, 165: 149-258.
- Frieden, E. and Naile, B. (1955) Biochemistry of amphibian metamorphosis. 1. Enhancement of induced metamorphosis by glucocorticoids. *Science* 121: 37-39.
- Galton, V.A., Cohen, J.S. and Munck, K. (1982) T₄ 5'-monodiiodinase: The aquisition and significance of this enzyme system in the developing. In "Phylogenic Aspect of Thyroid Hormone Actions". Center for Academic Publ., Tokyo, pp. 75-90.
- Gordon, J.T., Crutchfield, F.L., Jennings, A.S. and Dratman, M.B. (1982) Preparation of lipid-free tissue extracts for chromatographic determination of thyroid hormones and metabolites. *Arch. Biochem. Biophys.*, 216: 407-415.
- Greenblatt, M., Brown, C.L., Lee, M., Dauder, S. and Bern, H.A. (1989) Changes in thyroid hormone levels in eggs and larvae and in iodide uptake by eggs of coho and chinook salmon. Oncorhynchus kisutch and O. tschawytscha. *Fish Physiol. Biochem.*, 6: 261-278.

- Griswold, M.D., Fisher, M.S. and Cohen, D.P. (1972)
Temperature-dependent intracellular distribution of
thyroxine in amphibian liver. Proc. Nat. Acad. Sci.
U.S.A., 69: 1486-1489.
- Gundernatsch, J.F. (1912) Feeding experiments on tadpoles.
1. The influence of specific organs given as food on
growth and differentiation: a contribution to the
knowledge of organs with internal secretion. Arch.
Entwicklungsmech. Org., 35: 457-483.
- Hanaoka, Y. (1966) Uptake of ^{131}I by the thyroid gland
during metamorphosis in Xenopus laevis. J. Fac. Sci.
Hokkaido Univ., 16: 106-112.
- Hanaoka, Y., Miyashita, K.S., Kondo, Y., Kobayashi, Y. and
Yamamoto, K. (1973) Morphological and functional maturation
of the thyroid during early development of anuran
larvae. Gen. Comp. Endocrinol., 21: 410-423.
- Hirano, T., Ogasawara, T., Bolton, J.P., Collie, N.L.,
Hasegawa, S. and Iwata, M. (1987) Osmoregulatory role of
prolactin in lower vertebrates. In "Comparative Physiology
of Environmental Adaptation". Ed. by R. Kirsch and
B. Lahlou, Karger, Basel, pp. 112-124.
- Jacobs, G.F., Goyvaerts, M.P., Vandorpe, G., Quaghebeur,
A.M.L. and Kuhn, E.R. (1988) Lutenizing hormone-
releasing hormone as a potent stimulator of the
thyroidal axis in Rainid frogs. Gen Comp. Endocrinol.,
70: 274-283.
- Jolivet-Jaudet, G. and Ishii, S. (1983) Nature des produits
de la synthese interrenaliene in vitro chez Bufo bufo
formosus adulte. C. R. Acad. Sci. Paris., 296(D): 1059-
1062.
- Just, J.J., Kraus-Just, J. and Check, D.A. (1981) Survey of
chordate metamorphosis. In "Metamorphosis". Ed. by L.I.
Gilbert and E. Frieden, Plenum Press, New York, pp. 256-
326.
- Kaltenbach, J.C. (1958) Direct steroid enhancement of in-
duced metamorphosis in peripheral tissues. Anat Rec.,
131: 569-570.

- Kate, N.W. (1961) Interrelationships of the thyroid and pituitary in embryonic and premetamorphic stages of the frog Rana pipens. Gen. Comp. Endocrinol., 1: 1-19.
- Kikuyama, S., Niki, K., Mayumi, M. and Kawamura, K. (1982) Retardation of thyroxine-induced metamorphosis by Amphenone B in toad tadpoles. Endocrinol. Japon., 29: 659-662.
- Kikuyama, S., Niki, K., Mayumi, M., Shibayama, R., Nishikawa, M. and Shintake, N. (1983 a) Studies on corticoid action on the toad tadpole tail in vitro. Gen. Comp. Endocrinol., 52: 395-399.
- Kikuyama, S., Suzuki, M.R. and Iwamuro, S. (1986) Elevation of plasma aldosterone levels of bullfrog tadpoles at metamorphic climax. Gen. Comp. Endocrinol., 63: 186-190.
- Kikuyama, S., Suzuki, M.R., Niki, K. and Yoshizato, K. (1983 b) Thyroid hormone-adrenal corticoid interaction in tadpole tail. In "Current Problems in Thyroid Research". Ed. by N. Ui, K. Torizuka, S. Nagasaki and K. Miyagi, Elsevier, Amsterdam, pp. 202-205.
- Kikuyama, S., Yamamoto, K. and Mayumi, M. (1980) Growth-promoting and antimetamorphic hormone in pituitary glands of bullfrogs. Gen. Comp. Endocrinol., 41: 212-216.
- Kistler, A., Yoshizato, K. and Frieden, E. (1975) Binding of thyroxine and triiodothyronine by nuclei of isolated tadpole liver cells. Endocrinology 97: 1036-1042.
- Kobayashi, H. (1958) Effect of desoxycorticosterone acetate on metamorphosis induced by thyroxine in anuran tadpoles. Endocrinology 62: 371-377.
- Kobayashi, T., Kikuyama, S., Kume, A., Okuma, J. and Ohkawa, M. (1989 b) [³⁵S]-Sulphate uptake by Xenopus laevis cartilage: The influence of plasma from the growth hormone-treated animal. Zool. Sci., 6: 757-762.
- Kobayashi, T., Kikuyama, S., Yasuda, A., Kawauchi, H., Yamaguchi, K. and Yokoo, Y. (1989 a) Purification and characterization of bullfrog growth hormone. Gen. Comp. Endocrinol., 73: 417-424.

- Leloup, J. and Buscaglia, M. (1977) La triiodothyronine, hormone de la metamorphose des amphibiens. C. R. Acad. Sci. Paris., 284(D): 2261-2263.
- Limbaugh, B.A. and Volpe, E.P. (1957) Early development of the gulf coast toad, Bufo valliceps, Wiegmann. Amer. Museum Novitates., No. 1842: 1-31.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Bio. Chem., 193: 265-275.
- Macchi, I.A. and Phillip, J.G. (1966) In vitro effect of adrenocorticotropin on corticoid secretion in turtle, snake and bullfrog. Gen. Comp. Endocrinol., 6: 170-182.
- Matsuda, K., Yamamoto, K. and Kikuyama, S. (1990) Purification and properties of newt prolactin. Gen. Comp. Endocrinol., 77: 63-69.
- Miyauchi, H., LaRochelle F.T., Jr., Suzuki, M., Freeman, M. and Frieden, E. (1977) Studies on thyroid hormones and their binding in bullfrog tadpole plasma during metamorphosis. Gen. Comp. Endocrinol., 33: 254-266.
- Mondou, P.M. and Kaltenbach, J.C. (1979) Thyroxine concentrations in blood serum and pericardial fluid of metamorphosing tadpoles and of adult frogs. Gen. Comp. Endocrinol., 39: 343-349.
- Nicoll, C.S. and Bern, H. (1971) On the action of prolactin among the vertebrate: Is there a common denominator? In "Ciba Foundation Symposium on Lactogenic Hormones". Ed. by G.E.W. Wolstenholme and J. Knight, Churchill Livingstone, London, pp. 299-324.
- Niinuma, K., Mamiya, N., Yamamoto, K., Iwamuro, S., Vaudry, H. and Kikuyama, S. (1989) Plasma concentration of aldosterone and prolactin in Bufo japonicus tadpoles during metamorphosis. Bull. Sci. Eng. Res. Lab. Waseda Univ., 122: 17-21.
- Niinuma, K., Tagawa, M., Hirano, T. and Kikuyama, S. (1991) Changes in tissue concentrations of thyroid hormones in metamorphosing toad larvae. Zool. Sci., 8: in press.

- Niinuma, K., Yamamoto, K. and Kikuyama, S. (1991) Changes in plasma and pituitary prolactin levels in toad (Bufo japonicus) larvae during metamorphosis. Zool. Sci., 8: in press.
- Niki, K., Yoshizato, K. and Kikuyama, S. (1981) Augmentation of nuclear binding capacity for triiodothyronine by aldosterone in tadpole tail. Proc. Japan Acad. Ser., B57: 271-275.
- Olivereau, M., Olivereau, J.M., Kikuyama, S. and Yamamoto, K. (1990) Hypothalamo-hypophysial axis in osmoregulation. In "Fortschritte der Zoologie Vol. 38: Biology and Physiology of Amphibians". Ed. by W. Hanke, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, pp. 371-383.
- Oppenheimer, J.H., Schwartz, H.L., Surks, M.I., Koerner, D. and Dillman, W.H. (1976) Nuclear receptors and the initiation of thyroid hormone action. Recent Prog. Horm. Res., 32: 529-565.
- Regard, E., Taurog, A. and Nakashima, T. (1978) Plasma thyroxine and triiodothyronine levels in spontaneously metamorphosing Rana catesbeiana tadpoles and in adult anuran amphibia. Endocrinology, 102: 674-684.
- Sakai, M., Hanaoka, Y., Tanaka, S. and Hayashi, H. (1990) Effect various anterior pituitary hormones of bullfrogs on the thyroxine release from the thyroid gland in vitro. Proc. Japan Comp. Endocrinol., in press.
- Sakai, S., Kohmoto, K. and Johke, T. (1975) A receptor site for prolactin in lactating mouse mammary tissues. Endocrinol. Japon., 22: 379-387.
- Saxen, L., Saxen, E., Toivonen, S. and Salimaki, K. (1957 a) Quantitative investigation on the anterior pituitary-thyroid mechanism during frog metamorphosis. Endocrinology, 61: 35-44.
- Seki, T. and Kikuyama, S. (1979) Effects of ergocornine and reserpine on metamorphosis of Bufo bufo japonicus tadpoles. Endocrinol. Japon, 26: 675-678.
- Sternberger, L.A., Jardy, P.H., Jr., Cuculis, J.J. and Meyeres, H.G. (1970) The unlabeled antibody-enzyme

method of immunocytochemistry. Preparation and properties of soluble antigen-antibody complex (horseradish peroxidase-antihorseradish peroxidase) and its use in the identification of spirochetes. *J. Histchem. Cytochem.*, 18: 315-333.

Suzuki, M.R. and Kikuyama, S. (1983) Corticoids augment nuclear binding capacity for triiodothyronine in bullfrog tadpole tail fins. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 52: 272-278.

Suzuki, S. and Suzuki, M. (1981) Changes in thyroidal and plasma iodine compounds during and after metamorphosis of the bullfrog *Rana catesbeiana*. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 45: 74-81.

Tagawa, M. and Hirano, T. (1987) Presence of thyroxine in eggs and changes in its content during early development of chum salmon, *Oncorhynchus keta*. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 68: 129-135.

Tagawa, M. and Hirano, T. (1990) Changes in tissue and blood concentrations of thyroid hormones in developing chum salmon. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 76: 437-443.

Takahashi, N., Toshihama, K., Kikuyama, S., Yamamoto, K., Wakabayashi, K. and Kato, Y. (1990) Molecular cloning and nucleotide sequence analysis of complementary DNA for bullfrog prolactin. *J. Mol. Endocrinol.*, 5: 281-287.

Tanaka, S., Sakai, M., Park, M.K. and Kurosumi, K. (1991) Differential appearance of the subunit of glycoprotein hormones (LH FSH and TSH) in the pituitary of bullfrog (*Rana catesbeiana*) larvae during metamorphosis. *Gen. Comp. Endocrinol.*, in press.

Vaitukaitis, J., Robbins, J.B., Nieschlag, E. and Ross, T. (1971) A method for producing specific antisera with small doses of immunogen. *J. Clin. Endocrinol.*, 33: 988-991.

Weil, M.R. (1986) Changes in plasma thyroxine levels during and after spontaneous metamorphosis in a natural population of the green frog *Rana clamitans*. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 62: 8-12.

- White, B.A. and Nicoll, C.S. (1981) Hormonal control of amphibian metamorphosis. In "Metamorphosis". Ed. by L.T. Gilbert and E. Frieden, Plenum Press, New York, pp. 363-396.
- Yamamoto, K. and Kikuyama, S. (1981) Purification and properties of bullfrog prolactin. *Endocrinol. Japon.*, 28: 59-64.
- Yamamoto, K. and Kikuyama, S. (1982 b) Effect of prolactin antiserum on growth and resorption of tadpole tail. *Endocrinol. Japon.*, 29: 81-85.
- Yamamoto, K. and Kikuyama, S. (1982 a) Radioimmunoassay of prolactin in plasma of bullfrog tadpoles. *Endocrinol. Japon.*, 29: 159-167.
- Yamamoto, K., Kikuyama, S. and Ishii, S. (1989) Homologous radioimmunoassay for plasma and pituitary prolactin in the toad, Bufo japonicus. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 74: 373-376.
- Yamamoto, K., Kobayashi, T. and Kikuyama, S. (1986 a) Purification and characterization of toad prolactin. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 63: 104-109.
- Yamamoto, K., Niinima, K. and Kikuyama, S. (1986 b) Synthesis and storage of prolactin in the pituitary gland of bullfrog tadpoles during metamorphosis. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 62: 247-253.
- Yasuda, A., Yamaguchi, K., Kobayashi, T., Yamamoto, K., Kikuyama, S. and Kawauchi, H. (1991) The complete amino acid sequence of prolactin from the bullfrog, Rana catesbeiana. *Gen. Comp. Endocrinol.*, in press.
- Yoshizato, K. and Frieden, E. (1975) Increase in binding capacity for triiodothyronine in tadpole tail nuclei during metamorphosis. *Nature (London)* 254: 705-706.
- Yoshizato, K. and Yasumasu, I. (1970) Effect of prolactin on the tadpole tail fin 1. Stimulatory effect of prolactin on the collagen synthesis of the tadpole tail fin. *Dev. Growth Differ.*, 11: 305-317.
- Zanini, A. and Giannattasio, G. (1972) Polyacrylamide gel

electrophoresis of rat anterior pituitary gland after
different extraction procedures. J. Endocrinol., 53:
177-178.

研究業績

種類別	題名	発表年月	発表・発行 掲載誌名	連名者
論文 (報文)	Synthesis and storage of prolactin in the pituitary gland of bullfrog tadpoles during metamorphosis.	1988	Gen. Comp. Endocrinol.	K. Yamamoto S. Kikuyama
論文	Prolactin cell function during amphibian metamorphosis.	1986	Pars Distalis. Pituitary Gland-Structure, Func. Reg. Bull. Sci. Eng. Res. Lab. Waseda Univ. No. 122, 17-21.	S. Kikuyama K. Yamamoto K. Kawamura
論文 (報文)	Plasma concentrations of aldosterone and prolactin in metamorphosing toad tadpoles.	1989.1	Zool. Sci. 8, (in press)	N. Mamiya K. Yamamoto S. Iwamuro H. Vaudry S. Kikuyama K. Yamamoto S. Kikuyama
論文 (報文)	Changes in plasma and pituitary prolactin levels in toad (<i>Bufo japonicus</i>) larvae during metamorphosis.	1991	Zool. Sci. 8, (in press)	M. Tagawa T. Hirano S. Kikuyama
論文 (報文)	Changes in Tissue Concentrations of Thyroid Hormones in Metamorphosing Toad Larvae.	1991	日本動物学会第54回大会	川崎真弓 菊山 栄
講演	ヒキガエル幼生の発生過程におけるプロラクチン分泌動態について	1983.10	日本動物学会第55回大会	山本和俊 菊山 栄
講演	ウシガエル幼生の変態期におけるプロラクチン合成能の変化	1984.10	日本動物学会第56回大会	山本和俊 菊山 栄
講演	ヒキガエル幼生の変態過程におけるプロラクチンの動態	1985.10	日本動物学会第57回大会	山本和俊 菊山 栄
講演	ヒキガエル静脈内 TRH 投与によるプロラクチン濃度の変化	1986.10	日本動物学会第58回大会	山本和俊 間宮直子 菊山 栄 田川正朋 平野哲也
講演	ヒキガエル幼生の変態に伴うホルモンレベルの変化	1987.10	日本動物学会第59回大会	酒井 誠 菊山 栄 田中 滋康 林 宏昭
講演	ウシガエルにおける TRH の TSH および PRL 放出活性	1988.10	日本動物学会第59回大会	酒井 誠 菊山 栄 田中 滋康 花岡 陽一 林 宏昭
講演	ウシガエル TSH のラジオイムノアッセイ	1988.10	日本動物学会第59回大会	酒井 誠 菊山 栄 田中 滋康 花岡 陽一 林 宏昭

