

# ラット脳トリヨードサイロニン核受容体の成熟に及ぼす新生仔期甲状腺機能低下症の影響

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	<a href="http://hdl.handle.net/2297/8835">http://hdl.handle.net/2297/8835</a>

## ラット脳トリヨードサイロニン核受容体の成熟に 及ぼす新生仔期甲状腺機能低下症の影響

金沢大学小児科学教室 (主任: 谷口 昂教授)

石 黒 和 正

(昭和55年5月8日受付)

本論文の要旨は、第8回国際甲状腺学会(1980年2月, シドニー)で発表した。

1972年, Oppenheimerら<sup>1)</sup>によりラットの肝細胞と腎細胞の核に  $T_3$  に対する特異的な結合部位の存在が報告され, 同様の  $T_3$ -核受容体はラットの脳<sup>2,3)</sup>, 肺<sup>4)</sup>, 心臓<sup>5,6)</sup>などの種々の臓器を始めとして, ラット下垂体腫瘍由来の  $GH_1$ , 細胞系<sup>7,8)</sup>, オタマジャクシの尾<sup>9)</sup>, ウサギの肺<sup>10)</sup>, さらにヒトのリンパ球<sup>11,12)</sup>, 線維芽細胞<sup>12)</sup>, 腫瘍細胞<sup>13)</sup>, 肝<sup>14)</sup>, 腎<sup>14)</sup>にも存在することが確認された。現在では, 甲状腺ホルモンはこの細胞核の受容体に結合して遺伝情報の発現に関与することにより作用すると考えられている<sup>15)</sup>。

一方, 中枢神経系の成熟過程において甲状腺ホルモンが不可欠なホルモンであることは周知の事実であり, 組織学的かつ生化学的発達に多大の影響を与えることが知られており<sup>16)</sup>, 成人の脳にも作用していることが示唆されている<sup>2)</sup>。この様な意味で脳は肝と並んで  $T_3$ -核受容体の研究をするのに恰好の臓器と考えられる。さらに, 先天性甲状腺機能低下症に対する甲状腺ホルモン補充療法開始時期には, 脳の不可逆的障害を防止することが可能である“critical period”が存在し, その時期以降に甲状腺ホルモンを投与しても脳の障害を防止することはできない<sup>17,18)</sup>。ラットでは生後10日間から14日間位が補充療法の critical period であると考えられている<sup>19,20)</sup>。ラットのこの期間には間脳-下垂体-甲状腺系の成熟を反映して血中  $T_3$  濃度の劇的な増加が認められる<sup>21)</sup>。この様に血中  $T_3$  濃度が著明に変化する時期に甲状腺ホルモンの作用発現に重要な意義を有する  $T_3$ -核受容体がいかに変化し, またこの変化が先天性甲状腺機能低下症における補充療法の critical period といかに関っている

かを検討することは興味深いと考えられる。そこで, 著者は実験的に先天性甲状腺機能低下ラットを作製し, 正常ラットの  $T_3$ -核受容体の変化と比較検討することにより興味深い知見を得たのでここに報告する。

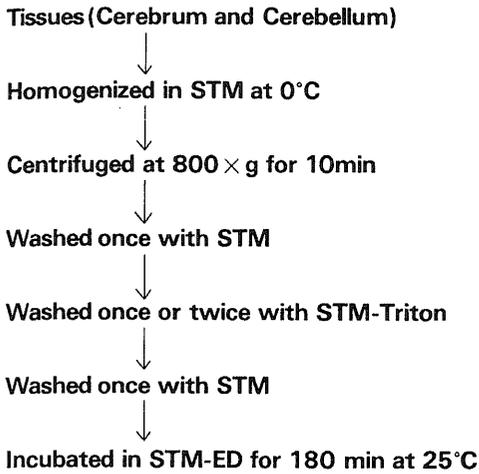
### 材料および方法

すべての実験にウイスター系の妊娠ラットを使用した。正常対照ラットには実験用固形飼料と食料水を自由に投与した。先天性甲状腺機能低下ラットは, 抗甲状腺剤が経胎盤的に胎児に移行すること, 母乳中に分泌されることを利用して<sup>22)-24)</sup>, 母ラットに妊娠11日目より飲料水として0.05%の propylthiouracil (PTU) 溶液を投与して作製した。甲状腺機能低下仔ラットは離乳時期が遅れ実験終了時の生後35日目にしても離乳しなかったため, 実験終了まで母親と同じペースで飼育し, 母乳を通してPTUを投与して甲状腺機能低下状態を維持した。仔ラットは出生前2日, 出生後2日以後35日まで1週毎にエーテル麻酔下に胸腔内より脱血することにより屠殺し実験に供した。

脳組織は屠殺後すみやかに摘出し, インキュベーションに供するまでのすべての操作は0℃で行った。脳組織は大脳と小脳を含む全脳を用い, 日齢に応じて1~5個の組織をプールして実験に供した。脳細胞の核の分離は Hymerら<sup>25)</sup>の肝細胞核分離の方法を応用して行った(表1)。脳組織は0.32M 蔗糖-1mM  $MgCl_2$ -20mM Tris-HCl 緩衝液, pH 7.85 (以下STM緩衝液と略) 中でホモゲナイズし, 800×gで10分間遠心した。得られた沈査をSTM緩衝液で一度洗浄した。

Effect of Neonatal Hypothyroidism on Maturation of Nuclear Triiodothyronine ( $T_3$ ) Receptors in Developing Rat Brain. Kazumasa Ishiguro, Department of Pediatrics, (Director: Prof. N. Taniguchi) School of Medicine, Kanazawa University.

表1 ラット脳細胞核の分離法



その沈査を0.5% Triton X-100を含むSTM緩衝液(STM-Triton緩衝液)で1ないし2回洗浄し、ついでTriton X-100を含まない溶液で洗浄して精製核を得た。生後21日目までの幼若ラットの脳組織では、STM-Triton緩衝液の1回の洗浄で十分な精製核を得ることができた。核分画の精製度は、位相差顕微鏡で形態学的に、蛋白とDNAの比が低いこと(平均2.1)、核と $T_3$ の非特異的結合の低いことにより確認することができた。インキュベーションの条件はSamuelsら<sup>9)</sup>の肝細胞核の方法に準じて行った。湿重量0.05gの脳組織(DNA量にして50~100 $\mu$ gに相当)より分離した精製核を、STM緩衝液に2mMのEDTAと5mMのdithiothreitol(DTT)を加えた溶液(STM-ED緩衝液)1mlに、10pMのL-[<sup>125</sup>I] $T_3$ (比放射能750~1250 $\mu$ Ci/ $\mu$ g, New England Nuclear Co.), さらに種々の濃度(30~1000pM)の非標識L- $T_3$ (Sigma Chemical Co.)を加えて25°Cで180分間インキュベートした。インキュベーション後検体を0°Cに冷却し、1800×gで10分間遠心分離した。遠心後の上清は遊離型ホルモン測定のため保存し、沈査はSTM-Triton緩衝液で1回洗浄後<sup>125</sup>Iをカウントし結合型ホルモン量とした。同時に30000pMの非標識 $T_3$ を加えてインキュベートした検体の結合型ホルモン量を測定し、非特異的結合としてすべての検体から差引いて補正した。インキュベーション後の上清中に蛋白と結合したホルモンが存在すると結合能の測定に影響するため<sup>26)</sup>、上清をDowex-1(Cl<sup>-</sup> form, 1×8, 200-400 mesh) Anion exchange resin<sup>26)</sup>と、Dextran-coated charcoal法<sup>27)</sup>で検定し

たが蛋白結合ホルモンは存在しなかった。そこで、上清の一部をカウントして遊離型ホルモン量を測定した。

最大結合能(MBC)と、親和定数(Ka)はScatchard plot<sup>28)</sup>により求めた。Scatchard plotは、7点の濃度についてtriplicateで行った。蛋白濃度はLowryらの方法<sup>29)</sup>、DNAはBurtonの方法<sup>30)</sup>、血漿 $T_3$ 濃度はRIAにより測定した。推計学的検定法はStudent's t testによった。

### 成 績

1. 母ラットに対するPTU処置が仔ラットに及ぼす影響

図1に正常対照ラットと、PTU処置ラットの血漿 $T_3$ 濃度を示した。PTU処置ラットの血漿 $T_3$ 濃度は生後14日目より測定したが、実験終了時まで有意な低値を維持することができた。PTU処置の影響は、体重(図2)、脳重量(図3)、脳のDNA濃度(図4)にも表われている。体重増加は生後21日以後はほとんど停止し、脳重量にも同様の傾向が認められた。脳のDNA濃度は、統計学的に有意ではないがPTU処置ラットに高い傾向が認められた。これらのPTU処置の影響は、実験的に甲状腺機能低下を作る際に問題となる栄養障害による効果<sup>31)32)</sup>とは明らかに異っており、甲状腺機能低下によりもたらされたものと考えることができ

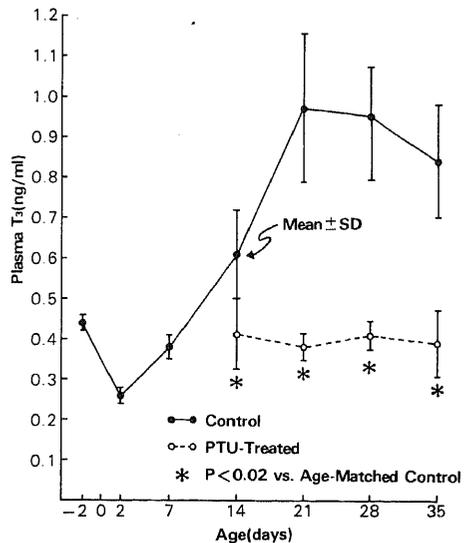


図1 正常対照とPTU処置ラットの血漿 $T_3$ 濃度

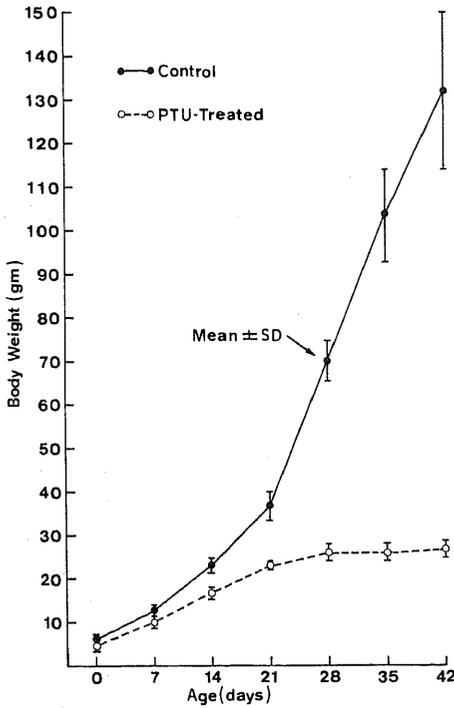


図2 正常対照と PTU 処置ラットの体重

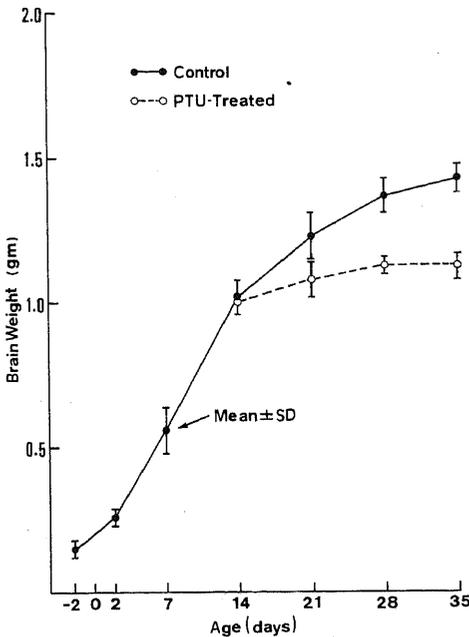


図3 正常対照と PTU 処置ラットの脳重量

2. インキュベーション温度と時間が結合動態に及ぼす影響

インキュベーション溶液の組成は Samuels らの肝細胞核の方法<sup>31)</sup>に準じて作製したが、核受容体と  $L-T_3$  の結合は pH 7.4 ~ 8.0 で安定しており<sup>33)</sup>, EDTA と DTT を加えることにより結合能が増加することが知られている<sup>34)</sup> DTT を加えることで結合能が増加することは、 $T_3$  と核受容体が結合した複合体が SH 基を有していることを示していると考えられている<sup>34)</sup>. インキュベーション温度の影響を検討した著者の成績を図5に示した. 37°C でインキュベートすると、特異的結合は 30 ~ 60 分に最高値に達するが時間の経過と共に

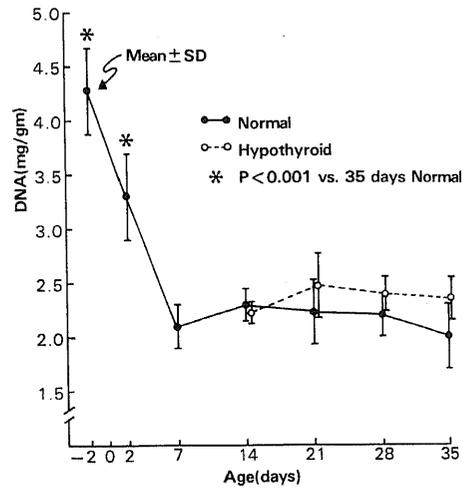


図4 正常対照と PTU 処置ラットの脳の DNA 濃度

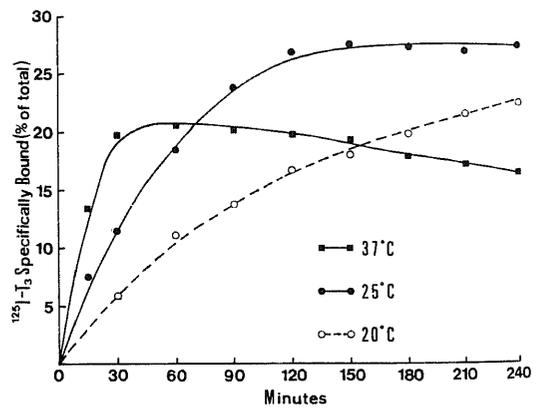


図5  $^{125}I-I_3$  と脳細胞核の特異的結合に及ぼすインキュベーション温度の影響

に特異的結合の低下が認められた。これは、核受容体と  $T_3$  の複合体が温度に対して不安定<sup>35)</sup>であることを示すものと考えられる。25℃では最高値に達するまでに150～180分を要するが、37℃より高い特異的結合が得られ、平衡状態に達した後も特異的結合の低下は認められなかった。20℃では、240分のインキュベーションでも平衡状態に達することはなかった。以上の検討の結果、著者はインキュベーション温度を25℃に

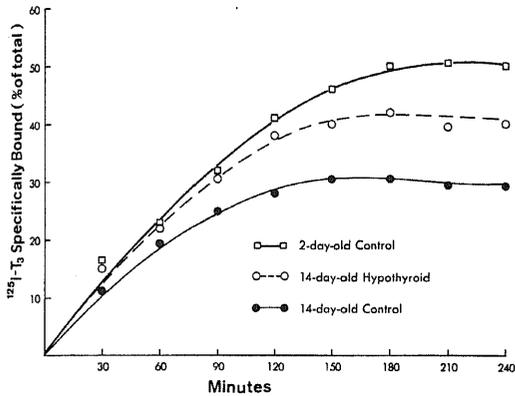


図6  $^{125}\text{I}-T_3$  と脳細胞核の特異的結合の time course

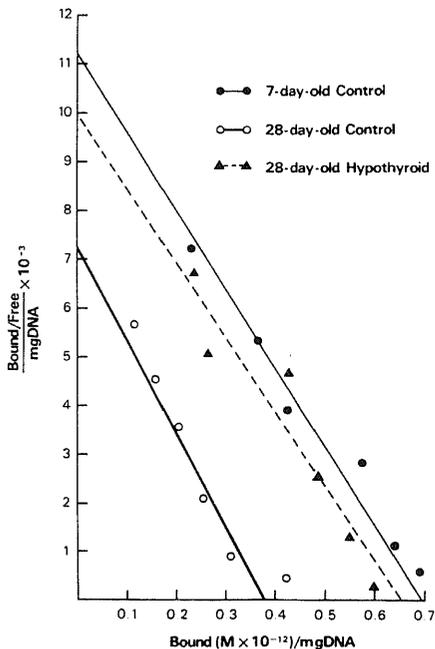


図7  $T_3$  と脳細胞核との結合の Scatchard plot

設定した。図6に、正常対照と PTU 処置ラットの脳より分離した核を  $^{125}\text{I}-T_3$  と共に 25℃ でインキュベートし、特異的結合の time course を検討した代表的な例を示した。time course はそれぞれの検体で類似しており、いずれも 150～180 分で平衡状態に達することがわかる。そこで、著者はすべての実験において 25℃ で 180 分のインキュベーションを行った。この条件下では、トレーサー濃度 (10pM) の  $^{125}\text{I}-T_3$  とインキュベートすると全放射活性の 25% から 50% に達する特異的結合が得られ、非特異的結合はインキュベーション時間とは無関係に 1.5% から 3.5% と低値であった。インキュベーション終了後、MBC と  $K_a$  は Scatchard plot により求めたが、その代表的な例を図7に示した。各点は直線性を示し、結合部位が単一であることが示唆された。

### 3. 正常対照ラットの MBC と血漿 $T_3$ 濃度の日齢による変化 (図8)

出生前に低値であった MBC (平均値 ± 標準偏差:  $0.22 \pm 0.02 \text{ ng } T_3 / \text{ mg DNA}$ ) は、出生後有意に増加し高値は7日目まで認められた。生後14日目には  $0.25 \pm 0.02 \text{ ng } T_3 / \text{ mg DNA}$  のレベルまで低下し、以後35日目までこの低値が持続した ( $0.25 \pm 0.03 \text{ ng } T_3 / \text{ mg DNA}$ )。血漿  $T_3$  濃度は出生前には低値 ( $0.44 \pm 0.02 \text{ ng/ml}$ ) を示し、出生後2日目には一旦低下、以後は急激に上昇して21日目までにほぼ成人のレベルに達した。

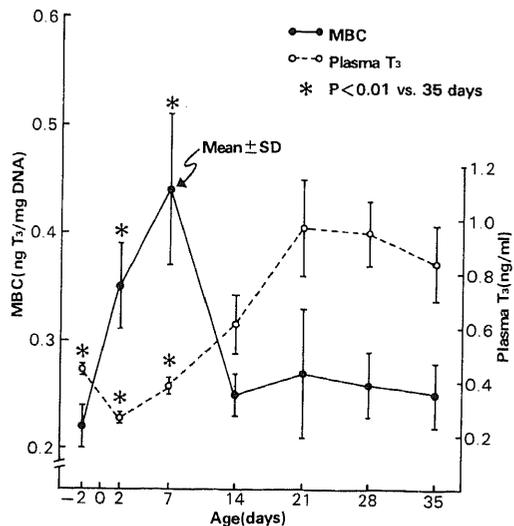


図8 正常対照ラットの MBC と血漿  $T_3$  濃度の日齢による変化

4. PTU 処置ラットの MBC と血漿 T<sub>3</sub> 濃度の日齢による変化 (図9)

PTU 処置ラットの血漿 T<sub>3</sub> 濃度は、生後 14 日目には 0.41 ± 0.10ng/ml と対照ラットに比べ有意 (P <

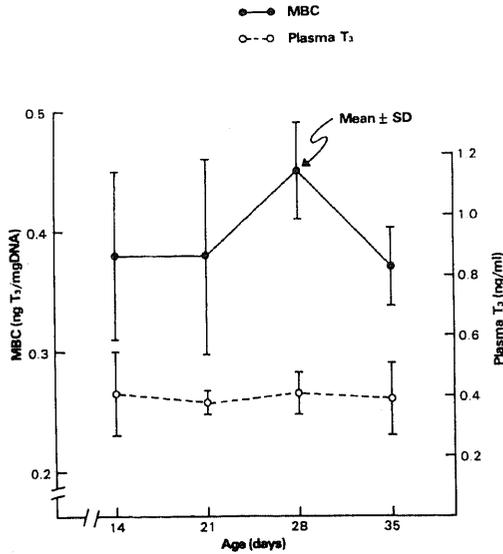


図9 PTU 処置ラットの MBC と血漿 T<sub>3</sub> 濃度の日齢による変化

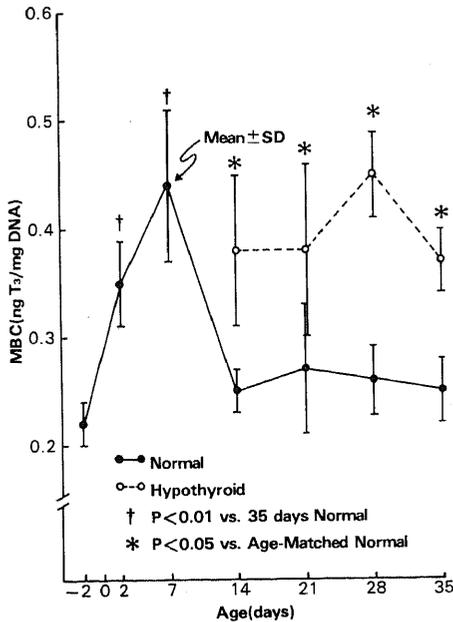


図10 正常対照と PTU 処置ラットの MBC の日齢による変化

表2 正常対照と PUT 処置ラットの脳の MBC, Ka, DNA 濃度と血漿 T<sub>3</sub> 濃度

Age (days)	MBC (ng T <sub>3</sub> /mg DNA)		Ka (×10 <sup>10</sup> M <sup>-1</sup> )		Plasma T <sub>3</sub> (ng/ml)		DNA (mg/g)	
	Control	PTU-treated	Control	PTU-treated	Control	PTU-treated	Control	PTU-treated
-2	0.22 ± 0.02 (3)	not done	1.7 ± 0.3 (3)	not done	0.44 ± 0.02 (3)**	not done	4.27 ± 0.38 (3)***	not done
2	0.35 ± 0.04 (4)**	not done	1.8 ± 0.4 (4)	not done	0.26 ± 0.02 (7)***	not done	3.32 ± 0.42 (4)***	not done
7	0.44 ± 0.07 (4)***	not done	1.7 ± 0.4 (4)	not done	0.38 ± 0.03 (7)***	not done	2.11 ± 0.20 (4)	not done
14	0.25 ± 0.02 (5)	0.38 ± 0.07 (4)##	2.0 ± 0.2 (5)	1.9 ± 0.4 (4)	0.61 ± 0.11 (6)*	0.41 ± 0.10 (4)##	2.34 ± 0.16 (5)	2.21 ± 0.13 (4)
21	0.27 ± 0.06 (5)	0.38 ± 0.08 (4) #	1.9 ± 0.3 (5)	1.7 ± 0.3 (4)	0.91 ± 0.18 (7)	0.38 ± 0.03 (8)###	2.26 ± 0.29 (5)	2.48 ± 0.33 (4)
28	0.26 ± 0.03 (5)	0.45 ± 0.04 (4)###	1.8 ± 0.5 (5)	1.8 ± 0.3 (4)	0.95 ± 0.12 (6)	0.41 ± 0.05 (5)###	2.24 ± 0.20 (5)	2.38 ± 0.14 (4)
35	0.25 ± 0.03 (5)	0.37 ± 0.03 (4)###	2.0 ± 0.5 (5)	1.6 ± 0.4 (4)	0.84 ± 0.14 (6)	0.39 ± 0.08 (5)###	2.02 ± 0.27 (5)	2.35 ± 0.20 (4)

Values are mean ± SD. Number of animals (pools) is in parenthesis.  
 \* : P < 0.02 vs. 35 days control group \*\* : P < 0.01 \*\*\* : P < 0.001  
 # : P < 0.05 vs. age-matched control group ## : P < 0.02 ### : P < 0.001

0.02)に低下し、実験終了時までこのレベルに止り甲状腺機能低下状態が持続した。生後14日目のMBCは同日齢の対照ラットに比べ有意( $P < 0.02$ )に高く、35日目まで有意な高値が認められた。図10に正常対照とPTU処置ラットのMBCの日齢に伴う変化を対比して示した。

#### 5. Kaの日齢とPTU処置による変化

表2に正常対照とPTU処置ラットの脳のMBC, Ka, DNA濃度と血漿 $T_3$ 濃度を示した。正常対照ラットの各日齢群の比較、および正常対照とPTU処置ラットとの間にKaの有意差は認められなかった(正常対照ラットの平均値±標準偏差:  $1.9 \pm 0.3 \times 10^{10}M^{-1}$ , PTU処置ラット:  $1.7 \pm 0.2 \times 10^{10}M^{-1}$ )。

### 考 察

近年、甲状腺ホルモンの核受容体の研究が精力的に行なわれており、次第にこの受容体の性状が明らかになってきた。核受容体と甲状腺ホルモンの結合はステロイドホルモンの受容体とは異り、cytosol蛋白を介さずに行なわれるので<sup>35)36)</sup>、単離核と遊離型 $T_3$ をin vitroでインキュベートすることにより受容体の性状を調べることが可能である。この受容体は種々の遊離型の甲状腺ホルモン類似体と結合するが、その親和性が生物活性とよく一致することが報告されている<sup>37)38)</sup>。この核受容体蛋白はRNAase, DNAaseに対して安定であり、プロナーゼで水解され、0.4MのKCl溶液により抽出されることより非ヒストン蛋白である可能性が示されている<sup>39)40)</sup>。

一方、 $T_3$ -核受容体に変化を与えるさまざまな状態が研究され、ラット肝では飢餓状態<sup>41)~43)</sup>、腫瘍の移植<sup>44)45)</sup>、部分的肝切除<sup>46)</sup>、グルカゴンの投与<sup>47)</sup>により結合能が減少することが報告されている。甲状腺機能の変動による受容体の変化は興味ある問題であるが、成人ラット肝における検討では甲状腺機能低下、もしくは $T_3$ の投与により受容体の性状は変化しないとする報告が多い<sup>48)~50)</sup>。しかし、Samuelsら<sup>51)52)</sup>は $GH_1$ 細胞系を用いた実験で核受容体を $T_3$ とブレインキュベートすることにより結合能の低下を観察しており、臓器により異なる可能性もある。最近、ラットの成長に伴う $T_3$ -核受容体の変化がそれぞれ肝<sup>53)</sup>と脳<sup>54)</sup>で報告されたが、その変化は2つの臓器で非常に異っている。DeGrootら<sup>55)</sup>は成長に伴う肝細胞の $T_3$ -核受容体濃度の増加を、Schwartzら<sup>54)</sup>は成長に伴う脳細胞の $T_3$ -核受容体濃度の減少を報告している。今回の著者の実験では、正常対照ラット脳の核受容体はSchwartzらの報告と同様の傾向が認められた。すなわち $T_3$ -

核受容体は出生前の胎生期にも存在し、そのMBCは出生後有意に増加して7日目までは高値を示すが、生後2週までに低下して以後は実験終了時まで低値が持続した。Schwartzらは成長に伴うMBC低下の時期を生後4週頃としており、著者の成績とは若干異っている。このような脳細胞の $T_3$ -核受容体の成長に伴う変化は、DeGrootらの報告した肝細胞のそれとは相反しており、成長期のそれぞれの臓器に対する甲状腺ホルモン作用の特異性を示唆している可能性も考えられる。

今回の実験で、正常対照ラットに認められたMBCの低下が、PTU処置を施した甲状腺機能低下ラットでは実験終了時の35日目でも認められなかったことは興味深い。しかし、成長や甲状腺機能低下状態における受容体の変化をin vitroの実験で検討する場合には、それぞれの検体が平衡状態でMBCの測定が行なわれていることが前提である<sup>41)44)</sup>。図6より明らかな様に、各日齢や甲状腺機能低下ラットの検体が平衡状態に達するまでの時間の差は認められず、結合能の変化がin vitroの結合動態の相違によるものとは考えられない。また、成熟過程や甲状腺機能低下により血中の $T_3$ 濃度が変化し、内因性 $T_3$ による核受容体のoccupancyが変わることが予想される<sup>50)53)</sup>。内因性 $T_3$ によるoccupancyが異なる検体を用いてin vitroで結合能を正確に測定するためには、あらかじめ核受容体に結合している内因性 $T_3$ がインキュベーション中に充分放出され、インキュベーション溶液中の $T_3$ とexchangeableであることが必要である。この検討はすでに肝の核受容体において数多くの報告がなされており<sup>35)56)4)</sup>、著者の設定した25℃、180分というインキュベーションの条件は、あらかじめ核受容体に結合している内因性 $T_3$ とあとから添加された標識ないし非標識 $T_3$ との交換に十分な時間と温度であると考えられた。さらに、内因性 $T_3$ がまだ上昇していないと思われる出生前のMBC値が出生後2日のそれより有意に低値であったこと(図10)からみても、上記の結合能の変化がoccupancyの相違によるみかけ上のものではないと考えられる。一方、Kaは成長や甲状腺機能低下により変化しなかった。以上の結果は、成長もしくは甲状腺機能低下によりラット脳の $T_3$ -核受容体のKaは変化せず、MBCが変化することを示している。しかし、Kaに関しては著者の成績と同じく変化が認められないという報告<sup>54)55)</sup>や、逆に変化を認めるという報告<sup>56)</sup>もあり今後の検討を要すると思われる。今回の実験成績より、ラット脳の $T_3$ -核受容体は生後14日目までにMBCの低下に伴って成熟すると結論

することができる。さらに正常対照と甲状腺機能低下ラットのMBCの変化が相違することより、この成熟過程は $T_3$ 依存性であるという可能性が示された。別の表現をすれば、ラットの成長過程において甲状腺より $T_3$ 分泌が刺激されること<sup>21)</sup>、もしくは末梢での $T_4$ から $T_3$ への変換が促進されること<sup>67)</sup>より $T_3$ -核受容体の成熟がもたらされるということの意味しているとも考えられる。

Oppenheimerら<sup>58)</sup>はラットに標識 $T_3$ を静注し、各臓器の核に結合した標識 $T_3$ を測定することによりin vivoで各組織の $T_3$ -核受容体を調べ、 $K_a$ はほぼ等しいが、MBCは肝、下垂体、腎、心臓などいわゆる甲状腺ホルモン反応性組織において大きく、脾、睪丸など甲状腺ホルモン非反応性組織において小さいことを観察し、各組織のMBCはその組織の $T_3$ に対する反応性を示唆する可能性があるとして述べている。著者も成熟ラットの肝、脳、肺において本論文に述べた方法により核受容体のMBCをin vitroで測定した。各臓器におけるMBCの比は肝を1とすると脳は0.39、肺は0.40であった。このようなMBCの相違がその組織の甲状腺ホルモンに対する反応性を表わすとすれば、新生仔期のラット脳の $T_3$ -核受容体のMBCが高値を示すということは、この時期に脳組織が甲状腺ホルモンに対して高い反応性を有するというを反映し、生後14日目に観察されたMBCの低下は、脳組織が成熟することにより甲状腺ホルモンに対する反応性が低下したことを示す<sup>54)55)</sup>とも考えることができる。この考えは、先天性甲状腺機能低下ラットの脳に対する甲状腺ホルモンの作用にはcritical periodが存在することを考える上で合理的である様に思われる。すなわち、甲状腺ホルモンの補充療法をcritical period以降に行った場合脳の障害が回復不能であることを、 $T_3$ -核受容体のMBCが減少することで説明すれば都合がよい。しかし、今回の実験で甲状腺機能低下ラットの受容体のMBCは、critical periodを優に越えた35日目にして新生仔期と同様の高値を持続していることが観察された。この成績は、甲状腺機能低下ラット脳の甲状腺ホルモンに対する反応性の低下が、 $T_3$ -核受容体のMBCの低下によっては説明できないことを示している。それでは、甲状腺機能低下ラット脳の $T_3$ -核受容体のMBC高値が持続することの意味するものは何であろうか。甲状腺ホルモンの可逆的な生化学的作用に対する反応性を高める意義を有する可能性があるが、一方高い結合能が必ずしも高い反応性を意味するものではないという可能性も否定できない。これらの結合能の変化の意義を理解するためには、甲状腺ホル

モンの脳組織に対するホルモン作用を示す生化学的なパラメーターを用いて検討する必要がある<sup>2154)</sup>。しかし、レセプター結合以後の過程は不明な点が多く、肝における甲状腺ホルモンの作用を示す重要なパラメーターである $\alpha$ -glycerophosphate dehydrogenase<sup>49)59)</sup>、malic enzyme<sup>49)60)</sup>、酸素消費量<sup>54)</sup>も脳では甲状腺ホルモンに対して良好な反応を示さず不適當であり、脳における甲状腺ホルモン作用のパラメーターを決定することが今後の重要な課題であると考えられる。

## 結 論

成長期ラット脳の $T_3$ -核受容体の成熟過程に及ぼす甲状腺機能低下の影響を検討した。

1. 正常ラット脳の $T_3$ -核受容体は、胎生期より認められ、その最大結合能は出生前には低値を示し、出生後2日目にして有意に増加し7日目まで高値が認められた。14日目には低下し以後35日目まで低値が持続した。
2. 甲状腺機能低下ラット脳の生後14日目の最大結合能は、同日の正常ラットの最大結合能よりも有意に高く、35日目においても最大結合能の低下は認められなかった。
3. 親和定数の、日齢や甲状腺機能低下による変化は認められなかった。
4. 正常ラット脳の $T_3$ -核受容体は、生後14日目までにその最大結合能が低下するが、甲状腺機能低下ラットにおいては最大結合能の低下は認められず、この成熟過程は $T_3$ 依存性であることが示唆された。
5. 新生仔ラットや、甲状腺機能低下ラットに認められる $T_3$ -核受容体の最大結合能高値の意義は、現在の所不明であり今後の検討を要すると考えられる。

稿を終るに臨み、御指導と御校閲を賜った恩師谷口昂教授に深甚の謝意を表します。また、本研究の遂行にあたり、終始直接御指導、御教示を賜った佐藤保助教授、並びに御協力頂いた鈴木祐吉助手に深く感謝します。併せて、種々の御援助、御協力をいただきました小児科研究室の皆様にも感謝します。

## 文 献

- 1) Oppenheimer, J. H., Koerner, D., Schwartz, H. L. & Surks, M. I. : Specific-nuclear triiodothyronine binding sites in rat liver and kidney. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **35**, 330-333 (1972).
- 2) Eberhardt, N. L., Valcana, T. & Timiras, P. S. : Triiodothyronine nuclear receptor : an in vivo comparison of the binding of triiodothy-

- onine to nuclei of adult rat liver, cerebral hemisphere and anterior pituitary. *Endocrinology*, **102**, 556-561 (1978).
- 3) **Schwartz, H. L. & Oppenheimer, J. H.** : Nuclear triiodothyronine receptor sites in brain : probable identity with hepatic receptors and regional distribution. *Endocrinology*, **103**, 267-273 (1978).
- 4) **Morishige, W. K. & Guernsey, D. L.** : Triiodothyronine receptors in rat lung. *Endocrinology*, **102**, 1628-1632 (1978).
- 5) **Oppenheimer, J. H., Schwartz, H. L., Dillman, W. & Surks, M. I.** : Effect of thyroid hormone analogues on the displacement of  $^{125}\text{I}$ -L-triiodothyronine from hepatic and heart nuclei in vivo : possible relationship to hormonal activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **55**, 544-550 (1973).
- 6) **Tsai, J. S. & Chen, A.** : Thyroid hormones : effect of physiological concentrations on cultured cardiac cells. *Science*, **194**, 202-204 (1976).
- 7) **Samuels, H. H. & Tsai, J. S.** : Thyroid hormone action in cell culture : demonstration of nuclear receptors in intact cells and isolated nuclei. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **70**, 3488-3492 (1973).
- 8) **Samuels, H. H. & Tsai, J. S.** : Thyroid hormone action. Demonstration of similar receptors in isolated nuclei of rat liver and cultured GH<sub>1</sub> cells. *J. Clin. Invest.*, **53**, 656-659 (1974).
- 9) **Yoshizato, K. & Frieden, E.** : Increase in binding capacity for triiodothyronine in tadpole tail nuclei during metamorphosis. *Nature*, **254**, 705-707 (1975).
- 10) **Lindenberg, J. A., Brehier, A. & Ballard, P. L.** : Triiodothyronine nuclear binding in fetal and adult rabbit lung and cultured lung cells. *Endocrinology*, **103**, 1725-1731 (1978).
- 11) **Tsai, J. S. & Samuels, H. H.** : Thyroid hormone action. Demonstration of putative nuclear receptors in human lymphocytes. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **38**, 919-922 (1974).
- 12) **Bernal, J., Refetoff, S. & DeGroot, L. J.** : Abnormalities of triiodothyronine binding to lymphocyte and fibroblast nuclei from a patient with peripheral tissue resistance to thyroid hormone action. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **47**, 1266-1272 (1978).
- 13) **Burke, R. E., Zava, D. T. & McGuire, W. L.** : Human breast cancer cells contain thyroid hormone receptors. *Clin. Res.*, **25**, 461 (1977).
- 14) **Schuster, L. D., Schwartz, H. L. & Oppenheimer, J. H.** : Nuclear receptors for 3, 5, 3'-triiodothyronine in human liver and kidney : characterization, quantitation, and similarities to rat receptors. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **48**, 627-632 (1979).
- 15) **Oppenheimer, J. H., Schwartz, H. L., Surks, M. I., Koerner, D. & Dillmann, W. H.** : Nuclear receptors and the initiation of thyroid hormone action. *Recent Prog. Horm. Res.*, **32**, 359-363 (1976).
- 16) **Ford, D. H. & Cramer, E. V.** : Developing nervous system in relation to thyroid hormone, p1-18. In G. D. Grave(ed.), *Thyroid hormones and brain development*, Raven Press, New York, 1977.
- 17) **Eayrs, J. T.** : Age as a factor determining the severity and reversibility of the effects of thyroid deprivation in the rat. *J. Endocrinol.*, **22**, 409-419 (1961).
- 18) **Geloso, J. P., Hemon, P., Legrand, J., Legrand, C. & Jost, A.** : Some aspects of thyroid physiology during the perinatal period. *Gen. Comp. Endocrinol.*, **10**, 191-197 (1968).
- 19) **Krawiec, L., Garcia Argiz, C. A., Gómez, C. J. & Pasquini, J. M.** : Hormonal regulation of brain development. III. Effects of triiodothyronine and growth hormone on the biochemical changes in the cerebral cortex and cerebellum of neonatally thyroidectomized rats. *Brain Res.*, **15**, 209-218 (1969).
- 20) **Sokoloff, L. & Kennedy, C.** : The action of thyroid hormones and their influence on brain development and function, p295-332. In G. E. Gaul(ed.), *Biology of brain dysfunction*, vol 2, Plenum Press, New York, 1973.
- 21) **Dussault, J. H. & Labrie, F.** : Development of the hypothalamic-pituitary-thyroid axis in

the neonatal rat. *Endocrinology*, **97**, 1321 - 1324 (1975).

- 22) **Marchant, B., Browmlie, B. E. W., Mckay Hart, D., Horton, D. W. & Alexander, W. D.** : The placental transfer of propylthiouracil, methimazole and carbimazole. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **45**, 1187-1193 (1977).
- 23) **Gourdon, J., Clos, J., Coste, C., Dainat, J. & Legrand, J.** : Comparative effects of hypothyroidism, hyperthyroidism and undernutrition on the protein and nucleic acid contents of the cerebellum in the young rat. *J. Neurochem.*, **21**, 861-871 (1973).
- 24) **Burstein, P. J., Draznin, B., Johnson, C. J. & Schalch, D. S.** : The effect of hypothyroidism on growth, serum growth hormone, the growth hormone-dependent somatomedine, insulin-like growth factor, and its carrier protein in rats. *Endocrinology*, **104**, 1107-1111 (1979).
- 25) **Hymer W. C. & Kuff, E. L.** : Isolation of nuclei from mammalian tissues through the use of Triton X-100. *J. Histochem. Cytochem.*, **12**, 359-363 (1964).
- 26) **Bernal, J. & DeGroot, L. J.** : Thyroid hormone receptors : release of receptor to the medium during in vitro incubation of isolated rat liver nuclei. *Endocrinology*, **100**, 648 - 655 (1977).
- 27) **Korenman, S. G.** : Comparative binding affinity of estrogens and its relation to estrogenic potency. *Steroids*, **13**, 163 - 177 (1969).
- 28) **Scatchard, G.** : The attractions of proteins for small molecules and ions. *Ann. N Y Acad. Sci.*, **51**, 660-672 (1949).
- 29) **Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. & Randall, R. J.** : Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**, 265 - 275 (1951).
- 30) **Burton, K.** : A study of the conditions and mechanism of the diphenylamine reaction for the colorimetric estimation of deoxyribonucleic acid. *Biochem. J.*, **62**, 315-323 (1956).
- 31) **Balázs, R., Kovacs, S., Teichgräber, P., Cocks, W. A. & Eayrs, J. T.** : Biochemical effects of thyroid deficiency on the developing brain.

*J. Neurochem.*, **15**, 1335-1349 (1968).

- 32) **Rosman, N. P. & Malone, M. J.** : Brain myelination in experimental hypothyroidism : morphological and biochemical observations, p169 - 198. In G. D. Grave(ed.), *Thyroid hormones and brain development*, Raven Press, New York, 1977.
- 33) **DeGroot, L. J. & Torresani, J.** : Triiodothyronine binding to isolated liver cell nuclei. *Endocrinology*, **96**, 357-369 (1975).
- 34) **Torresani, J. & DeGroot, L. J.** : Triiodothyronine binding to liver nuclear solubilized proteins in vitro. *Endocrinology*, **96**, 1201-1209 (1975).
- 35) **DeGroot, L. J., Torresani, J., Carrayon, P. & Tirard, A.** : Factors influencing triiodothyronine binding properties of liver nuclear receptors. *Acta Endocrinol.*, **83**, 293 - 304 (1976).
- 36) **Doctre, R., Visser, T. J., Stinis, J. T., van den Hout-Goemaat, N. L. & Hennemann, G.** : Binding of L-triiodothyronine to isolated rat liver and kidney nuclei under various circumstances. *Acta Endocrinol.*, **81**, 82-95 (1976).
- 37) **Koerner, D., Schwartz, H. L., Surks, M. I. & Oppenheimer, J. H.** : Binding of selected iodothyronine analogues to receptor sites of isolated rat hepatic nuclei : high correlation between structural requirements for nuclear binding and biological activity. *J. Biol. Chem.*, **250**, 6417-6423 (1975).
- 38) **Oppenheimer, J. H., Schwartz, H. L., Dillman, W. & Surks, M. I.** : Effect of thyroid hormone analogues on the displacement of <sup>125</sup>I-L-triiodothyronine from hepatic and heart nuclei in vivo : possible relationship to hormonal activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **55**, 544-550 (1973).
- 39) **Samuels, H. H., Tsai, J. S., Gasanova, J. & Stanley, F.** : Thyroid hormone action : In vitro characterization of solubilized nuclear receptors from rat liver and cultured GH<sub>1</sub> cells. *J. Clin. Invest.*, **54**, 853-865 (1974).
- 40) **Surks, M. I., Koerner, D., Dillman, W. & Oppenheimer, J. H.** : Limited capacity binding sites for L-Triiodothyronine in rat liver

- nuclei : localization to the chromatin and partial characterization of the L - triiodothyronine-chromatin complex. *J. Biol. Chem.*, **248**, 7066-7072 (1973).
- 41) **Burman, K. D., vonne Lukes, Y., Wright, F. D. & Wartofsky, L.** : Reduction in hepatic triiodothyronine binding capacity induced by fasting. *Endocrinology*, **101**, 1331-1334 (1977).
- 42) **DeGroot, L. J., Coleoni, A. H., Rue, P. A., Seo, H., Martino, E. & Refetoff, S.** : Reduced nuclear triiodothyronine receptors in starvation-induced hypothyroidism. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **79**, 173-178 (1977).
- 43) **Schussler, G. C. & Orlando, J.** : Fasting decreases triiodothyronine receptor capacity. *Science*, **199**, 686-688 (1978).
- 44) **Surks, M. I., Grajower, M. M., Tai, M. & DeFesi, C. R.** : Decreased hepatic nuclear L - triiodothyronine receptors in rats and mice bearing transplantable neoplasms. *Endocrinology*, **103**, 2234-2239 (1978).
- 45) **Grajower, M. M. & Surks, M. I.** : Effect of decreased hepatic nuclear L - triiodothyronine receptors on the response of hepatic enzymes to L - triiodothyronine in tumor-bearing rats. *Endocrinology*, **104**, 697-703 (1979).
- 46) **Dillmann, W. H., Schwartz, H. L. & Oppenheimer, J. H.** : Selective alterations in hepatic enzyme response after reduction of nuclear triiodothyronine receptor sites by partial hepatectomy and starvation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **80**, 259-265 (1978).
- 47) **Dillmann, W. H., Bonner, R. A. & Oppenheimer, J. H.** : Glucagon administration decreases hepatic nuclear triiodothyronine binding capacity. *Endocrinology*, **102**, 1633-1636 (1978).
- 48) **Oppenheimer, J. H., Schwartz, H. L. & Surks, M. I.** : Nuclear binding capacity appears to limit the hepatic response to L - triiodothyronine ( $T_3$ ). *Endocrine. Res. Commun.*, **2**, 309-325 (1975).
- 49) **Oppenheimer, J. H., Silva, E., Schwartz, H. L. & Surks, M. I.** : Stimulation of hepatic mitochondrial  $\alpha$ -glycerophosphate dehydrogenase and malic enzyme by L - triiodothyronine. Characteristics of the response with specific nuclear thyroid hormone binding sites fully saturated. *J. Clin. Invest.*, **59**, 517-527 (1977).
- 50) **Bernal, J., Coleoni, A. H. & DeGroot, L. T.** : Thyroid hormone receptors from liver nuclei : Characteristics of receptor from normal, thyroidectomized and triiodothyronine-treated rats ; measurement of occupied and unoccupied receptors, and chromatin binding of receptors. *Endocrinology*, **103**, 403-413 (1978).
- 51) **Samuels, H. H., Stanley, F. & Shapiro, L. E.** : Dose-dependent depletion of nuclear receptors by L - triiodothyronine : evidence for a role in induction of growth hormone synthesis in cultured GH<sub>1</sub> cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **73**, 3877-3881 (1976).
- 52) **Samuels, H. H., Stanley, F. & Shapiro, L. E.** : Modulation of thyroid hormone nuclear receptor levels by 3, 5, 3' - triiodo - L - thyronine in GH<sub>1</sub> cells. *J. Biol. Chem.*, **252**, 6052-6060 (1977).
- 53) **DeGroot, L. J., Rebertson, M. & Rue, P. A.** : Triiodothyronine receptors during maturation. *Endocrinology*, **100**, 1511-1515 (1977).
- 54) **Schwartz H. L. & Oppenheimer, J. H.** : Ontogenesis of 3, 5, 3' - triiodothyronine receptors in neonatal rat brain : dissociation between receptor concentration and stimulation of oxygen consumption by 3, 5, 3' - triiodothyronine. *Endocrinology*, **103**, 943-948 (1978).
- 55) **Valcana, T. & Timiras, P. S.** : Nuclear triiodothyronine receptors in the developing rat brain. *Mol. Cell. Endocrinol.*, **11**, 31-41 (1978).
- 56) **Dozin-van Roye, B. & de Nayer, Ph.** : Nuclear triiodothyronine receptors in rat brain during maturation. *Brain Res.*, **177**, 551-554 (1979).
- 57) **Dubois, J. D. & Dussault, J. H.** : Ontogenesis of thyroid function in the neonatal rat. Thyroxine ( $T_4$ ) and triiodothyronine ( $T_3$ ) production rates. *Endocrinology*, **101**, 435-441 (1977).
- 58) **Oppenheimer, J. H., Schwartz, H. L. & Surks, M. I.** : Tissue differences in the concentration of

triiodothyronine nuclear binding sites in the rat : liver, kidney, pituitary, heart, brain, spleen and testis. *Endocrinology*, **95**, 897-903 (1974).

**59) Shapiro, S. & Percin, C. J. :** Thyroid hormone induction of  $\alpha$ -glycerophosphate dehydrogenase in rats of different ages. *Endocrinology*, **7**, 1075

-1080 (1966).

**60) Hemon, P. :** Malate dehydrogenase (decarboxylating NADPH) and  $\alpha$ -glycerophosphate oxidase in the developing rat. *Biochem. Biophys. Acta*, **151**, 681-687 (1968).

**Effect of Neonatal Hypothyroidism on Maturation of Nuclear Triiodothyronine (T<sub>3</sub>) Receptors in Developing Rat Brain** Kazumasa Ishiguro, Department of Pediatrics, School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920, Japan. *J. Juzen Med. Soc.*, **89**, 332-343 (1980).

**Abstract** Changes of nuclear T<sub>3</sub> receptors during brain maturation were studied in normal and hypothyroid rats. In normal rats, receptor sites were demonstrated in fetal brain with a receptor concentration of  $0.22 \pm 0.02$  ng T<sub>3</sub>/mg DNA, the same value as measured at 35 days of age. A rapid increase in receptor concentration followed, leading to  $0.35 \pm 0.04$  ng T<sub>3</sub>/mg DNA by the second day after birth. Thereafter, the receptor concentration decreased at the age of 14 days ( $0.25 \pm 0.02$  ng T<sub>3</sub>/mg DNA) and remained at this level till 35 days of age ( $0.25 \pm 0.03$  ng T<sub>3</sub>/mg DNA). In contrast, hypothyroid rats showed the significantly higher concentration than that in the age-matched control group at the age of 14 days ( $0.38 \pm 0.07$  ng T<sub>3</sub>/mg DNA) and maintained this level up to 35 days of age ( $0.37 \pm 0.03$  ng T<sub>3</sub>/mg DNA). The binding affinity was similar in both groups and throughout maturation (mean  $\pm$  SD in normal groups;  $1.9 \pm 0.3 \times 10^{10} \text{M}^{-1}$ , hypothyroid groups;  $1.7 \pm 0.2 \times 10^{10} \text{M}^{-1}$ ). After birth, plasma T<sub>3</sub> concentrations showed reciprocal changes to those in the binding capacity of T<sub>3</sub> receptors. These results indicate that nuclear T<sub>3</sub> receptors in rat brain mature by the age of 14 days, associated with a decrease in binding capacity, and this process seems to be T<sub>3</sub>-dependent so far as postnatal period is concerned. The physiological role of the high concentration of T<sub>3</sub> receptors observed in neonatal and hypothyroid rat brain during development is not yet clear at present.