



Title	サケ科魚類肝におけるピテロゲニンの免疫組織学的局在
Author(s)	布村, 渉; NUNOMURA, Wataru; 原, 彰彦 他
Citation	北海道大學水産學部研究彙報, 34(2), 79-87
Issue Date	1983-06
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/23815
Type	departmental bulletin paper
File Information	34(2)_P79-87.pdf



サケ科魚類肝におけるビテロゲニンの免疫組織学的局在

布 村 渉*・原 彰彦*
高 野 和 則**・平 井 秀 松*

**Immunohistochemical Localization of Vitellogenin
in Hepatic Cells of Some Salmonid Fishes**

Wataru NUNOMURA,* Akihiko HARA,* Kazunori TAKANO**
and Hidematsu HIRAI*

Abstract

There are many morphological and biochemical studies of fish hepatic cells during vitellogenesis or after hormone (especially estrogen) administration. However, there are few studies of this subject using immunohistochemical technique. Information on the localization of vitellogenin (the egg yolk precursor protein) may contribute to the study of fish liver in various physiological and pathological states.

Using the peroxidase-antiperoxidase complex (PAP) method, we observed hepatic synthesis of vitellogenin in three species of Salmonidae: *Salmo gairdneri*, *Oncorhynchus keta* and *Salvelinus leucomaenis*. Immature fish and mature male fish were singly injected with estradiol-17 β . When rabbit antiserum against fish vitellogenin was applied, the hepatic cells of *Salmo gairdneri* and *Oncorhynchus keta* treated with estrogen were stained with the PAP method 11 days after the injection. In ordinary light-microscope preparations, no change in the hepatic cells within 24 hr after estrogen treatment could be seen; however, the PAP method revealed hepatic cells positive for vitellogenin 16 hr and 24 hr after estrogen treatment of *Salvelinus leucomaenis* and *Salmo gairdneri*. No difference in staining of the hepatic cells from the three species was observed. In addition, there is a correlation between serum vitellogenin concentration and the PAP staining of hepatic cells.

機能性蛋白質を始め、種々の抗原を組織上で特異的に可視化することは、形態と機能を対応させ、組織あるいは細胞の機能的構造ならびにその生理学的、病理学的変化を解析する上で有効な研究手段である。このような目的で開発された方法が“酵素抗体法”である。酵素抗体法としては、後で述べるように“標識酵素抗体法”と“非標識酵素抗体法”がある。いずれにせよこれらの方法によれば、パラフィン包埋試料で抗原の検出が可能であり、標本は半永久的に保存することができる。また、通常の光学顕微鏡による観察ばかりでなく、電子顕微鏡的な観察も可能なことから、極めて広い範囲の研究に用いられるようになって来た。既にこれらの方法を用いて、例えばヒト成長ホルモン¹⁾、ACTHレセプター²⁾、ライソザイム³⁾、 α -フェトプロテイン⁴⁾、HBs抗原⁵⁾、SP₁⁶⁾などの組織内局在に関する

* 北海道大学医学部生化学第一講座
(Department of Biochemistry, Hokkaido University School of Medicine)

** 北海道大学水産学部淡水増殖学講座
(Laboratory of Fresh-Water Fish-Culture, Faculty of Fisheries, Hokkaido University)

研究がなされており、病理診断学での応用の途も開けつつある。また、魚類でも脳下垂体における成長ホルモンやプロラクチンの局在に関する報告⁷⁾がなされている。

ビテロゲニン (以下 Vg と略記する) は、成熟期の卵生脊椎動物の雌に特異的に出現する血清蛋白であり、卵黄蛋白の前駆物質である⁸⁾⁻¹⁰⁾。これらの Vg は肝細胞で合成され、通常、雄および未熟の雌には出現しないが、これらにエストロゲンを投与することによって血清中に誘導されることも知られている^{9),10)}。魚類でもこれまで Vg の合成部位が肝臓であることは、卵黄形成過程およびエストロゲン処理に伴う肝臓の形態学的¹¹⁾⁻¹⁹⁾、生理学的変化²⁰⁾⁻²⁴⁾から示唆されているが、これを直接的に証明した例は少ない。本報告では、酵素抗体法 (peroxidase-antiperoxidase complex method: PAP 法) を用いて、エストロゲンを投与したサケ科魚類 3 種の肝臓における Vg の局在性を観察した結果について述べる。

材料と方法

材料: 実験に用いた魚種はニジマス *Salmo gairdneri*, アメマス *Salvelinus leucomaenis*, およびサケ *Oncorhynchus keta* の 3 種である。

ニジマスは市販の活魚で体長約 20 cm の未成熟魚 20 尾、アメマスは池中養殖された体長約 15 cm の未成熟魚 3 尾を用いた。いずれも水温 15±1°C の室内流水水槽に十分に順応させた後、実験に供した。サケは千歳川に溯上した成熟雄 4 尾で、実験中は水温約 8°C の流水池で飼育した。

実験魚には、あらかじめエタノールに溶解し、等量の 0.9% 食塩水で希釈したエストラジオール-17β を、体重 1 kg 当り 1 mg、腹腔内に単一注射した。対照魚にはエストラジオール-17β を含まない 50% エタノール液を注射した。

注射後、随時、魚をピスカインまたは MS-222 で麻酔し、尾部静脈より注射器を用いて採血した。血液は 4°C で一昼夜放置した後、3,000 rpm, 20 分間遠心して血清を分離した。血清は分析時まで -20°C で保存した。これらの試料中の Vg は、1.2% アガロースを支持体とする免疫化学的手法²⁵⁾によって検出した。また、採血した個体からは直ちに肝臓を取り出し、1 辺が 2 mm 以下の組織角片とし、ファン液で 2~3 時間固定した。固定した組織片は 0.1 M リン酸緩衝液 (PBS), pH 7.2 に移し、4°C で 2 日間放置した後、常法に従ってパラフィン (mp 56-58°C) に包埋した。包埋ブロックは切片作製時まで 4°C に保存した。これと併せて、固定法を検討する目的で 20% 中性緩衝ホルマリン、エタノールまたはベンゼンによる固定も行った。

PAP 法: 1. 血清 一次抗体として、成熟雌ニジマス血清から分離精製した Vg を家兎に免疫して得た家兎抗ニジマス Vg 血清、同様にして得た家兎抗アメマス Vg 血清、家兎抗サケ Vg 血清を用いた²⁶⁾。二次抗体の豚抗家兎 IgG 血清および PAP complex は、DAKO 社製品を用いた。二次抗体および PAP complex が非特異的に組織に沈着していないことを確かめるため、一次抗体の代わりに、目的とする抗原に対する抗体活性のない正常家兎血清を用いて反応させた。

2. 緩衝液 0.1 M および 0.01 M PBS, pH 7.2 および 0.05 M トリス塩酸緩衝液, pH 7.77 を作製して用いた。

3. 操作 PAP 法は Sternberger et al.²⁶⁾の方法に準じて行った。概略を以下に示す。1) パラフィン包埋ブロックより厚さ 2 μ の薄切切片を作製し、常法に従って脱パラフィン後、エタノール系列を通し、脱イオン水に 2 分間浸す。2) 0.6% (v/v) の割合で H₂O₂ を含む純メタノールで 10 分間処理し、内因性ペルオキシダーゼの活性を阻止した後、PBS で 3 分間ずつ 3 回洗浄する。3) 10% 正常豚血清 (PBS で希釈) を組織片へ滴下し、10 分間作用させる。4) 余分な血清を軽く拭い、1% 正常豚血清で適宜希釈 (1:10, 1:100, 1:1000) した一次抗体を 30 分間作用させる。PBS で 5 分間ずつ 3 回洗浄する。5) 10% 正常豚血清で 1:40 に希釈した豚抗家兎 IgG 血清を 30 分間作用させる。PBS で 5 分間ずつ 3 回洗浄する。6) 1% 正常豚血清で 1:50 に希釈した PAP complex を 30 分間作用さ

せる。PBS で5分間ずつ3回洗浄した後、トリス塩酸緩衝液に10分間浸す。7) 0.02% (w/v) の 3-3' diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB) を含む 0.03% (v/v) H₂O₂ のトリス塩酸緩衝液で3分間反応させる。流水で30分以上水洗した後、マイヤーヘマトキシリンで核染色を施し、常法に従い脱水封入する。

結果と考察

酵素抗体法の検討

方法の吟味：これまで開発された酵素抗体法は“標識酵素抗体法”と“非標識酵素抗体法”に大別される。このうち標識酵素抗体法は、目的とする抗原物質に対応する特異抗体を作製し、その抗体に化学的に酵素を標識した酵素標識特異抗体を、抗原抗体反応によって組織あるいは細胞内の抗原に結合させた後、標識した酵素を染色することによって抗原の局在性を観察する方法である²⁷⁾。これに対して immunoglobulin-enzyme bridge method (Bridge 法)^{1), 28)}、あるいは peroxidase-antiperoxidase complex method (PAP 法)²⁰⁾と称される非標識酵素抗体法がある。これらはいずれも、あらかじめ抗体に化学的に酵素を標識することをせず、組織切片上で直接、酵素とその酵素に対する抗体を、抗原抗体反応によって結合させる方法である。具体的には、家兎抗 horseradish peroxidase (家兎抗 HRP) 抗体と組織内の抗原と結合した一次抗体 (家兎を免疫して得た抗体) を、家兎以外の動物を免疫して得た抗家兎 IgG (二次抗体) の二つの抗体活性部位で連結し、さらに HRP と抗 HRP 抗体とを抗原抗体反応によって結合させた後、酵素染色する。

以上の方法のいずれも、パラフィン包埋試料による光学顕微鏡的観察に十分応用でき、しかも従来の単なる組織形態学的観察に留まらず、種々の抗原物質を可視化することによって組織あるいは細胞レベルでの機能形態学的研究を可能にする。特に PAP 法は、あらかじめ家兎抗 HRP と HRP の可溶性抗原抗体複合物を作製しておくことによって、その反応系を単純化した点で優れた方法である。さらにこの方法は、標識抗体法に比べて高感度であるところから、微量の抗原でも検出できる利点も有している。

PAP 法施行上の問題点：PAP 法を行うに当たっての最も大きな問題は、抗体の特異性である。用いる抗体が、目的とする抗原のみと特異的に反応することを、免疫化学的に確かめておかなければならない。今回は、寒天免疫電気泳動法によって一次抗体の特異性を確認した上で使用した²⁹⁾。次に問題となる点は、抗原性の保存に及ぼす固定条件の影響である。今回、エストロゲン処理したニジマスの肝組織をブアン液、20% 中性緩衝ホルマリン、エタノールおよびベンゼンの各液で固定した結果では、ブアン液による室温下 2~3 時間の固定が、組織構造および抗原保存の点で最も優れていた。20% 中性緩衝ホルマリンによる室温下 3 時間固定の結果では、抗原性は保存されたものの、組織構造の保持に難点があり、また同液で 4°C 下 15 時間固定した場合には抗原性が失われた。一方、有機溶媒による固定では、おおむね抗原性の保持が悪いのみならず、組織の萎縮を生じた。このような固定条件下での抗原性保存の良否は、Vg が化学的に lipoglycophosphoprotein であることに起因するものと考えられる。鈴木²⁹⁾は、ラット肝におけるラット α -フェトプロテイン、ウマ IgG (抗ラット α -フェトプロテイン) の局在性を観察するにあたり、数種の固定液の抗原性保持効果について検討した結果、Zamboni 液が最良であったと報告している。また、一般に分子量 2~3 万以上の蛋白質抗原は paraformaldehyde、糖蛋白質抗原は periodate-lysine-paraformaldehyde (PLP) による固定で各々良い結果が得られたという。Vg に関してはブアン液で十分に抗原性が保持され、組織構造上の観察にも良い結果が得られたが、さらに上記の各固定剤についても検討する価値があろう。

PAP 法施行上、抗原物質局在の特異性にかかわる重要な問題は、内因性ペルオキシダーゼによる非特異的反応である。一般にパラフィン包埋試料の場合、脱水、透徹、包埋の過程でこの酵素はほとんど不活性化される。しかし、赤血球表面のペルオキシダーゼだけは活性を保ち、このため哺乳動物

では 0.3% (v/v) の過酸化水素水を含むメタノールで 5 分間処理することによって不活性化を図っている³⁰⁾。今回用いたニジマス試料の場合には、この処理によってもなお、一部の赤血球には活性が残ったため、0.6% (v/v) の過酸化水素水を含むメタノールで 10 分間処理することによって不活性化することができた。

魚類の体組織には、様々な色素粒あるいは色素細胞が存在する。肝組織の場合も同様で、これらの色素は DAB 反応産物とその色調が類似しているため、しばしば弁別上の妨げになる。これらの妨害物を化学的に除去することは不可能であり、従って試料は極力薄切して、視野内に含まれる色素粒または色素細胞の数を少なくすることが望ましい。

本法で使用了した DAB は発癌性物質であるので、その取り扱いには十分な注意が必要である。最近 DAB の代わりに 3-amino-9-ethylcarbrazol (AEC) が用いられるようになった。今回、一部の組織についてこの AEC による染色を試みた結果では、染色性に関する限り DAB と大きな差はなく、十分に使用可能であると思われた。ただし AEC 反応産物は有機溶媒に溶けるため、標本の封入にはゼラチングリセリンなど水溶性封入剤を用いる必要がある。なお、PAP 操作中は組織片を乾燥させないように注意を要する。特に血清による反応中に乾燥すると、血清成分が組織に非特異的に沈着し、洗浄によってもこれを除去することはできない。従って、操作中は標本を常に湿潤箱に入れておくよう留意する必要がある。

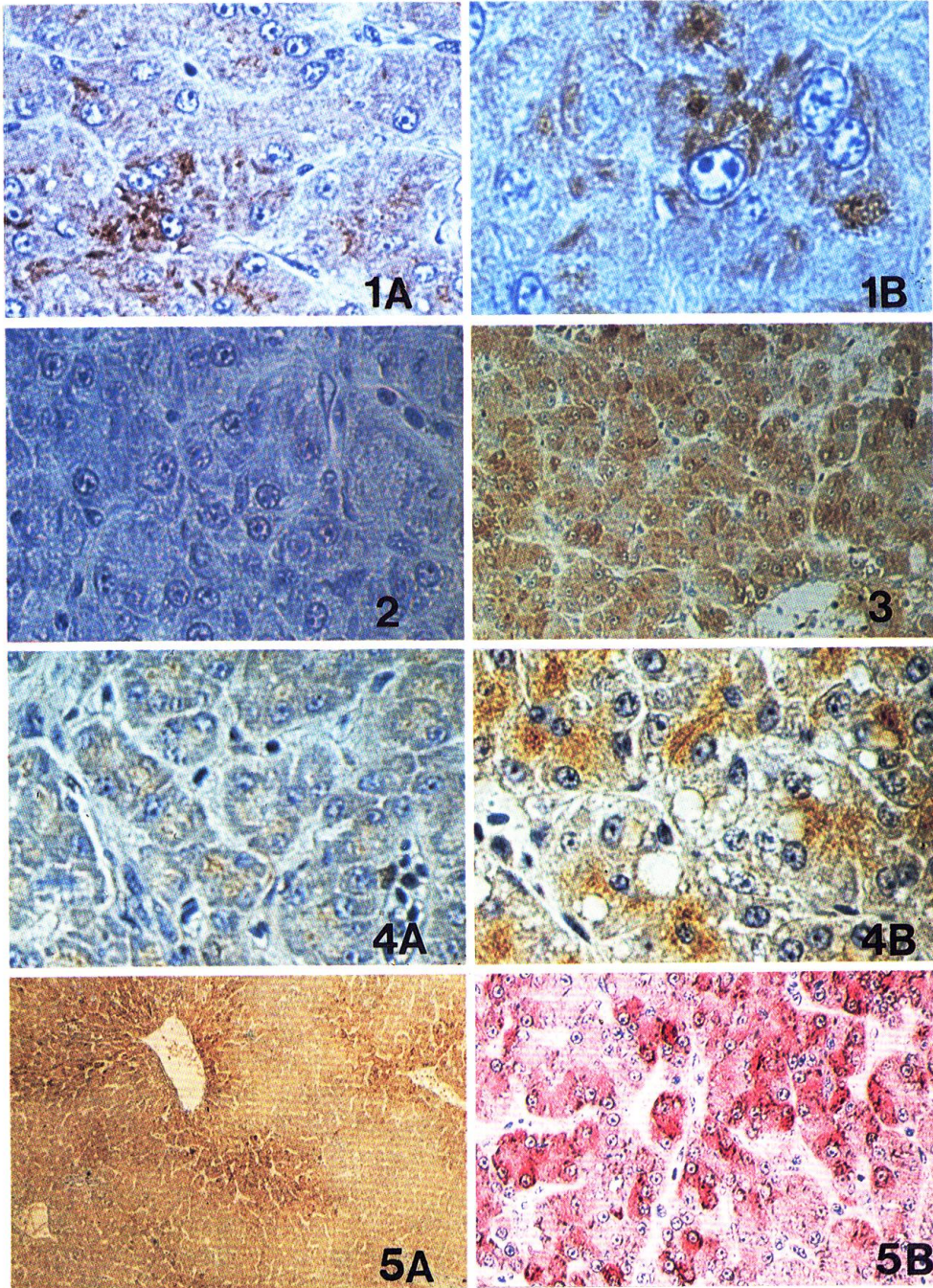
Vg の局在

魚類におけるエストロゲン処理後の比較的短時間における血中 Vg 量の動態については、すでに *Gadus morhua*³¹⁾、ニジマス *Salmo gairdneri*³²⁾、*Heteropneustes fossilis*³³⁾ で報告されている。著者らも先にニジマスで、エストロゲンの単一処理では 7~12 日後に血中 Vg 量が最高値に達する事を報告した³⁴⁾。本研究でもエストロゲン処理後 11 日目のニジマスおよびサケ血清中に Vg が出現してい

Table 1. Localization of vitellogenin in various organs of rainbow trout 11 days following estradiol-17 β treatment.

Organ	Staining
Thymus	-
Kidney	-
Spleen	-
Heart	-
Gall bladder	-
Liver	+
Stomach	-
Pyloric caecum	-
Intestine	-
Brain	-
Muscle	-

- Fig. 1. (A) Photomicrograph of liver cells of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) 11 days after injection of estradiol-17 β . $\times 460$. (B) Higher magnification of Fig. 1A. $\times 840$.
 Fig. 2. Photomicrograph of liver cells of control rainbow trout. $\times 460$.
 Fig. 3. Photomicrograph of liver cells of mature male chum salmon (*Oncorhynchus keta*) 11 days after injection of estradiol-17 β . $\times 240$.
 Fig. 4. Photomicrograph of liver cells of rainbow trout injected 24 (A) and 48 hr (B) after injection of estradiol-17 β . $\times 460$.
 Fig. 5. Photomicrograph of liver cells of white spotted char (*Salvelinus leucomaenis*) 16 hr after injection of estradiol-17 β . Staining with DAB (A) $\times 52$ and AEC (B) $\times 240$.



ることを Ouchterlony 法によって確認した。これらのうち、処理後 11 日目のニジマス肝の PAP 法による組織像を図 1A に示す。肝細胞のほとんどに茶褐色の染色が観察され、Vg の局在性が認められた。さらに強拡大像では、核および細胞膜は染色されず、細胞質内のみが不均一に染色されていることが観察された(図 1B)。一方、同時に処理した肝組織以外の循環系、消化系、神経系の各組織は全く染色されず(表 1)、また、対照に用いた無処理魚の肝組織にも染色は全く認められなかった(図 2)。成熟雄サケにエストロゲン処理を行い、11 日後に採取した肝組織においても、ニジマスの場合と同様、肝細胞質のみに染色を認めた(図 3)。これらの肝組織の HE 染色による観察結果では、肝細胞の細胞質が塩基性色素に強く染まり、核内には濃染する仁が 1~2 個認められた。また、無処理魚に比べると、処理魚では一般に肝細胞が肥大し、核も大きくなっていった。これらの特徴は、先の石井ら¹⁶⁾の成熟雌ヒメマス、Aida et al.¹⁷⁾のエストロゲン処理アユでの観察結果とよく一致した。

次にエストロゲン処理後、比較的短時間における肝組織の変化について述べる。エストロゲン投与後 24 時間および 48 時間に採取したニジマスの血中 Vg 量は、それぞれ 343 $\mu\text{g/ml}$ 、475 $\mu\text{g/ml}$ であった。これらの各個体の肝組織を通常の染色方法で観察しても、目立った違いを認めることはできなかった。しかし PAP 法によれば、図 4 に示すように 24 時間後で既に肝細胞の染色反応が認められ、さらに 48 時間後にはこの染色反応を示す範囲が広がると共に、その強さも増した。これらの結果は同一個体による観察ではないことから、厳密な経時的変化とは言えないが、通常の染色方法では観察し得ない肝細胞の Vg 産生能の経時的変化を、PAP 法によつて的確に捉えることができる可能性を示している。

アメマスにおけるエストロゲン処理後 16 時間の、PAP 法による肝組織像を図 5 に示す。この結果は、処理後ニジマスの場合よりさらに短時間で肝細胞に染色反応が観察されること、特に血管類洞付近の細胞に斑状に Vg 局在が認められ、また、各細胞による染色性の差が著しいことを示している。これらの事実は、腹腔内へ投与されたエストロゲンが血流を介して肝組織へ運ばれた結果、血管付近の細胞がより早くエストロゲンの刺激を受けて Vg を産生する経過を示唆している。図 5B には同一標本の AEC による染色像を示した。

これまで、魚類の肝臓における卵黄蛋白または Vg の産生に関しては、電気泳動法および免疫化学的方法による研究結果がいくつか報告されている。Plack & Fraser³⁵⁾は *Gadus morhua* において、成熟雌魚とエストロゲン処理魚から採取した肝薄片を培養し、抗卵黄蛋白血清を用いて ¹⁴C-leucine の取り込みを確かめている。また、Amirante³⁶⁾は産卵期のニジマス雌の肝抽出液中に抗 lipovitellin 血清と反応する抗原の存在を認め、さらに蛍光抗体法を用いて肝臓における lipovitellin 合成を観察している。Shackley & King³⁷⁾も産卵期の *Blennius pholis* の肝抽出液と血清の両方に卵黄蛋白前駆物質が存在することを免疫学的方法によって確認している。さらに Le Menn³⁸⁾は *Gobius niger* の卵黄形成期に、肝、卵黄抽出液および血清中に、新たな 2 つの蛋白が出現することを免疫電気泳動法によって示している。近年、Roach & Davis³⁹⁾もエストロゲン処理した *Ameiurus nebulosus* の肝に、新たな mRNA が出現することを認め、さらに無細胞系培養により、抗 lipovitellin 血清によって沈澱する血中 Vg と同じ分子量を有する蛋白が合成され得ることを報告している。一方、Bohemen et al.⁴⁰⁾はポリアクリルアミドゲル電気泳動法を用い、ニジマスの成熟に関連して、その血漿成分と肝組織の周年変化を観察した結果、血中に Vg が検出されても肝臓からはこれを見出せない場合があることを示している。

以上のように、これまでの研究結果は魚類の肝組織における Vg 合成を、免疫学的手法を用いることによって直接的に検出できることを示している。今回の研究で試みたように、PAP 法を用いれば、例えばエストロゲン処理後 16 時間の結果に見られるように、通常の組織学的観察では捉え得ない Vg 合成活性化の始動段階においても、これを鋭敏に検出できることが証明された。さらにこの方法は、肝臓における Vg 合成能を直接、組織像と対応させることができる点で、機能形態学的な解明を深め

る上で極めて有効な手段になると思われる。本研究で確立した PAP 法のフローチャートは、今後魚類の肝臓における Vg 合成機構の研究のみならず、卵母細胞への卵黄蛋白の取り込み過程など、卵巣レベルでの卵黄形成機構の解明にも十分活用できよう。

要 約

サケ科魚類、ニジマス *Salmo gairdneri*, アメマス *Salvelinus leucomaenis*, およびサケ *Oncorhynchus keta* の 3 種を材料に、酵素抗体法 (peroxidase-antiperoxidase complex method: PAP 法) を用いて、エストロゲン処理によって誘導されるビテロゲン (Vg) の肝臓における局在性を観察した。

観察に先立って、Vg 検出のための本法施行上の問題を吟味し、フローチャートを作成した。これに従って上記 3 魚種で実験した結果、エストラジオール-17 β 投与によって血清中に Vg が誘導された個体では、いずれもその肝細胞に Vg の局在が確認され、特に処理後、通常の組織学的観察では捉え得ない Vg 合成活性化の始動段階においても、これを鋭敏に検出できることが証明された。

謝 辞

本実験を行うにあたり、PAP 法に関し御指導、御助言を賜った札幌医科大学伝法公磨博士に深謝する。また、実験魚を提供していただいた北海道さけますふ化場広井修博士および北海道大学薬学部実吉峯郎博士に厚く御礼申し上げる。また英文の御校閲をいただいたカリフォルニア大学バークレー校ハワード・バーン教授に深く謝意を表す。なお本研究の一部は文部省科学研究費補助金 (No. 57560174) によってなされた。

文 献

- 1) Manson, T.E., Phifer, S.S., Swallow, R.A. & Dreskin, R.B. (1969). An immunoglobulin-enzyme bridge method for localizing tissue antigens. *J. Histochem. Cytochem.* **17**, 563-569.
- 2) Sternberger, L.A. & Petrali, J.P. (1974). Hormone receptors: Light and electron immunocytochemical localization of the target cell receptors for adrenocorticotropin (ACTH) and luteinizing hormone releasing hormone (LH-RH). *J. Histochem. Cytochem.* **22**, 296.
- 3) Klockars, M. & Osserman, E.F. (1974). Localization of lysozyme in normal rat tissues by an immunoperoxidase method. *J. Histochem. Cytochem.* **22**, 139-146.
- 4) Kurman, R.J. & Norris, H.J. (1976). Immunoenzyme histochemical identification of α -fetoprotein and chorionic gonadotropin in the delineation of two forms of "embryonal carcinoma" of the ovary. *Lab. Invest.* **34**, 323.
- 5) Afroudakis, A.P., Leiw, C.-T. & Peters, R.L. (1976). An immunoperoxidase technic for the demonstration of the hepatitis B surface antigen in human livers. *Am. J. Clin. Pathol.* **65**, 533-539.
- 6) Horne, C.H.W., Pugh-Humphreys, R.G.P. & Bremner, R.D. (1979). Practical and theoretical considerations in the detection and measurement of immunoreactive pregnancy-specific β_1 -glycoprotein (SP₁) in tumours. p. 301-311. In Lehmann, F.-G. (ed.), *Carcino-Embryonic Protein*, Vol. I. 557 p. Elsevier, North-Holland.
- 7) Nagahama, Y., Olivereau, M., Farmer, S.W., Nishioka, R.S. & Bern H.A. (1981). Immunocytochemical identification of the prolactin- and growth hormone-secreting cells in the teleost pituitary with antisera to Tilapia prolactin and growth hormone. *Gen. Comp. Endocrinol.* **44**, 389-395.
- 8) Wallace, R.A. (1978). Oocyte growth in nonmammalian vertebrates. p. 469-502. In Jones, R.E. (ed.), *The Vertebrate Ovary*. 853 p. Plenum, New York and London.

- 9) 大野孝司 (1979). 卵黄タンパク質遺伝子のエストロゲンによる発現調節. 蛋白質核酸酵素 **44**, 1227-1238.
- 10) Wallace, R.A. & Selman, K. (1981) Cellular and dynamic aspects of oocyte growth in teleosts. *Amer. Zool.* **21**, 325-343.
- 11) Kobayashi, H. (1953). Effects of estrogen upon the structure, weight and fat content of the liver in the fish, *Misgurnus anguillicaudatus*. *Annot. Zool. Japon.* **26**, 213-216.
- 12) Egami, N. (1955). Effect of estrogen and androgen on the weight and structure of the liver of the fish, *Oryzias latipes*. *Annot. Zool. Japon.* **28**, 79-85.
- 13) Oguro, C. (1956). Some observations on the effect of estrogen upon the liver of the three spined stickleback, *Gasterosteus aculeatus aculeatus* L. *Annot. Zool. Japon.* **29**, 19-23.
- 14) Peute, J., van der Gaag, M.A. & Lambert, J.G.D. (1978). Ultrastructure and lipid content of the liver of the zebrafish, *Brachydanio rerio*, related to vitellogenin synthesis. *Cell. Tiss. Res.* **186**, 297-308.
- 15) Hori, S.H., Kodama, T. & Tanahashi, K. (1979). Induction of vitellogenin synthesis in goldfish by massive doses of androgens. *Gen. Comp. Endocrinol.* **37**, 306-320.
- 16) Ishii, K. & Yamamoto, K. (1970). Sexual differences of the liver cells in the goldfish, *Carassius auratus* L. *Bull. Fac. Fish. Hokkaido Univ.* **21**, 161-167.
- 17) Aida, K., Hirose, K., Yokote, M. & Hibiya, T. (1973). Physiological studies on gonadal maturation of fishes. II. Histological changes in the liver cells of ayu following gonadal maturation and estrogen administration. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.* **39**, 1107-1115.
- 18) 高島葉二・高野和則・原 彰彦 (1979). 人為催熟ウナギ (*Anquilla japonica*) 雌の成熟に伴う雌特異血清蛋白の変動. 北大水産彙報 **30**, 50-61.
- 19) 寺西哲夫・原 彰彦・高橋裕哉 (1981). ドジョウ *Misgurnus anguillicaudatus* の生殖周期に伴うピテロジェニンの変動. 北大水産彙報 **32**, 281-292.
- 20) Aida, K., Nagan, P.V. & Hibiya, T. (1973). Physiological studies on gonadal maturation of fishes. I. Sexual differences in composition of plasma protein of ayu in relation to gonadal maturation. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.* **39**, 1091-1106.
- 21) Emmersen, B.K. & Petersen, I.M. (1976). Natural occurrence and experimental induction by estradiol-17 β , of a lipophosphoprotein (vitellogenin) in flounder (*Platichthys flesus* L.). *Comp. Biochem. Physiol.* **54B**, 443-446.
- 22) Campbell, C.M. & Idler, D.R. (1976). Hormonal control of vitellogenesis in hypophysectomized winter flounder (*Pseudopleuronectes americanus* Walbaum). *Gen. Comp. Endocrinol.* **28**, 143-150.
- 23) Emmersen, B.K. & Emmersen, J. (1976). Protein, RNA and DNA metabolism in relation to ovarian vitellogenic growth in the flounders (*Platichthys flesus* L.). *Comp. Biochem. Physiol.* **55B**, 315-321.
- 24) Emmersen, J., Korsgaard, B. & Petersen, I. (1979). Dose response kinetics of serum vitellogenin, liver DNA, RNA, protein and lipid after induction by estradiol-17 β in male flounders (*Platichthys flesus* L.). *Comp. Biochem. Physiol.* **63B**, 1-6.
- 25) Hara, A. & Hirai, H. (1978). Comparative studies on immunochemical properties of female-specific serum protein and egg yolk proteins in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Comp. Biochem. Physiol.* **59B**, 339-343.
- 26) Sternberger, L.A., Handy, P.H. Jr., Cuculis, J.J. & Meyer, H.G. (1970). The unlabeled antibody enzyme method of immunohistochemistry. Preparation and properties of soluble antigen-antibody complex (Horseradish peroxidase-antihorseradish peroxidase) and its use in identification of spirochetes. *J. Histochem. Cytochem.* **18**, 315-333.
- 27) Nakane, P.K. & Pierce, B. (1967). Enzyme-labeled antibodies for the light and electron microscopic localization of tissue antigens. *J. Cell. Biol.* **33**, 307-318.
- 28) 山下清章・岩本俊之 (1977). Immunglobulin-enzyme bridge method -フォルマリン固定パラフィン包埋組織片における抗原の証明法. 医学のあゆみ **103**, 224-229.
- 29) 鈴木裕二 (1980). α -fetoprotein に関する研究 (V). 3'-Me-DAB ラット肝癌に対する抗 AFP

- 抗体投与の効果。—その免疫組織学的検討— 肝臓 **21**, 1637-1646.
- 30) Streefkerk, J.G. (1971). Inhibition of erythrocytes pseudoperoxidase activity treatment with hydrogen peroxidase following methanol. *J. Histochem. Cytochem.* **20**, 829-831.
 - 31) Plack, P.A., Pritchard, D.J. & Fraser, N.W. (1971). Egg proteins in cod serum. Natural occurrence and induction by injections of oestradiol 3-benzoate. *Biochem. J.* **121**, 847-856.
 - 32) Campbell, C.M. & Idler, D.R. (1980). Characterization of an estradiol-induced protein from rainbow trout serum as vitellogenin by the composition and radioimmunological cross reactivity to ovarian yolk fractions. *Biol. Reprod.* **22**, 605-617.
 - 33) Sundararaj, B.I. & Nath, P. (1981). Steroid-induced synthesis of vitellogenin in the catfish, *Heteropneustes fossilis* (Bloch). *Gen. Comp. Endocrinol.* **43**, 201-210.
 - 34) Hara, A. (1980). Studies on female-specific serum proteins (vitellogenin) and egg yolk proteins in teleosts: immunochemical, physicochemical and structural studies. Ph. D. thesis, Hokkaido University, Japan.
 - 35) Plack, P.A. & Fraser, N.W. (1971). Incorporation of L-[¹⁴C] leucine into egg proteins by liver slices from cod. *Biochem. J.* **121**, 857-862.
 - 36) Amirante, G.A. (1972). Immunochemical studies on rainbow trout lipovitellin. *Acta Embryol. Morph. exp. Suppl.* 373-383.
 - 37) Shackley, S.E. & King, P.E. (1978). Protein yolk synthesis in *Blennius pholis* L. *J. Fish. Biol.* **13**, 179-193.
 - 38) Le Menn, F. (1979). Some aspects of vitellogenesis in a teleostean fish: *Gobius niger* L., *Comp. Biochem. Physiol.* **62A**, 495-500.
 - 39) Roach, A.H. & Davies, P.L. (1980). Catfish vitellogenin and its messenger RNA are smaller than their chicken and *Xenopus* counterparts. *Biochemi. Biophysica. Acta.* **610**, 400-412.
 - 40) van Bohemen, Ch. G., Lambert, J.G.D. & Peute, J. (1981). Annual changes in the plasma and liver in relation to vitellogenesis in the female rainbow trout, *Salmo gairdneri*. *Gen. Comp. Endocrinol.* **44**, 94-107.