ラット培養甲状腺細胞のチミジン取り込みに及ぼす メチマゾールの直接効果

埼玉医科大学第四内科学教室

(指導: 石井淳教授)

ト 部 理 之

The Study of Direct Effect of Methimazole on Thymidine Incorporation in FRTL-5 Cells

Michiyuki URABE

The Fourth Department of Internal Medicine, Saitama Medical School,

Saitama, Japan

(Director: Prof. Jun Ishii)

During the course of treatment of Graves' disease with the anti-thyroid drug, methimazole (MMI), a decrease in a patient's goiter size is sometimes observed. Using rat thyroid cell strain, FRTL-5, the direct effect of MMI on thyroid cell growth was investigated.

FRTL-5 cells (2×10^5) were cultured for 48 hours with TSH, $(\text{Bu})_2\text{cAMP}$ or forskolin in the presence of $[^3\text{H}]$ -thymidine. All three stimulators increased cell growth, expressed as $[^3\text{H}]$ -thymidine incorporation into DNA in a dose-dependent fashion. When FRTL-5 cells were cultured for 48 hours in the presence of MMI at $10^{-6} \sim 10^{-3}\text{M}$ with these stimulators (TSH $250\mu\text{U/ml}$, $(\text{Bu})_2\text{cAMP}$ 10^{-3}M , forskolin 10^{-5}M), $[^3\text{H}]$ -thymidine incorporation was suppressed in dose-dependent fashions (MMI $10^{-5}\text{M} \sim 10^{-3}\text{M}$).

From the present study, it is suggested that methimazole directly modulates thyroid cell growth induced by thyroid growth stimulators which are involved in adenylate cyclase-cyclic AMP system and that the site of its action exists beyond cAMP production.

緒 言

現在, メチマゾール (MMI) は, 抗甲状腺剤として広く使用されているが, その作用機序は完全に解明されたとはいえない。特に甲状腺細胞増殖に対する MMI の効果としてはその甲状腺ホルモン合成抑制による血中 TSH 上昇を介しての goitrogen としての作用¹⁾⁶⁾が考えられているにすぎない。MMI によるグレーブス病治療中, 甲状腺腫の縮少が認められることがよく観察される⁹⁾。筆者は, この事実より, 抗甲状腺剤自体における直接的な甲状腺細胞増殖抑制効果の存在を考え, 以下の検討を行った。即ち, ラット甲状腺培養細胞系 FRTL-5 を用い, TSH, $(\text{Bu})_2\text{cAMP}$ および forskolin 等, adenylate cyclase-cAMP 細胞情報伝達系に関与する刺激物質による細胞増殖を確認した上で, それらの増殖効果に MMI がどのような影響を与えうるかを検討した。

材料および方法

1) ラット甲状腺培養細胞, FRTL-5の培養

今回の実験においては, Fischer 系ラット甲状腺培養細胞株である FRTL-5細胞 (ATCC No. CRL1468) を用いた。FRTL-5細胞は, 通常25cm² culture bottle (Nunc) 中で37°C, 95% air, 5% CO₂ の条件下にて単層培養を行った。培養液としては, 5% fetal bovine serum (FBS) (Hyclone) および細胞の成長に必要な6つのホルモン, 即ち TSH 1mU/ml, hydrocortisone 10nM/ml, transferrin 5μg/ml, glycyl-L-histidyl-L-lysine acetate 10ng/ml, somatostatin 10ng/ml (Sigma) insulin 10μg/ml (Novo) および tobramycin 40μg/ml (Shionogi) を含む Coon's modified Ham's F12培地 (Flow lab.) を用いた (6H 培地)。各々の実験に際しては, FRTL-5細胞2×10⁵個を12 wellplate (Costar) の各 well にまき, 6H 培地2ml にて24~48時間培養した。上清を除去後, Ham'sF12単独培地にて1回洗浄後, 上清を TSH を含まない5H+0.5% FBS (5H 培地) 2ml に変換した。

5H 培地にて24あるいは48時間培養 (preincubation time) 後, 各種甲状腺刺激物質を含む5H 培地に上清を変更した。

2) [³H] -thymidine incorporation 測定および DNA 測定

上清を5H 培地より各種甲状腺刺激物質を含む5H 培地2ml に変更, 同時に [6-³H] -thymidine, 2μCi (NEN) を含む5H 培地40μl を添加し, 24あるいは48時間培養 (incubation time) を行った。DNA 測定および [6-³H] -thymidine incorporation 測定は, Valente らの方法²⁹⁾に若干の変更を加え行った。ディスパーゼ処理により細胞をプラスチック試験管に移し, PBS 3 ml にて2回洗浄後, 冷却した5% trichloroacetic acid 3 ml を加え攪拌, 10分間4°Cにて放置した。その後, 3000rpm にて10分間遠心を行い, 得られた沈査に蒸留水1ml および Burton's solution (氷酢酸100ml に di-phenylamine1.5g を溶解, 硫酸1.5ml および0.16% acetaldehyde 溶液500μl を添加) 2.5ml を加え, よく攪拌した。30°Cにて20時間放置後, 分光光度計600nm の波長で DNA を測定し, [³H] -thymidine incorporation は Burton 溶液1ml をシンチレータ10ml に溶解し, 液体シンチレーションカウンターにて測定した。

得られたデータの統計学的処理は Student's t test にて行った。

実験結果

1) TSH の [³H] -thymidine incorporation への影響 (Fig. 1,2)

FRTL-5細胞増殖の指標として [³H] -thymidine incorporation を測定した。前述のように6H で48時間, 5H にて48時間培養後, TSH (10~1000μU/ml) を含む5H 培地に変換, 48時間後に [³H] -thymidine incorporation を測定した。Fig. 1に示すように TSH50μU/ml より濃度依存性に [³H] thymidine incorporation の増加を認めた。さらに Fig. 2に示すように TSH に関して, 5H 培地での preincubation time の影響をみると, この時間が24時間から48, 72時間へと長くなると, その後の TSH 再添加刺激 (incubation time) が短い24時間の群で [³H] -thymidine incorporation の低下が認められた。しかし TSH 再添加刺激 (incubation time) が48時間の群では, 5H の preincubation time を延長したことによる [³H] -thymidine incorporation の低下は消失した。

2) (Bu)₂cAMP および forskolin の [³H] -thymidine incorporation への影響 (Fig. 3,4)

TSH 添加群と同様の条件にて, (Bu)₂cAMP10⁻⁵~10⁻³M, forskolin10⁻⁶~10⁻⁴M の各々の濃度で培養を行った。Fig3,4に示すように (Bu)₂cAMP では10⁻⁴M より, forskolin では10⁻⁶M よ

Fig. 1. Effect of TSH on [^3H]-Thymidine Incorporation in FRTL-5 cells in 48 hours

After 48 hours of preincubation with 5H medium, FRTL-5 cells were incubated with TSH 0~1000 $\mu\text{U/ml}$ in the 5H medium, as indicated in text, for 48 hours with [^3H]-thymidine, 2 $\mu\text{Ci/well}$. The data are mean $\pm$ SEM of quadruplicate determinations.

Fig. 2. Influence of Preincubation time on [^3H]-Thymidine Incorporation in FRTL-5 cells Induced by TSH

FRTL-5 cells plated in duplicate wells were deprived of TSH for 24, 48 or 72 hours (preincubation) before the addition of TSH 250 $\mu\text{U/ml}$ plus MMI 10⁻³ M and [^3H]-thymidine, 2 $\mu\text{Ci/well}$. Then each group of cells were incubated for 24 or 48 hours (incubation). Each basal value of percentage is different from each group. The data were mean of duplicated determinations.

Fig. 3. Effect of (Bu)₂cAMP on [³H]-Thymidine Incorporation in FRTL-5 cells in 48 hours
After 48 hours preincubation with 5H medium, medium were switched to 5H medium containing (Bu)₂cAMP 0~10⁻³M with [⁶⁻³H]-thymidine. Cells were cultured for 48 hours.

Fig. 4. Effect of Forskolin on [³H]-Thymidine Incorporation in FRTL-5 cells in 48 hours
FRTL-5 cells were cultured with forskolin 0~10⁻⁴M in the 5H medium with [⁶⁻³H]-thymidine after 48 hours preincubation with 5H medium.

り, コントロールと比較して明かな増殖刺激効果を認めた。なお, $(\text{Bu})_2\text{cAMP} 10^{-3}\text{M}$, forskolin 10^{-5}M の濃度にて, ほぼ同等の増殖刺激効果が得られたため, 以後の実験においては, これらの濃度を使用した。

3) TSH 刺激による $[^3\text{H}]$ -thymidine incorporation に対する MMI の効果 (Fig. 5)

6H にて48時間, 5H にて48時間培養後, TSH $250\mu\text{U/ml}$ に MMI (Herbrand) を $10^{-3}\sim 10^{-6}\text{M}$ で加えた6H 培地に変換し, 48時間後に $[^3\text{H}]$ -thymidine incorporation を測定した。MMI $10^{-3}\sim 10^{-5}\text{M}$ 添加群で濃度依存性の増殖抑制効果が認められた (Fig. 5)。

データとしては示していないが, より高濃度の TSH ($500\mu\text{U/ml}$, $1000\mu\text{U/ml}$) 添加群において MMI 10^{-3}M を加えても, MMI の増殖抑制効果は認められなかった。また MMI の増殖抑制効果に対して Preincubation time および incubation time の影響は認められなかった (Fig. 2)。

4) $(\text{Bu})_2\text{cAMP}$ および forskolin により誘導される $[^3\text{H}]$ -thymidine incorporation に対する MMI の効果 (Fig. 6, 7)。

前述の条件と同条件で培養後, $(\text{Bu})_2\text{cAMP} 10^{-3}\text{M} + \text{MMI} 10^{-3}\sim 10^{-6}\text{M}$ あるいはforskolin $10^{-5}\text{M} + \text{MMI} 10^{-3}\sim 10^{-6}\text{M}$ 各々を含む培地に変換, 48時間後に $[^3\text{H}]$ -thymidine incorporation を測定した。 $(\text{Bu})_2\text{cAMP} + \text{MMI}$ 添加群では, MMI $10^{-3}\sim \text{MMI} 10^{-5}\text{M}$ の濃度で, forskolin + MMI 添加群では MMI $10^{-3}\text{M} \sim \text{MMI} 10^{-4}\text{M}$ の濃度で増殖抑制効果が認められた (Fig. 6, 7)。

Fig. 5. Effect of MMI on TSH Induced $[^3\text{H}]$ -Thymidine Incorporation in FRTL-5 cells in 48 hours

After 48 hours preincubation with 5H medium, FRTL-5 cells were incubated with MMI $0\sim 10^{-3}\text{M}$ in the 5H medium containing TSH $250\mu\text{U/ml}$. $[^3\text{H}]$ -thymidine, $2\mu\text{Ci/well}$ were added from the beginning of second incubation. The data were mean + SEM of quadruplicate determinations.

Fig. 6. Effect of MMI on (Bu)₂cAMP induced [³H]-Thymidine Incorporation in FRTL-5 cells in 48 hours

FRTL-5 cells were grown for 48 hours with (Bu)₂cAMP 10⁻³ M + MMI 10⁻³ M~10⁻⁶ M in the presence of [6-³H]-thymidine, 2μCi/well.

Fig. 7. Effect of MMI on forskolin induced [³H]-Thymidine Incorporation in FRTL-5 cells in 48 hours

FRTL-5 cells were grown for 48 hours with forskolin 10⁻⁵ M + MMI 10⁻³ M~10⁻⁵ M in the presence of [6-³H]-thymidine, 2μCi/well.

考 察

現在, FRTL-5細胞は, 正常甲状腺の機能, 例えばサイログロブリン合成, ヨード取り込み等を保ち, その増殖は TSH 依存性であることから甲状腺細胞における増殖機構を解明する上で適当な培養細胞系と考えられている³⁾。しかしその細胞増殖の機構並びに TSH 効果の機序は, 現在不明な点が多い。TSH は adenylate cyclase 系の活性化による cAMP 上昇を介して甲状腺細胞増殖を誘導するという報告がある一方¹⁰⁾¹³⁾¹⁷⁾²⁸⁾, TSH がそのレセプターの異なる領域あるいは, 他の伝達系を介して細胞増殖を誘導するという報告²⁹⁾もあり, 一致した見解は得られていない。今回の実験成績では, TSH は $50\mu\text{U/ml}$ より濃度依存性に細胞増殖促進効果を示し, 同様に cAMP の analogue である (Bu)₂cAMP 添加によっても増殖促進効果がみられた。また今回筆者は adenylate cyclase 系に直接作用し cAMP の上昇を起こすと考えられている forskolin⁷⁾²⁶⁾ による細胞増殖効果の検討も行い, 10^{-6}M より濃度依存性に増殖効果を認めた。これらの成績は, 細胞増殖が adenylate cyclase 系の活性化による細胞内 cAMP の上昇により促進されることを示すとともに, TSH が cAMP を上昇させることから, TSH の細胞増殖促進効果の一部は adenylate cyclase-cAMP 系を介するという説³²⁾を支持するものと考えられる。

甲状腺細胞の増殖に関しては, TSH を介する adenylate cyclase 系の関与以外にもいくつかの系の存在が示唆されている。Eggo らは ovine の thyroid の primary culture において EGF は細胞増殖を刺激するが FRTL-5細胞においてはその刺激効果が存在せず, 理由として FRTL-5細胞における EGF receptor の欠如による可能性を挙げている¹⁴⁾。一方, 発癌プロモーターである TPA の添加によっても甲状腺細胞増殖が誘導されるという報告⁵⁾¹⁴⁾もある。TPA の作用発現は second-messenger としての Ca^{2+} -リン脂質依存性のプロテインキナーゼ C を介すると考えられており¹⁸⁾³¹⁾, 甲状腺細胞増殖に関してもこの系の関与が考えられている²⁾¹⁴⁾。今回筆者は, FRTL-5細胞増殖に関してこれら EGF, TPA の作用の検討も行い, データは示さなかったが, EGF 0.1ng/ml ~ 10ng/ml および TPA 10^{-10}M ~ 10^{-6}M 添加によっては明かな細胞増殖効果は認められなかった。EGF に関しては前述の Eggo らの報告と我々の結果は一致しているが, TPA 添加により細胞増殖が誘導されなかったことは, 単に用いた FRTL-5細胞の違いによるものなのか否かは明かではない。

抗甲状腺剤, 特に今回実験に用いられたメチマゾール (MMI) は, 現在までにその作用としてヨード有機化の阻害²⁰⁾, サイログロブリンのヨード結合阻害によるホルモン合成阻害⁶⁾²⁴⁾²⁷⁾, ヨードチロシンのカップリング抑制¹⁵⁾, サイログロブリン合成抑制²³⁾およびその分子構造への影響²⁵⁾などが考えられている。また最近ではその免疫系への効果, すなわち甲状腺自己抗体産生の抑制²²⁾, グレーブス病において低下したサブレッサー T 細胞機能の改善など⁴⁾¹⁶⁾が報告されている。さらに, MMI は, 生体内では甲状腺ホルモン合成抑制による血中 TSH 上昇を介していわゆる goitrogen として作用する。しかし MMI によるグレーブス病治療中, 甲状腺腫が明かに縮小することがあり, これが寛解へ向かうよい sign であると言われている⁹⁾。甲状腺腫自体の大きさは濾胞腔の大きさ, 結合組織, 脈管系の発達, 濾胞上皮細胞の増殖などいくつかの因子により規定されているが, 甲状腺細胞の増殖に限ってみると, 近年, グレーブス病における甲状腺腫の発現に関して TSH レセプターを介して甲状腺細胞増殖を刺激する自己抗体 (TGI) の存在が注目されている¹¹⁾¹²⁾。Valente らは, FRTL-5細胞を用いてその検討を行った結果, 未治療グレーブス病患者の85%にその存在を認めたが, 抗甲状腺剤治療にて寛解に至った患者においてはこの増殖刺激活性を認めなかったと報告している³⁰⁾。抗甲状腺剤治療中, 寛解に至った患者で TGI 活性が認められなくなることは, TGI 活性の

低下が治療中における甲状腺腫縮小の一つの因子と考えられる。

今回筆者は、グレーブス病治療経過中における甲状腺腫縮小に関して TGI 活性の低下または、消失以外の因子として抗甲状腺剤自体における細胞増殖抑制効果の存在を考え、MMI 添加により、FRTL-5細胞増殖がどのように修飾されるかを検討した。結果として TSH250 μ U/ml にて誘導される細胞増殖は、MMI10⁻³~10⁻⁵M の濃度で抑制され MMI が甲状腺細胞増殖に関して、直接的に抑制作用を有する可能性が示唆された。また (Bu)₂cAMP および forskolin による細胞増殖においても MMI による抑制効果が認められたことより、adenylate cyclase 系の活性化を介する細胞増殖機構における MMI の作用点は cAMP 産生以後にあることが示唆された。しかし MMI の作用が adenylate cyclase 系以外の細胞増殖機構、すなわち Ca²⁺-リン脂質依存性プロテインキナーゼ C などに関与するか否かは、今回筆者の用いた FRTL-5細胞株において TPA 添加により増殖刺激効果を認め得なかったため検討することができなかった。また TGI により誘導される細胞増殖に対して MMI がやはり抑制効果を持つかどうかは興味のある所であるが、筆者の検討したグレーブス病症例においては、FRTL-5細胞を用いての TGI 活性を認めた例がなく検討不能であった。TGI が TSAb と同様に TSH レセプターに結合し、adenylate cyclase 系を活性化し cAMP 上昇を介して細胞増殖を誘導するという説¹⁷⁾とこの実験で得た結果を考え合わせると MMI が TGI により誘導される甲状腺細胞増殖 (=甲状腺腫) をも抑制する可能性が考えられる。

MMI は生体内では甲状腺内で濃縮され²¹⁾、その濃度は約1~10 μ M と考えられている¹⁹⁾。今回筆者の添加した MMI の濃度が、これらの in vivo における濃度と比較して高いことより、薬物自体の細胞毒性が問題となるが trypan-blue 染色による細胞の viability は95%以上と保たれており今回用いた濃度での MMI の細胞障害性是否定的である。実際の細胞数の検討では、[³H]-thymidine incorporation に比較して MMI 添加による抑制は明らかではなかった。これは thymidine incorporation と実際の細胞増殖との間に存在する time lag による可能性が考えられた。

以上の事より、MMI の甲状腺への作用が単にホルモン合成の抑制のみではなく、その細胞増殖をも抑制する可能性が示唆された。

結 語

FRTL-5細胞を用いて、その細胞増殖に関して TSH による adenylate cyclase 系の関与が存在するか否かを検討し、その系におけるメチマゾールの直接作用について検討を行った。

1) FRTL-5細胞において [³H]-thymidine incorporation にて表現される細胞増殖は、TSH (Bu)₂cAMP および forskolin の添加により促進された。TSH は、adenylate cyclase 系の活性化により甲状腺細胞増殖を刺激すると考えられた。

2) メチマゾールは、少なくとも TSH-adenylate cyclase 系を介する FRTL-5細胞の増殖を直接抑制する可能性が示唆され、その抑制機序は cAMP 産生よりも後のステップにあると推測された。

稿を終えるにあたり御指導と後校閲を賜りました石井淳教授に深謝し、併せて終始直接御指導頂きました埼玉医科大学第四内科講師原義人先生に深く感謝致します。

文 献

1) Adams, A.E. and Buss, J.A.M.: The effect of a single injection of an antithyroid drug on hyperplasia in the thyroid of the chick embryo. *Endocrinology*, 52: 234-253, 1952.

- 2) Akiguchi, I., Eguchi, K., Kawabe, Y., Otsubo, T., Miyake, S., Ishikawa, N., Ito, K., Izumi, M. and Nagataki, S.: Effect of calcium ionophore and phorbol ester on the proliferation of FRTL5 In: Vichayanrat, A., Nitiyanant, W., Eastman, C., Nagataki, S. eds. Recent progress in thyroidology. Crystal house press, Bangkok, 1987, 161–165.
- 3) Ambesi-Impimbato, F.S., Parks, L.A.M. and Coon, H.G.: Culture of hormone dependent functional epithelial cells from rat thyroids. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77: 3455–3459, 1980.
- 4) Aoki, N., Pinnamaneni, K.M. and DeGroot, L.J.: Studies on suppressor cell function in thyroid disease. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 48: 803–810, 1979.
- 5) Bachrach, L.K., Eggo, M.C., Mak, W.W. and Burrow, G.N.: Phorbol esters stimulate growth and inhibit differentiation in cultured thyroid cells. *Endocrinology*, 116: 1603–1609, 1985.
- 6) Bray, G.A.: Increased sensitivity of the thyroid in iodine depleted rats to the goitrogenic effects of thyrotropin. *J. Clin. Invest.*, 47: 1640–1647, 1968.
- 7) Brooker, G., Pedone, C. and Barovsky, K.: Selective reduction of forskolin-stimulated cyclic AMP accumulation by inhibitors of protein synthesis. *Science*, 220: 1169–1170, 1983.
- 8) Davidson, B., Soodak, M., Neary, J.T., Strout, H.V., Kieffer, J.D., Mover, H. and Maloof, F.: The irreversible inactivation of thyroid peroxidase by methylmercaptoimidazole, thiouracil and propylthiouracil in vitro and its relationship to in vivo findings. *Endocrinology*, 103: 871–882, 1978.
- 9) DeGroot, L.J., Lasen, P.R., Refetoff, S. and Stabury, J.B.: The thyroid and its disease, A Wiley medical publication, USA, 1984, 428.
- 10) Dere, W.H., Hirayu, H. and Rapoport, B.: Thyrotropin and cyclic AMP regulation of rats proto-oncogene expression in cultured thyroid cells, *FEBS lett.* 196: 305–308, 1986.
- 11) Doniach, D., Bottazzo, G.F., Khoury, E.L.: Prospects in human autoimmune thyroiditis. In: Pinchera, A., Doniach, D., Fenzi, G.F., Baschieri, L. eds. Autoimmune aspects of endocrine disorders, Academic Press, London, 1980, 25–38.
- 12) Drexhage, H.A., Bottazzo, G.F., Doniach, D., Bitenski, L. and Chayen, J.: Evidence for thyroid growth stimulating immunoglobulins in some goitrous thyroid disease. *Lancet*, 2: 287–292, 1980.
- 13) Ealey, P.A., Emmerson, J.M., Bidey, S.P. and Marshall, N.J.: Thyrotropin stimulation of mitogenesis of the rat thyroid cell strain FRTL-5: A metaphase index assay for the detection of thyroid growth stimulators. *J. Endocr.*, 106: 203–210, 1985.
- 14) Eggo, M.C., Mak, W.W., Bachrach, L.K., Errick, J.E. and Burrow, G.N.: Cultured thyroid – Is immortality the answer? In: Eggo, M.C., Burrow, G.N. eds. Thyroglobulin – The Prothyroid Hormone, Raven Press, New York, 1985, 201–210.
- 15) Engler, H., Taurog, A. and Dorris, M.L.: Preferential inhibition of thyroxine and 3,5,3'-triiodothyronine formation by propylthiouracil and methylmercaptoimidazole in thyroid peroxidase-catalyzed iodination of thyroglobulin. *Endocrinology*, 110: 190–197, 1982.
- 16) Goldrath, N., Shoham, J., Bank, H. and Eisenstein, Z.: Anti-thyroid drugs and lymphocyte function II. The in vivo effect of blastogenesis and suppressor cell activity in Graves' disease. *Clin. Exp. Immunol.*, 50: 62–69, 1982.
- 17) Jin, S., Hornicek, F.J., Neylan, D., Zakarija, M. and McKenzie, J.M.: Evidence that adenosine 3',5'-monophosphate

- mediates stimulation of thyroid growth in FRTL-5 cells. *Endocrinology*, 119: 802–810, 1986.
- 18) Kikkawa, U., Kaibuchi, K., Castagna, M., Yamanishi, J., Sano, K., Tanaka, Y., Miyake, R., Takai, Y. and Nishizuka, Y.: Protein phosphorylation and mechanism of action of tumor-promoting phorbol esters. In: Greengard, P., Robison, G.A., Paoletti, R., Nicosia, S. eds. *Advances in Cyclic Nucleotide and Protein Phosphorylation Research* 17, Raven Press, New York, 1984, 437–442.
- 19) Lazarus, J.H., Marchant, B., Alexander, W.D. and Clark, D.H.: ^{35}S -antithyroid drug concentration and organic binding of iodine in the human thyroid. *Clin. Endocrinol. (Oxf)*, 4: 609–615, 1975.
- 20) Maloof, F., Smith, S. and Soodak, M.: The mechanism of action of the thiocarbamide type antithyroid drugs in inhibiting iodination in thyroid tissue. *Mech. React. Sulf. Comp.*, 4: 61–98, 1969.
- 21) Marchant, B., Alexander, W.D., Lazarus, J.H., Lee, J. and Clark, D.H.: The accumulation of ^{35}S -antithyroid drugs by the thyroid gland. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 34: 847–851, 1972.
- 22) McGregor, A.M., Petersen, M.M., McLachlan, S.M., Rooke, P., Smith, B.R. and Hall, R.: Carbimazole and the autoimmune response in Graves' disease. *N. Engl. J. Med.*, 303: 302–307, 1980.
- 23) Monaco, F., Santolamazza, C., DeRos, I. and Andreoli, A.: Effect of propylthiouracil and methylmercaptoimidazole on thyroglobulin synthesis. *Acta Endocrinol.* 93(Copenh): 32–36, 1980.
- 24) Morris, D.R. and Hager, L.P.: Mechanism of the inhibition of enzymatic halogenation by antithyroid agents. *J. Biol. Chem.*, 241: 3582–3589, 1966.
- 25) Papapetrou, P.D., Mithon, S. and Alexander, W.D.: Binding of the ^{35}S of ^{35}S -propylthiouracil by follicular thyroglobulin in vivo and in vitro. *Acta Endocrinol.*, 79(Copenh): 248–258, 1975.
- 26) Seamon, K.B., Padgett, W. and Daly, J.W.: Forskolin: Unique diterpene activator of adenylate cyclase in membranes and in intact cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 78: 3363–3367, 1981.
- 27) Taurog, A.: The mechanism of action of thioureylenes antithyroid drugs. *Endocrinology*, 98: 1031–1046, 1976.
- 28) Tramontano, D., Chin, W.W., Moses, A.C. and Ingbar, H.: Thyrotropin and dibutyryl cyclic AMP increase level of c-myc and c-fos mRNAs in cultured rat thyroid cells. *J. Biol. Chem.*, 261: 3919–3922, 1986.
- 29) Valente, W.A., Vitti, P., Kohn, L.D., Brandi, M.L., Rotella, C.M., Toccafondi, R., Tramontano, D., Aloj, S.M. and Ambesi-Impimbato, F.S.: The relationship of growth and adenylate cyclase activity in cultured thyroid cells: separate bioeffects of thyrotropin. *Endocrinology*, 112: 71–79, 1983.
- 30) Valente, W.A., Vitti, P., Rotella, C.A., Vaughan, M.M., Aloj, S.M., Grollma, E.F., Ambesi-Impimbato, F.S. and Kohn, L.D.: Antibodies that promote thyroid growth: A distinct population of thyroid stimulating autoantibodies. *N. Engl. J. Med.*, 309: 1028–1034, 1983.
- 31) Weinstein, I.B.: Protein kinase, phospholipid and control of growth. *Nature*, 302: 750, 1983.
- 32) Yun, K., Yamashita, S., Izumi, K., Yonemitsu, N. and Sugihara, H.: Effect of forskolin on the morphology and function of the rat thyroid cell strain, FRTL-5: Comparison with the effects of thyrotrophin. *J. Endocr.*, 111: 397–405, 1986.
- (受付日: '87. 11. 18)