信州医誌，24(1)：13～20，1976

原　著

ADENYLATE CYCLASE-CYCLIC AMP からみた，正常とバセドウ甲状腺のちがい

高　須　信　行
信州大学医学部順応医学研究施設内分泌内科

ADENYLATE CYCLASE-CYCLIC AMP SYSTEM IN NORMAL AND TOXIC HUMAN THYROIDS

Nobuyuki TAKASU
Department of Medicine, Institute of Adaptation Medicine,
Faculty of Medicine, Shinshu University

Key words：バセドウ甲状腺 (toxic human thyroids)
甲状腺刺激ホルモン (thyroid stimulating hormone)
プロスタグランデイン (prostaglandins)
LATS
Adenylate cyclase-cyclic AMP

I．まえがき

バセドウ病は甲状腺腫，眼症状，四肢振戦，甲状腺ホルモン過剰に伴う症状を有する疾患である。その病因は不明で，古くから色々な説が提出されており，Krankheit der Theorie と呼ばれている。例えばバセドウ病の病因論を歴史的にみると，体液異常説，中枢神経障害説，植物神経関与説，感染説，体質説などと云った正体不明の古典的学説にその源を発しているが，1886年 Möbius により「甲状腺説」が説えられるに至って，初めて病気のある場所が明らかにされた。時あたかもフランスにおいて Tillaux (1880年) が，ドイツに於て Rehn (1884年) が甲状腺手術によりバセドウ病を改善させており，Möbius の考えは一時期を劃したと云って差しつかえない。しかしこの考えも長くはつづかず，1922年 Smith が，又1929年 Aron および Leobs が，脳下垂体抽出物により動物に実験的甲状腺腫と眼球突出を造り出して以来，いわゆる〝下垂体説〟が有力となった。しかしこの考えも又一時的なもので，TSH の radio-immuno-assey が可能となり，バセドウ患者の血中 TSH が却って減少していることが明らかになるに及んで，とどめをさされたと云ってさしつかえない。一方1956年 Adams[1] はバセドウ患者血中に TSH と異る甲状腺刺激物質，Long acting thyroid stimulator (LATS) を発見し，この物質がバセドウ病を発生させる原因物質ではないかとして数多くの研究が行われて来た。しかし現在までのところ，LATS がバセドウ病発生に全く関係ないとは云えないが，LATS が唯一の発生基因物質であるとも断定することが出来ない状態にある。それにもかかわらず Kriss ら[2]により LATS は一種の抗体であるという考えが提唱され，〝自己免疫疾患説〟が今日もなお根強く考えられている実状にある。このように体液異常説に代表される〝古典説〟から〝甲状腺説〟，〝甲状腺刺激物質 (TSH, LATS) 説〟にと変換をたどった訳であるが，最近10年間の動きは，〝甲状腺刺激物質説〟に何等かの形で Sutherland 一派[3]の提唱する cyclic AMP 説を参加させたいとするものであった。即ち，TSH, LATS, prostaglandins (PGE) 等の甲状腺刺激物質は甲状腺の adenylate cyclase (A.C.) を刺激し cyclic AMP を増加させ，甲状腺機能を高めるが，バセドウ病ではこの経路の何れかに異常があるのではないかとする考えである。ひとの甲状腺は仲々得がたいことから，この〝cyclic AMP

説″ とも云うべき仮説の証明は今日充分行われていないため，私は正常人及びバセドウ病患者より得た甲状腺を用い，LATS，TSH，PGE_1 の甲状腺刺激の状態を追求し，正常甲状腺はバセドウ甲状腺と幾つかの点で異なる事を明らかにした。勿論こうした相違がバセドウ病発生の総てを説明してくれる訳ではないが，バセドウ病を考える上での一つの手がかりになると考えられるので，ここにその大略を報告したいと思う。

Ⅱ．研究材料及び研究方法

手術時に摘出したひと正常及びバセドウ甲状腺を用い研究を行った。バセドウ病患者は術前約4週間にわたり methimazole (30～40mg/day) が投与されている。摘出後直ちに厚さ 1mm の甲状腺 slice を Stadie-Riggs microtome で作成し，Humes[4] の方法により，prelabeling を行って研究を行った。即ち甲状腺 slice (30mg) を ^{3}H-adenine (1μCi/1 piece of thyroid slice) を含む，Krebs-Ringer bicarbonate buffer (pH 7.4) plus 0.1% グルコース (KRBG) の中に入れ，37°C で50分間 incubation を行った。この incubation で甲状腺内に ^{3}H-ATP が産生されるが，余分の附着した放射性物質を洗い流すため，生理的食塩水で甲状腺 slice を2度洗う。この slice を 10^{-2}M の theophylline と甲状腺刺激物質 (TSH，PGE，LATS) を含む KRBG 0.5ml で incubation し，adenylate cyclase 活性を測定した。反応は1規定の塩酸 50μl を加え停止し，slice の重さを計った後，40mM の Tris-HCl 10.5ml で homogenate した。10mMの ATP，ADP，5′AMP，cyclic AMP (c AMP) を含む carrier solution 100μl を homogenate に加え，5分間 100°C で加熱した後1規定の NaOH で中和した。甲状腺刺激物質との incubation 中，甲状腺内で新たに産生された ^{3}H-c AMP は double column 法[5]，すなわち Alumina column 法[6] と Resin column 法とを組合せたものを用い分離した。double column 法による recovery は60～70%程度である。分離した ^{3}H-c AMP は液体シンチレーション・カウンターにて count した。

cold の c AMP の測定は以下のようにして行った。ひと甲状腺 slice を 10^{-2}M の theophylline を含む KRBG 中で37°C，30分間 incubation し甲状内に含まれる cold c AMP を一定にした後，甲状腺 slice を theophylline，TSH 及び PGE_1 を含む KRBG 中で37°C，10分間 incubate した後，前述した ^{3}H-c AMP の場合と同様，反応を止めた。c AMP の測定はGilman[8] の competitive protein binding assay 法で測定した。測定に用いた binding protein は Kumons[9] の方法で白ネズミの肝臓から作成した。結合 c AMP の分離は Charcoal を用いた。

plasma membrane の分離は Yamashita[10] らの方法で行った。分離した50～100μg/50μl の plasma membrane は 40mM Tris HCl (pH 7.8) containing 1μCi ^{14}C-ATP，2mM ATP，1mM c AMP，5mM $MgCl_2$，5mM theophylline，0.1% crystalline bovine serum albumin，20mM phosphoenol pyruvate and 250μg/ml pyruvate kinase 中で10分間 37°C で incubate，incubate 終了後，3分間煮沸し，反応を止めた。

TSH は Armour Pharmaceutical Co. から，PGE_1 は小野製薬より提供をうけた。LATS (McKenzie の Bioassay 法で1200%の増加を示す強さを有している) positive の血清は，バセドウ病患者より得たものである。ATP，c AMP，Pyruvate kinase，phosphoenol-pyruvate 等の試薬は Boehringer Mannheim Biochemicals から入手した。AG 50 WX 2(H^+) form，100～200 mesh は Bio-Rad Laboratories より，又活性化アルミナは関東化学のものを用いた。^{3}H-adenine，^{14}C-ATP，^{3}H-c AMP は The Radiochemical Center (R.C.C., England) から入手した。

Ⅲ．成　績

A．正常ひと甲状腺とバセドウ病甲状腺との TSH に対する反応性の相違

prelabeling 法(^{3}H-adenine→^{3}H-ATP→^{3}H-c AMP への conversion をみる) を用い，正常ひと甲状腺とバセドウ病甲状腺 slice の adenylate cyclase 活性を測定した。図1は縦軸に c AMP 濃度を横軸に TSH 濃度を取り，TSH 濃度の増加による c AMP の上昇をみたものである。正常甲状腺はバセドウ甲状腺に比べ，TSH に対する反応性がよく，TSH 5～10mU/ml で有意の c AMP の上昇がみられる。バセドウ甲状腺は TSH に対する反応性が悪く，TSH 50mU/ml の濃度で初めて c AMP の有意な上昇がみられた。両甲状腺共，TSH 100mU/ml で adenylate cyclase はほゞ最大に刺激されるが，その程度は正常甲状腺では対照の3倍に，バセドウ甲状腺では対照の1.5倍に相当し，大きな違いがみられた。TSH 50mU/ml 投与時に産生された c AMP を時間的に調べると (図2)，

正常甲状腺では TSH に対する反応がよく，15分で最大になった。バセドウ甲状腺では，個々の組織によって反応が相当異るが，全体としては，正常甲状腺に比べ反応が悪く，10分で最大に達した。

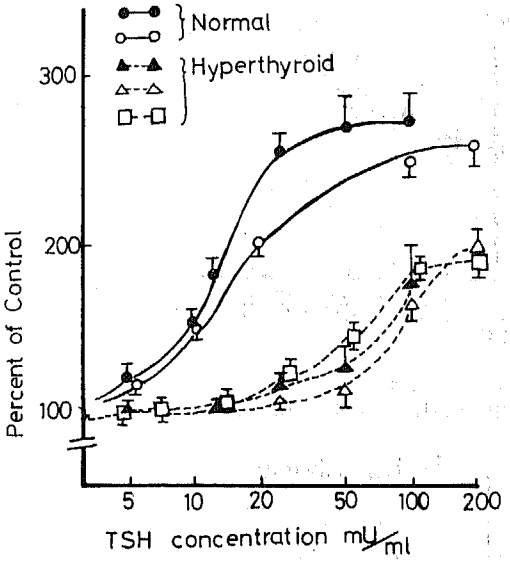

図 1　各種濃度の TSH による c AMP の増加
縦軸は cyclic AMP 濃度
（甲状腺 slice，prelabeling 法）

B．正常甲状腺とバセドウ甲状腺の PGE_1 に対する反応の比較

prelabeling 法で，各種濃度の PGE_1 投与時に産生される c AMP の量をみると（図3），正常と，バセドウ甲状腺との間に，違いは認められず，PGE_1 10^{-5}, 10^{-4}M ではっきりとした A. C. 活性の上昇が認められた。$PGE_1 10^{-5}$M 投与時の c AMP 上昇の time course（図4）をみても，正常とバセドウ甲状腺との間に，違いは認められず，A. C. 活性は，徐々に増加し，10分で最大になり，以後，急速に c AMP は減少した。

C．TSH と PGE_1 に対する反応

例数をふやして，TSH50mU/ml，PGE_1 10^{-5}M による，正常とバセドウ甲状腺 slice の c AMP の反応を prelabeling 法でみると（図5，左），TSH 50mU/ml に対する反応は，正常甲状腺に比べ，バセドウ甲状腺では，減弱しているが，PGE_1 10^{-5}M に対する反応は正常とバセドウ甲状腺との間に，違いは認められなかった。TSH 50mU/ml，PGE_1 10^{-5}M に対する反応を cold の c AMP を指標にみても（図6），prelabeling 法で認められたのと同じような傾向が認められた。また basal の c AMP 濃度には，両者の間に大きな違いは認められなかった。prelabeling 法で，同一組織の TSH と PGE_1 に対する反応を比べてみる（図5，右）。TSH 50mU/ml に対する反応を横軸に，PGE_1 10^{-5}M に対する反応を縦軸に plot す

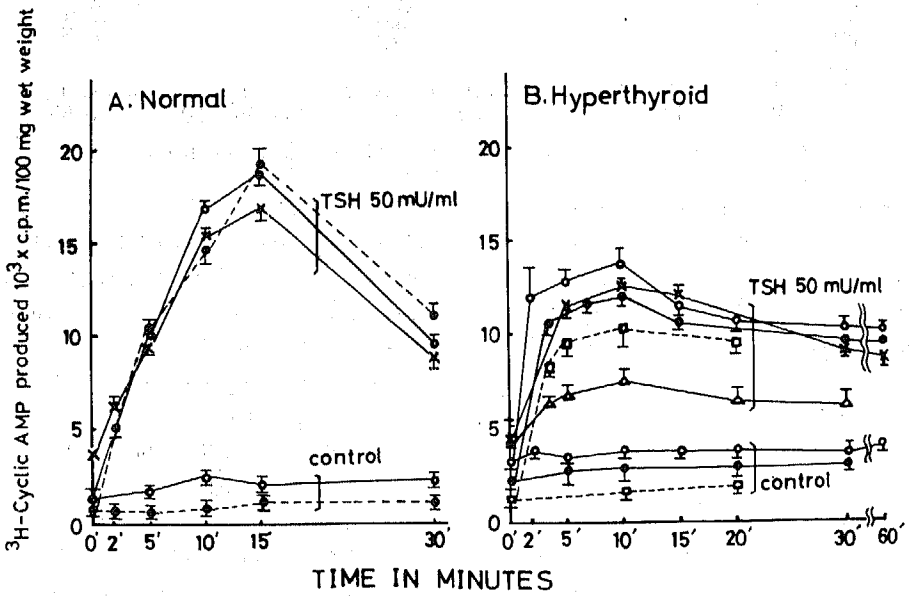

図 2　TSH 50 mU/ml time course（甲状腺 slice，prelabeling 法）

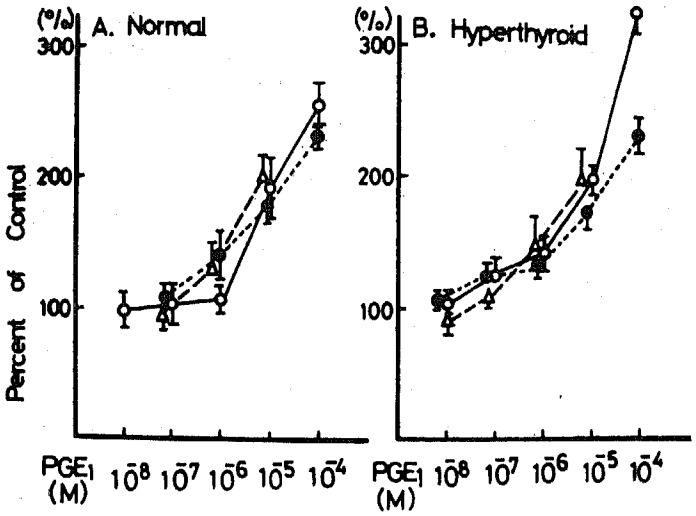

図 3 各種濃度の PGE_1 による c AMP の増加
縦軸は cyclic AMP 濃度（甲状腺 slice, prelabeling 法）

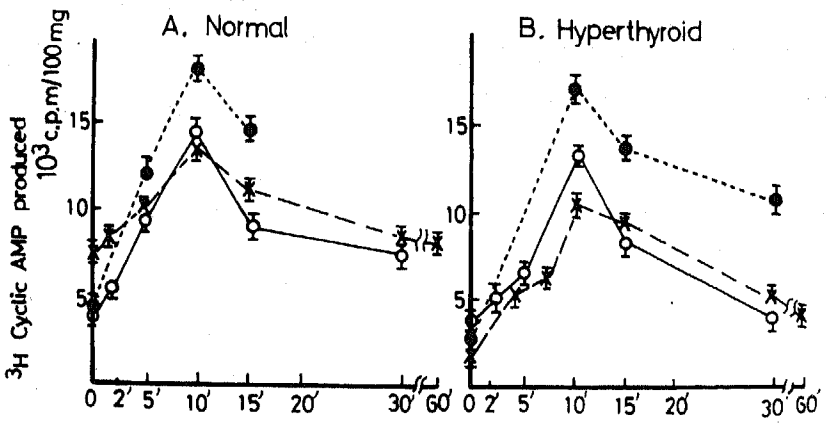

図 4 PGE_1 10^{-5}M 投与後の c AMP の増加（甲状腺 slice, prelabeling 法）

ると，回帰直線は正常では Y＝0.299 x＋101.8（r＝0.674），バセドウでは Y＝1.600 x－30.88（r＝0.847）と，はっきりした違いが認められた。

D. 正常とバセドウ甲状腺 plasma membrane の adenylate cyclase の TSH に対する反応

A. と C. で記したように甲状腺 slice では，バセドウ甲状腺は正常甲状腺に比べ TSH に対する反応が減弱している。では adenylate cyclase が局在している plasma membrane ではどうであろうか？ それを調べたのが図7で，正常甲状腺 plasma membrane adenylate cyclase とバセドウ甲状腺 plasma membrane adenylate cyclase との間には TSH に対する反応の違いが認められなかった。バセドウ甲状腺 plasma membrane でみられるように，plasma membrane の実験では実験毎に相当反応性が違っていた。この点著しい実験の相違を示さない slice 実験に，より信頼がおけるようである。

E. 正常とバセドウ甲状腺の LATS に対する反応性の比較

prelabeling 法で甲状腺 slice の LATS により増加する c AMP を時間的にみると図8に示した如く，その上昇はわずかである。上昇は10分で最大となり，以後減少傾向を示すが正常とバセドウ甲状腺との間に相違はない。更に同一組織を用い，TSH や LATS に対する反応性を調べると図9の如くである。即ち，正

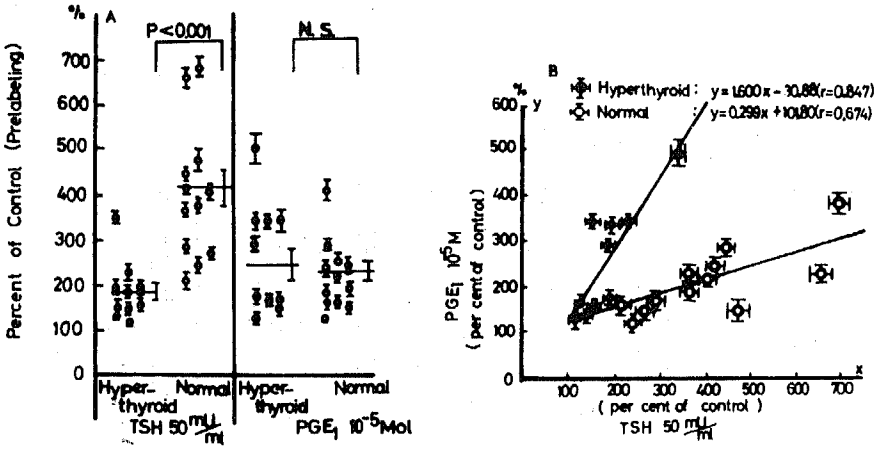

図 5 正常，バセドウ甲状腺の TSH 50mU/ml，PGE_1 10^{-5}M に対する cyclic AMP の反応

左図縦軸，右図縦，横軸は cyclic AMP 濃度（甲状腺 slice，prelabeling 法）

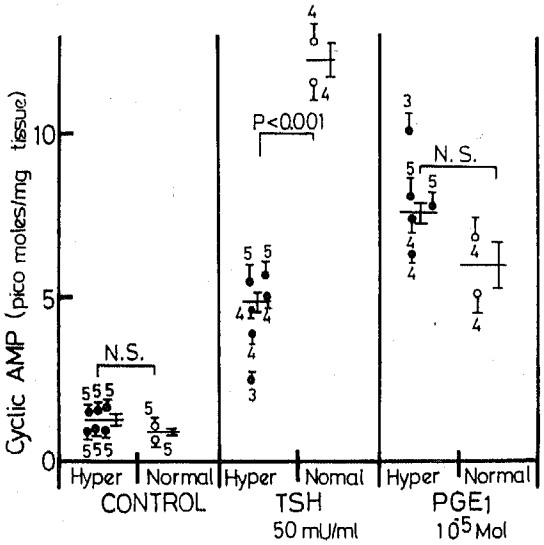

図 6 正常，バセドウ甲状腺の TSH 50mU/ml，PGE_1 10^{-5}M に対する cyclic AMP の反応（甲状腺 slice，cold cyclic AMP）

常，バセドウ病の何れの甲状腺に於ても c AMP の上昇は TSH 及び LATS に反応して急速に出現している事が知られる。このことから adenylate cyclase の効果と出現時間に関する限り，従来推論された如き潜伏期が存在するとは思われなかった。しかし TSH 効果の出現し易い事は事実である。

adenylate cyclase の刺激効果出現を更に 2 分から 12分にわたり詳細に検討したものが図10であるが，この図からもやはり，TSH や LATS の効果は殆んど同時的に出現していることが知られるのである。

Ⅳ. 考　察

甲状腺刺激物質としては TSH，LATS，Prostaglandin が知られている。これらの甲状腺刺激物質は Sutherland[3] らの提唱した adenylate cyclase-cyclic AMP 系を介して，その作用効果を発現していると考えられ（これ以外の可能性を否定するものではないが），これを立証する報告が数多くなされている。こ

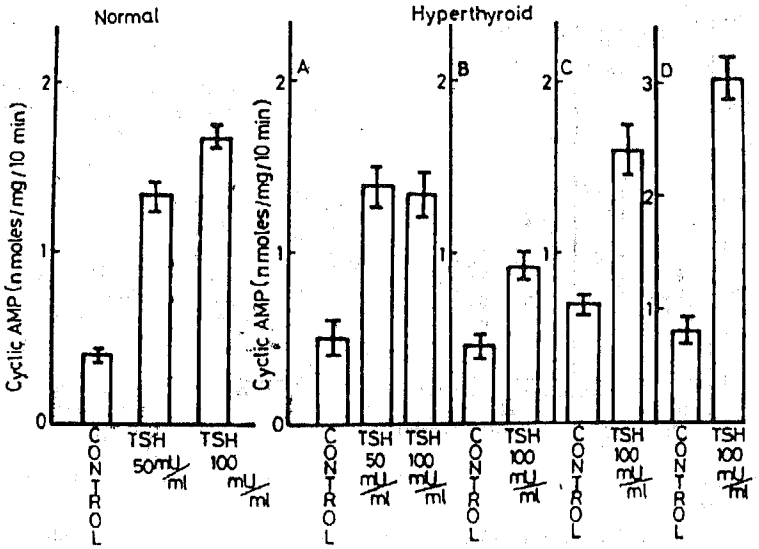

図 7　正常，バセドウ甲状腺 plasma membrane-adenylate cyclase の TSH に対する反応

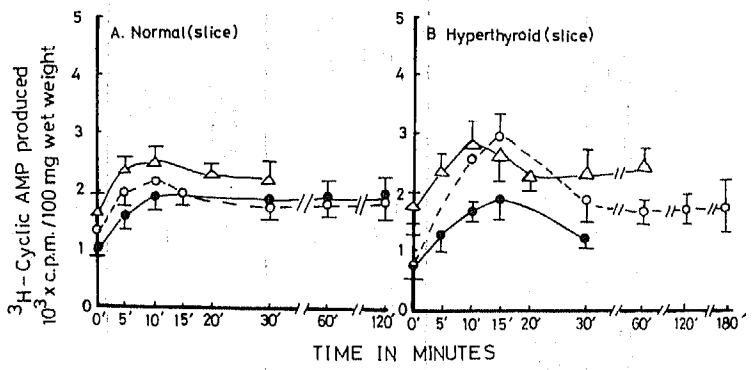

図 8　LATS time course（甲状腺 slice，prelabeling 法）

こでは，これらの甲状腺刺激物質に対する正常とバセドウ甲状腺の反応の違いを比較検討した。

明らかになったことは，甲状腺 slice では，バセドウ甲状腺は正常甲状腺に比べて，TSH に対する反応が，dose response curve でみても，time course でみても，減弱しているということであろう。このことは，バセドウ甲状腺自体にも何らかの異常があることを示しているものと思われる。TSH に対する反応がバセドウ甲状腺では減弱しているということは，どういう臨床事実と対応するであろうか。Hedley[12]らは，彼らが以前から追跡調査しているバセドウ術後の患者のうち，83例について，血清 TSH を測定し，いままでの方法では euthyroid と考えられていた40例中11例に 10.6～38.5μU/ml という高い TSH 値（彼らの正常値は<0.5～4.2μU/ml）を示し，さらにこれらの症例はいずれも術後2年以上（2～21年）を経過していることから，TSH 値の上昇は術後長期にわたって，存続しうるものであって，これらの症例は，残存甲状腺の濾胞上皮細胞集団の過形成を起こす能力の傷害があることを示すものであると述べている。彼らのいう濾胞上皮細胞集団の増生能力の傷害は，我々が今回 in vitro で，明らかにした，バセドウ甲状腺の TSH に対する反応性の減弱と対応する可能性はありうると思われる。

TSH に対する反応は正常甲状腺とバセドウ甲状腺との間に大きな違いが認められたが，PGE_1，LATS

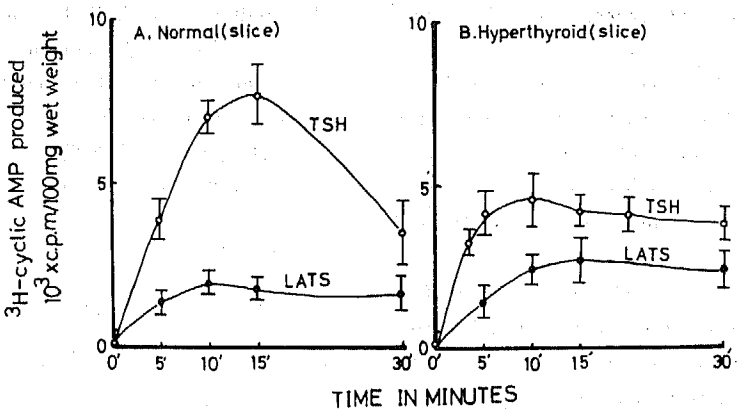

図 9　LATS, TSH 50mU/ml time course（甲状腺 slice, prelabeling 法）

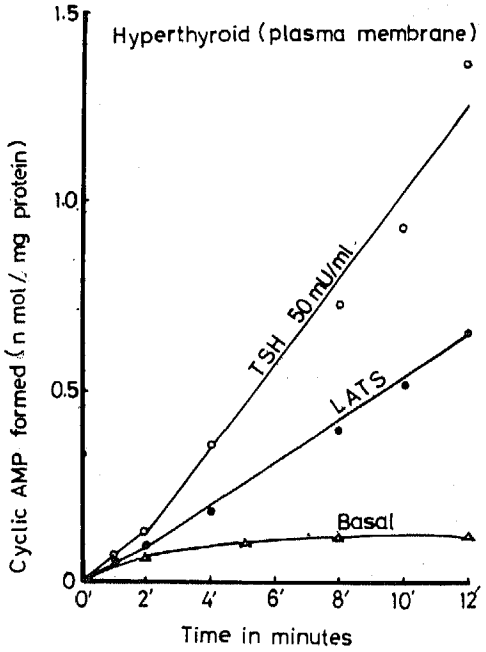

図10　バセドウ甲状腺 plasma membrane-adenylate cyclase：TSH 50mU/ml, LATS time course

に関しては大きな違いは認められなかった。

ホルモンの受容体ということばは古くからあるが，現時点では，「ホルモンと特異的に反応して，生理的に意味あるシグナルを生じる機構」[13]と，ばくぜんと考えられているようである。adenylate cyclase と関連した膜受容体の場合には，adenylate cyclase 活性，あるいは産生された cyclic AMP を測定することにより，受容体系の機能を全体として知ることができるわけで，現段階では，受容体をこの受容体系として，とらえて，その異常を論じてよいと思われる。この意味では，バセドウ病も，受容体異常症に含めることも可能であろう。しかし，バセドウ甲状腺では，受容体 adenylate cyclase 系に何らかの異常があることは明らかであるが，この異常が何に基くものであるかは不明であり，また，この異常がバセドウ病の本態と，どう結びつくかは不明である。

V. まとめ

Adenylate cyclase-cyclic AMP の面から，正常甲状腺とバセドウ甲状腺の甲状腺刺激物質（TSH, PGE_1, LATS）に対する反応性を比較検討した。

（1）バセドウ甲状腺は正常甲状腺に比べ TSH に対する反応が減弱している。

（2）PGE_1 に対する反応性をみると，正常とバセドウ甲状腺との間に相違がみられなかった。

（3）LATS に対しては，正常とバセドウ甲状腺との間に反応の違いがみられなかった。

（4）LATS は TSH と同様，急速に adenylate cyclase を刺激し，両者の間に本質的相違はみられなかった。

本研究の要旨は，第47回日本内分泌学会総会（1974），第15回臨床化学シンポジウム（1975）において発表した。御指導と御校閲を賜りました山田隆司教授に謝意を表します。

文　献

1) Adams, D. D. and Purves, H. D.: Abnormal responses in the assay of thyrotrophin. Proc.

Univ. Otago Med. School Otago, New Zealand, 34 : 11−12, 1956

2) Kriss, J. P., Pleshakov, V. and Chien, J. R. : Isolation and identification of the long-acting thyroid stimulator and its relation to hyperthyroidism and circumscribed pretibial myxedema. J. Clin. Endocrinol. Metab., 24 : 1005−1028, 1964

3) Sutherland, E. W., Robinson, G. A. and Butcher, R. : Some aspecst of the biological role of adenosine 3′, 5′ monophosphate (cyclic AMP). Circulation, 37 : 279−305, 1968

4) Humes, J. L., Rounbehler, M. and Kuehl, F. A. Jr. : A new assay for measuring adenyl cyclase activity in intact cells. Anal. Biochem., 32 : 210−217, 1969

5) 佐藤誠也 : Alumina column を用いる cyclic AMP の分離法とその応用. ホルモンと臨床, 21 : 73−78, 1973

6) White, A. A. and Zenser, T. V. : Separation of cyclic 3′, 5′-nucleotide monophosphates from other nucleotides on aluminum oxide columns. Anal. Biochem., 41 : 372−396, 1971

7) Krishna, G., Weiss, B. and Brodie, B. B. : A simple sensitive method for the assay of adenyl cyclase. J. Pharmacol. Exp. Ther., 163 : 379−385, 1968

8) Gilman, G. : A protein binding assay for adenosine 3′, 5′-cyclic monophosphate. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 67 : 305−312, 1970

9) Kumon, A., Yamamura, H. and Nishizuka, Y. : Mode of action of adenosine 3′, 5′-cyclic phosphate on protein kinase from rat liver. Biochem. Biophys. Res. Commun., 41 : 1290−1297, 1970

10) Yamashita, K. and Field, J. B. : Preparation of thyroid plasma membranes containing a TSH responsive adenyl cyclase. Biochem. Biophys. Res. Commun., 40 : 171−177, 1970

11) Zor, U., Kaneko, T., Lowe, I. P., Bloom, G. and Field, J. B. : Effect of TSH and prostaglandins on thyroid adenyl cyclase activation and cyclic adenosine 3′, 5′ monophosphate. J. Biol. Chem., 244 : 5189−5195, 1969

12) Hedley, A. J., Hall, R., Amos, J., Michie, W. and Crooks, J. : Serum thyrotropin levels after subtotal thyroidectomy for Graves′ disease. Lancet, 1 : 455−458, 1971

13) 河野哲郎 : 肝と脂肪細胞のホルモン受容体. 最新医学, 27 : 961−966, 1972

(51. 1. 20 受稿)