

# Competitive Inhibitors of Peripheral Thyroxine Metabolism; A Mode of Action of Trihydroxybenzophenone

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/2297/7719">http://hdl.handle.net/2297/7719</a>

# 甲状腺ホルモン末梢代謝の競合的阻害物質；とくに Trihydroxybenzophenone の作用 機序に関する研究

金沢大学大学院医学研究科小児科 (主任：谷口 昂教授)

加 藤 泰 三

(昭和59年2月7日受付)

サイロキシシン(thyroxine 以下  $T_4$  と略)の末梢作用に対する阻害剤を見出す目的で、ケトン基とフェノール環、フェニール環およびイミダゾール環複合体などの化学物質の  $T_4$ 5'脱ヨード活性に与える阻害効果を検討した。2,4,4'トリハイドロキシベンゾフェノン(2,4,4'-trihydroxybenzophenone, 以下 THB と略)、2,2',3,4,4'ペンタハイドロキシベンゾフェノン(2,2',3,4,4'-pentahydroxybenzophenone)、2,2',3,3',4,4'ヘキサハイドロキシベンゾフェノン(2,2',3,3',4,4'-hexahydroxybenzophenone)、2アミノベンゾフェノン(2-aminobenzophenone)、3メチルベンゾフェノン(3-methylbenzophenone)、ケルセチン(querctetin)、2,4ジハイドロオキシメチルベンゾフェノン(2,4-dihydroxymethylbenzophenone)、3ベンゾイルヒドラトロピン酸(3-benzoylhydratropic acid)、2',4',6'トリハイドロオキシプロピオンフェノン(2',4',6'-trihydroxypropionophenone)、アルファ3(2クロロフェノキシ)フェニールプロピオン酸( $\alpha$ [3(2-chlorophenoxy)phenyl] propionic acid)、ジフェニールヒダントイン(diphenylhydantoin)、スピロヒダントイン(spirohydantoin)およびオプタルミン酸(opthalmic acid)で検討し、その結果 THB に最も強い抑制効果を認め、50%抑制量 ( $ID_{50}$ ) は  $10^{-5}M$  であった。THB の阻害効果は  $T_4$ 5'脱ヨード酵素の補酵素である NADPH および還元グルタチオンの添加によって影響を受けず、基質  $T_4$  との競合阻害と考えられた。また  $10^{-5}M$  THB と  $10^{-7}$ ~ $10^{-8}M$  の低濃度のプロピルチオウラシル(propylthiouracil, 以下 PTU と略)の併用により、酵素活性は相乗的に阻害された。また THB ( $10^{-5}M$ ) はブタ甲状腺培養細胞からの  $T_4$  放出を促進したが、 $T_4$  からトリヨードサイロニン(triiodothyronine, 以下  $T_3$  と略)への転化を抑制した。また THB は  $^{125}I$ - $T_4$  とラット肝細胞膜およびヒト血清  $T_4$  結合グロブリン( $T_4$ -binding globulin)との結合を競合的に阻害した。一方、幼若ラットに2週間1~2mgのTHBを皮下投与してin vivoでTHBの作用をしらべた。その結果、体重増加率および甲状腺重量の減少、甲状腺内  $T_4$  および  $T_3$  含量の減少、血中  $T_4$  濃度の低下、肝の  $T_4$ 5'脱ヨード酵素、肝ミトコンドリア分画のアルファグリセロリン酸脱水素酵素( $\alpha$ -glycerophosphate dehydrogenase, 以下  $\alpha$ -GPD と略)および腎のナトリウム・カリウム依存性ATPアーゼ(Na-K dependent ATPase)の各酵素活性の低下などが認められた。しかしながら血中  $T_4$  濃度は正常域にあった。THBとPTU併用群ではこれらの変化がより顕著になり相乗効果を認め、甲状腺重量は対照群に比し増大し、血中  $T_4$  濃度は低下した。さらに妊娠および授乳期のラットに10mgのTHBを投与すると、甲状腺ホルモンの依存期(生後1~2週)に一致して、新生児ラットに血中  $T_3$  濃度の低下、肝  $T_4$ 5'脱ヨード酵素および  $\alpha$ -GPD 活性の低下をきたした。以上の成績からTHBは甲状腺からの  $T_4$  分泌を促進するが末梢組織では  $T_4$  との競合阻害により  $T_4$ 5'脱ヨード活性を抑制して、甲状腺機能低下状態をもたらすものと考えられる。以上よりTHBは標的組織における甲状腺ホルモン作用機序の解明に有力な手段となる可能性がある。

**Key words** Thyroxine, Trihydroxybenzophenone,  $T_4$  5'-deiodinase, Competitive Inhibitor

Competitive Inhibitors of Peripheral Thyroxine Metabolism; A Mode of Action of Trihydroxybenzophenone. **Taizo Kato**, Department of Pediatrics, (Director: Prof. N. Taniguchi), School of Medicine, Kanazawa University.

甲状腺機能亢進症の治療剤として従来より使用されている抗甲状腺剤は主に甲状腺ホルモン合成阻害剤であり<sup>11)</sup>, 甲状腺ホルモンの末梢作用に対する競合阻害物質に関する知見は少ない<sup>3-9)</sup>。もしサイロキシン (thyroxine, 以下  $T_4$  と略) に特異的な競合阻害物質が見出されるならば, 甲状腺ホルモンの作用機序の解明, さらに臨床応用の面で有力な手段となるであろう。従来よりカルコン構造を有する物質が脱ヨード系に対し競合阻害作用を示すことが知られている<sup>10)</sup>。そこで,  $T_4$ , 5'脱ヨード酵素活性を指標として種々の化学的類似構造を有する物質の活性阻害作用を検討した。とくにその効果の最も強い 2, 4, 4'-トリハイドロキシベンゾフェノン (2, 4, 4'-trihydroxybenzophenone, 以下 THB と略) を用いて,  $T_4$  の分泌, 末梢代謝に及ぼす影響を *in vitro* および *in vivo* で検討した。

#### 材料および方法

##### I. 使用薬剤の選択 (図 1)

1. フェノール環, フェニール環およびケトン基結合複合体として

1) フェノール環 2ヶがケトン基で結合した構造の 2, 4, 4'-トリハイドロキシベンゾフェノン (THB), 2, 2', 3, 4, 4'-ペンタハイドロキシベンゾフェノン (2, 2', 3, 4, 4'-pentahydroxybenzophenone), 2, 2', 3, 3', 4, 4'-ヘキサハイドロキシベンゾフェノン (2, 2', 3, 3', 4, 4'-hexahydroxybenzophenone) およびケルセチン (quercetin) 2) フェノール環とフェニール環がケトン基で結合した構造の 2, 4 ジハイドロキシメチルベンゾフェノン (2, 4-dihydroxymethylbenzophenone) 3) フェニール環 2ヶとケトン基を有する構造の 3 ベンゾイルヒドラトロピン酸 (3-benzoylhydratropic acid), 2 アミノベンゾフェノン (2-aminobenzophenone) および 3 メチルベンゾフェノン (3-methylbenzophenone) 4) フェニール環 2ヶにケトン基を有しない構造のアルファ 3 (2クロロフェノキシ) フェニールプロピオン酸 ( $\alpha$ [3(2-chlorophenoxy)phenyl] propionic acid) 5) フェノール環 1ヶとケトン基を有する 2', 4', 6'-トリハイドロキシプロピオフェノン (2', 4', 6'-trihydroxypropiofenone)

2. フェノール環とイミダゾール環にケトン基を有する構造のジフェニールヒダントイン (diphenylhydantoin) およびスピロヒダントイン (spirohydantoin)

3. 還元グルタチオン (reduced glutathione, 以下 GSH と略) の代謝産物として, 直鎖構造の-CO-NH 基を有するオプタルミン酸 (ophthalmic acid)

4. 抗甲状腺剤としてプロピルチオウラシル (propylthiouracil, 以下 PTU と略) を用いた。各薬

剤は 0.01% NaOH で  $10^{-2}$ M に溶解し, さらに 0.1 M リン酸緩衝液 (pH7.4) で所定の濃度まで希釈して用いた。

以上の薬剤はすべて Aldrich 社 (米国) 製を用いた。

##### II. 動物

*in vivo* にはウィスター系雌ラットより出生した仔ラットを用い, ホモジネート肝, 肝細胞膜調製および肝細胞培養には 200~250 g ウィスター系雄ラットを用いた。甲状腺細胞培養にはブタ甲状腺を用いた。

##### III. *in vitro* 実験系

###### 1. 肝 $T_4$ , 5'脱ヨード活性の測定

ラット肝をエーテル麻醉下で摘出し, 直ちに 5 倍容の 5 mM EDTA を含む 0.25 M ショ糖-3 mM トリス塩酸緩衝液 (pH7.4) でホモジナイズした。得られた 20% 肝ホモジネートを 2000 rpm, 4°C, 10 分間遠心した後, 上清を用いて Chopra の方法に従って  $T_4$ , 5'脱ヨード活性を測定した<sup>9)</sup>。即ち 20% 肝ホモジネート 200  $\mu$ l, 10  $\mu$ g/ml の L- $T_4$ , 50  $\mu$ l, 被検薬剤希釈溶液の 50  $\mu$ l に 200  $\mu$ l の 5 mM EDTA を含む 0.1 M リン酸緩衝液 (pH7.4) を加え全量を 0.5 ml とし, 37°C, 60 分間インキュベート後, 1 ml のエタノールを加え 2000 rpm, 5 分間遠心した。上清を用いて生成  $T_3$  を 2 抗体ラジオイミュノアッセイ (栄研  $T_3$  リアキット) 法で測定し,  $T_4$  の非特異的交叉反応およびホモジネート肝の内因性  $T_3$  濃度を補正した後, 蛋白 1 mg 当り, 1 時間の  $T_3$  生成量 (ng/hr/mg-protein) で算出した。蛋白定量は Lowry 法<sup>11)</sup> により測定した。

2.  $T_4$  脱ヨード活性に及ぼす阻害剤, 補酵素添加の影響

前述の  $T_4$  脱ヨード活性測定系にあらかじめ  $10^{-2}$  ~  $10^{-6}$ M に希釈した被検薬剤の 50  $\mu$ l を加えた。対照は被検薬剤の代わりにリン酸緩衝液 (pH7.4) を同量加えた。各薬剤の  $T_4$  脱ヨード活性阻害効果は対照に対する生成  $T_3$  の百分率で表わし, 50% 抑制量を  $ID_{50}$  で示した。以上の被検薬剤のうち規定濃度内で  $ID_{50}$  が得られたものについて NADPH および GSH の添加による活性阻害効果の解消の有無を検討した。肝ホモジネート 200  $\mu$ l, 10  $\mu$ g の L- $T_4$ , 50  $\mu$ l に  $10^{-2}$ M 被検薬剤 50  $\mu$ l を加えたものを各 4 系列ずつ用意し, 各系列に 0.1 M リン酸緩衝液 (pH7.4), GSH (最終濃度 5 mM), NADPH (最終濃度 0.5 mM) および GSH+NADPH (各々上記最終濃度) を加え, 0.1 M リン酸緩衝液で全量を 0.5 ml とした。対照の 4 系列には被検薬剤の代わりにリン酸緩衝液を加え, 前述の方法により生成  $T_3$  を測定した。各薬剤の  $T_4$  脱ヨード活性阻害効果を, 補酵素を添加しない対照の生成  $T_3$  に対する百分率で算出した。

### 3. $T_4$ 脱ヨード活性に対する $T_4$ , THB の用量反応関係

20%肝ホモジネート 200  $\mu$ l, L- $T_4$  50  $\mu$ l, THB 50  $\mu$ l に 0.1 M リン酸緩衝液 (pH7.4) を加えて全量を 0.5 ml とした。L- $T_4$  最終濃度 1.3  $\mu$ M, 6.5  $\mu$ M, 13  $\mu$ M, THB の最終濃度を  $10^{-5}$ M,  $3 \times 10^{-5}$ M,  $10^{-4}$ M,  $3 \times 10^{-4}$ M に調製した。37°C, 60 分間インキュベート後、生成  $T_3$  を前述の方法で測定した。生成  $T_3$  濃度、L- $T_4$  濃度および THB 濃度による用量反応関係をラインウエーパー、パークプロット法により検討した。

### 4. $T_4$ 脱ヨード活性に対する THB と PTU の併用効果

THB  $10^{-5}$ M,  $10^{-6}$ M と PTU  $10^{-8}$ ~ $10^{-9}$ M の濃度で検討した。前述の実験系に THB と PTU を加え、0.1 M リン酸緩衝液 (pH7.4) を加え全量を 0.5 ml とした。対照は被検薬剤の代りにリン酸緩衝液を加え、前述の方法により生成  $T_3$  を測定した。 $T_4$ 脱ヨード活性阻害効果を対照生成  $T_3$  に対する百分率で算出した。

### 5. 甲状腺細胞培養法

無菌的に摘出されたブタ甲状腺を剪刀を用いて細切りした。細切りした甲状腺は phosphate buffer saline (Dulbecco PBS(-), 日本製薬, 東京) で洗浄した後、0.02% EDTA を加えた 0.05% トリプシン (Difco Labo, 米国) 液 (pH7.4) で 38°C, 20 分間振盪し連続消化した。ナイロンストッキングで濾過し、濾液を 50  $\times$ g, 3 分間低速遠心して甲状腺細胞を単離した。細胞はトリパンブルーで染色し viability を算出した。培地は Ham F 12 (日本製薬, 東京) を用い、10% ウシ胎児血清 (Fetal calf serum, 以下 FCS, Gibco Labo, 米国), 10  $\mu$ g/ml カナマイシン, 100 U/ml ペニシリンおよび 10  $\mu$ U/ml ウシ TSH (Armour Thyrotropin) を加えて作成し、ファルコン社製組織培養フラスコ (No. 3013) を用い、37°C, 5%  $CO_2$ , 95% Air で培養し、培地の交換は 2 日に 1 回行った。

### 6. 甲状腺培養細胞に及ぼす THB の影響

培養 5 日目の甲状腺単層培養細胞を 1 mM EDTA を含む 0.05% トリプシン液 (pH7.4) で集め、50  $\times$ g, 5 分間低速遠心して甲状腺細胞を単離し、クレブス・リンゲル重炭酸緩衝液 (pH7.4) で  $5 \times 10^6$ /ml の細胞浮遊液を調製した。ファルコンチューブ (No. 2073) に 200  $\mu$ l の甲状腺細胞浮遊液と、50  $\mu$ l の THB (最終濃度  $10^{-5}$ M) 又は PTU (最終濃度  $10^{-5}$ M) を加え、37°C, 5%  $CO_2$ , 95% Air 下でインキュベートした。6, 12, 24 および 48 時間後、チューブを遠心し細胞と上清を分離した。上清の  $T_4$ ,  $T_3$  を 2 抗体ラジオイミュノアッセイ (栄研  $T_4$ ,  $T_3$  リアキット) で測定した。超音波細胞破壊操作 (Tomy-Seiko Handy sonic, 東京) 後、細

胞内  $T_4$ ,  $T_3$  を同様に測定した。

### 7. 肝細胞培養法

無菌的に摘出したラット肝を剪刀を用いて細切りした。細切りした肝細胞はハンクス液 (日本製薬, 東京) で洗浄後、0.05% コラゲナーゼ (Sigma, Type I) 液 (pH7.4) で 10 分間振盪し連続消化した。ナイロンストッキングで濾過して得られた単離細胞をハンクス液で 50  $\times$ g, 5 分間低速遠心し、トリパンブルーで染色し viability を算出した。培地は 10% FCS および 292 mg/l の L-グルタミンを含むイーグルミニマルエッセンシャル培地 (Eagle Minimal Essential Medium, 以下 MEM と略, 日本製薬, 東京) を用い、ファルコン社製組織培養フラスコ (No. 3013) を用い、37°C, 5%  $CO_2$ , 95% Air 下で培養した。

### 8. 培養肝細胞の $T_4$ 脱ヨード活性に及ぼす THB の影響

培養 3 日目の肝細胞を 3 mM EDTA を含む 0.2% トリプシン (pH7.4) で集め、50  $\times$ g, 5 分間低速遠心した後、MEM を加え肝細胞浮遊液を調製した。0.25  $\mu$ M L- $T_4$  および各濃度 ( $10^{-6}$ ~ $10^{-4}$ M) の THB を加えた MEM 培地をファルコンチューブ (No. 2073) に分注し、各チューブは  $1 \times 10^6$  の肝細胞数に調製し全量を 5 ml とした。37°C, 5%  $CO_2$ , 95% Air 下でインキュベートし、3, 6, 12 および 24 時間後に培地の上清 100  $\mu$ l を取り生成  $T_3$  を前述の方法で測定した。

### 9. 肝細胞膜 $T_4$ 受容体に対する THB の影響

ラット肝細胞膜調製は Emmelet 法<sup>12)</sup>によった。調製肝細胞膜と 0.1  $\mu$ M  $^{125}$ I- $T_4$  (1200  $\mu$ ci/ $\mu$ g, New England Nuclear Corp., 英国) を含む 300  $\mu$ l の 20 mM Tris-HCl-2 mM EDTA-1 mM  $MgCl_2$ -10 mM NaCl-0.2 M sucrose-1 mM dithiothreitol (pH7.4) を水中でブレインキュベートした。1 時間後 THB ( $10^{-6}$ ~ $10^{-4}$ M) 又は非標識 L- $T_4$  ( $10^{-7}$ ~ $10^{-9}$ M) を加えて全量を 1 ml とした。THB 又は非標識 L- $T_4$  を加えてから 5 分, 10 分, 30 分後に 10000  $\times$ g, 2°C, 5 分間遠心し、上清を捨て沈渣の放射活性をアロカオートガンマスペクトロメーターでカウントした。肝細胞膜  $T_4$ 受容体と  $^{125}$ I- $T_4$  結合阻害効果は、THB および非標識 L- $T_4$  添加前の沈渣中の放射活性に対する百分率で算出した。

### 10. $T_4$ 結合グロブリン ( $T_4$ -binding globulin, 以下 TBG と略) の $T_4$ 結合能に与える THB の影響

栄研チューブに 50  $\mu$ l の標準 TBG 血清 (2  $\mu$ g/ml, 栄研 TBG リアキット) と 50  $\mu$ l の THB (最終濃度  $10^{-3}$ ~ $10^{-9}$ M), 100  $\mu$ l の  $^{125}$ I- $T_4$  (1200  $\mu$ ci/ $\mu$ g, New England Nuclear Corp., 英国) を加え、0.1 M リン酸緩衝液 (pH7.4) で全量を 250  $\mu$ l とした。同一 THB

濃度のチューブ3系列をつくり、各々に0, 5, 50 nMの非標識L-T<sub>4</sub> 50  $\mu$ lを加え室温で3時間放置した後、ウサギ抗TBG抗血清を200  $\mu$ l加え、1時間室温に放置した。抗ウサギIgGヒツジ血清を100  $\mu$ l加え室温に30分放置後、3000 rpm, 4°C, 30分間遠心し、上清を捨て沈渣の放射活性をオートガンマスペクトロメーター(アロカ社, 東京)でカウントした。各サンプルの<sup>125</sup>I-T<sub>4</sub>とTBGの結合能を、THBおよび非標識T<sub>4</sub>を加えない対照に対する放射活性の百分率で算出した。

#### IV. in vivo 実験系

1. 幼若ラットにおけるTHB投与のT<sub>4</sub>末梢代謝への影響

1) 3週日齢のウィスター系ラットを4群に分け、対照群, THB投与群, PTU投与群, THBおよびPTU併用群とした。THBは皮下投与とし、第1週は1 mgを7日間連日, 1日1回, 第2週は2 mgを7日間連日1日1回投与した。PTUは0.01%溶解液を特殊給水ボトルで自由飲水させた。対照群には生食を皮下投与した。実験第15日にラットをエーテル麻酔下で心腔穿刺による採血後、直ちに肝・腎および甲状腺を摘出し、血液は血清分離し、T<sub>4</sub>, T<sub>3</sub>濃度を前述の方法で測定した。

甲状腺は重量計測の後0.1 Mリン酸緩衝液(pH7.4)を加えてホモジナイズし、エタノールで抽出した甲状腺内T<sub>4</sub>およびT<sub>3</sub>を前述の方法で測定した。摘出肝および腎は直ちにホモジナイズし、T<sub>4</sub>5'脱ヨード活性、アルファグリセリン酸脱水素酵素( $\alpha$ -glycerophosphate dehydrogenase, 以下 $\alpha$ -GPDと略)活性およびNa-K依存性アデノシン三リン酸酵素(Na-K dependent Adenosine Triphosphatase, 以下Na-K ATPアーゼと略)活性の測定に用いた。

2) 3週日齢のウィスター系ラット30匹に0.05% PTUを特殊給水ボトルで12日間自由飲水させて、甲状腺機能低下ラットを作成した。実験第13日にPTU継続投与群6匹を機能低下対照群として残し、残りの24匹の腹腔内にL-T<sub>4</sub> 20  $\mu$ gを1回投与した。第14日にその24匹を4群に分け、T<sub>4</sub>補充対照群(THB非投与群)を除く3群にそれぞれ0.2 mg, 2 mg, 10 mgのTHBを1日1回, 4日間連続皮下投与した。対照群には生食を皮下投与した。THB最終投与の翌日、ラットをエーテル麻酔下で心腔穿刺による採血後直ちに肝、腎を摘出し、血液は血清を分離し、T<sub>4</sub>およびT<sub>3</sub>濃度を前述の方法で測定した。摘出肝および腎は直ちにホモジナイズし、T<sub>4</sub>5'脱ヨード活性、 $\alpha$ -GPDおよびNa-K ATPアーゼ活性の測定に用いた。

2. 肝ミトコンドリア分画 $\alpha$ -GPD活性の測定

肝ミトコンドリア分画の調製はLee法<sup>13)</sup>により、 $\alpha$ -GPD活性測定はLeeの変法<sup>13)</sup>によった。15  $\mu$ Mのアルファグリセリン酸( $\alpha$ -glycerophosphate, Sigma), 12.5  $\mu$ M K<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>および0.3  $\mu$ M KCNの混合液(pH7.5)の100  $\mu$ lに50  $\mu$ lの肝ミトコンドリア分画調製液を加え、30°C, 10分間インキュベートした。300  $\mu$ lの蒸留水を加えた後、200  $\mu$ lのPMS-INT液(2.5 mg phenazine methosulfate および4 mgの2-p-iodophenyl-3-p-nitrophenyl-5-phenylmonotetrazolium chlorideを1 mlの0.5 Mリン酸カリ緩衝液に溶解)を加えた。15分間室温に放置後100  $\mu$ lの10%トリクロロ酢酸(trichloroacetic acid)を加え、さらに95%エタノール2.5 mlを加え遠心し、上清を比色光度計(日立スペクトロメーター, 24型, 東京)により測定した。 $\alpha$ -GPD活性は $\mu$ M/min/mg-proteinで算出し、蛋白定量はLowry法によった。

3. 腎Na-K ATPアーゼ活性の測定

腎細胞膜の調製およびNa-K ATPアーゼ活性の測定はChu-Shekの方法<sup>14)</sup>によった。50  $\mu$ lの細胞膜調製液に、400  $\mu$ lの0.1 M NaCl, 0.02 M KCl, 0.003 M MgCl<sub>2</sub>, 0.001 M EDTAを含むトリス塩酸緩衝液(pH7.4)を加え、30 mM ATPを50  $\mu$ l添加し、37°C, 15分間インキュベートした。100  $\mu$ lの30%トリクロロ酢酸を加え、遠心後上清200  $\mu$ l中の生成無機リン(Pi)をFiske法<sup>15)</sup>により測定し、総ATPアーゼ活性とした。同様にしてNaCl, KClを含まない緩衝液を用いてマグネシウム-カルシウム依存性ATPアーゼ(Mg-Ca dependent ATPase)活性を測定し、両者の差をNa-K ATPアーゼ活性とした。活性はmM-Pi/min/mg-proteinで算出し、蛋白定量はLowry法によった。

4. 胎児および新生児ラットに及ぼすTHBの影響

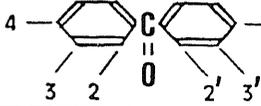
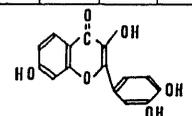
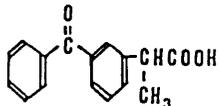
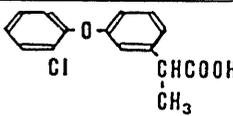
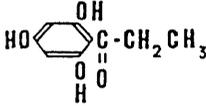
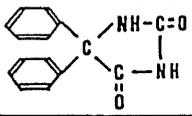
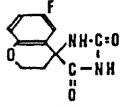
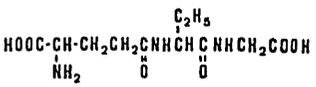
妊娠1週のウィスター系雌ラットを4群に分け、I群は出産前後にわたる2週間10 mgのTHBを1日1回連日腹腔内投与した。II群は出産直後より2週間、III群は出産後8日より14日までの1週間同様の処置を行い、対照群には出産前後の2週間生食を腹腔内投与した。仔ラットは3週日齢にエーテル麻酔下で心腔穿刺採血後直ちに肝を摘出した。血液は血清分離し、T<sub>4</sub>およびT<sub>3</sub>を前述の方法で測定し、摘出肝でT<sub>4</sub>5'脱ヨード活性および $\alpha$ -GPD活性を測定した。

## 成 績

1. T<sub>4</sub>脱ヨード酵素活性に及ぼす化合物および補酵素の影響

使用した各種化合物はID<sub>50</sub>に基き3群に分けられ

図 1

	benzophenone							ID <sub>50</sub> (M)
		Substituents						
		2	3	4	2'	3'	4'	
1	2, 4, 4' (OH) <sub>3</sub> benzophenone	OH	H	OH	H	H	OH	10 <sup>-5</sup>
	2, 2', 3, 4, 4' (OH) <sub>5</sub> benzophenone	OH	OH	OH	OH	H	OH	> 10 <sup>-3</sup>
	2, 2', 3, 3', 4, 4' (OH) <sub>6</sub> benzophenone	OH	OH	OH	OH	OH	OH	> 10 <sup>-3</sup>
	2, 4(OH) <sub>2</sub> 4'(CH <sub>3</sub> ) benzophenone	OH	H	OH	H	H	CH <sub>3</sub>	10 <sup>-4</sup>
	2(NH <sub>3</sub> ) benzophenone	NH <sub>3</sub>	H	H	H	H	H	N.I
	3(CH <sub>3</sub> ) benzophenone	H	CH <sub>3</sub>	H	H	H	H	N.I
	Quercetin							10 <sup>-3</sup>
3-benzoylhydratropic acid							10 <sup>-4</sup>	
α[3(2-chlorophenoxy)phenyl]-propionic acid							10 <sup>-3</sup>	
2', 4', 6' (OH) <sub>3</sub> propiophenone							N.I	
2	Diphenylhydantoin							10 <sup>-3</sup>
	Spirohydantoin							10 <sup>-3</sup>
3	Ophthalmic acid							N. I

N. I: No inhibition

Fig. 1. Chemical structure and 50 per cent inhibition dose (ID<sub>50</sub>) of the compounds tested. Group 1 includes phenolic or phenylic compounds containing ketone group or ether bridge. Group 2 consists of imidazol-ring compounds and group 3 has linear structure with functional ketone groups and -NH- bridges.

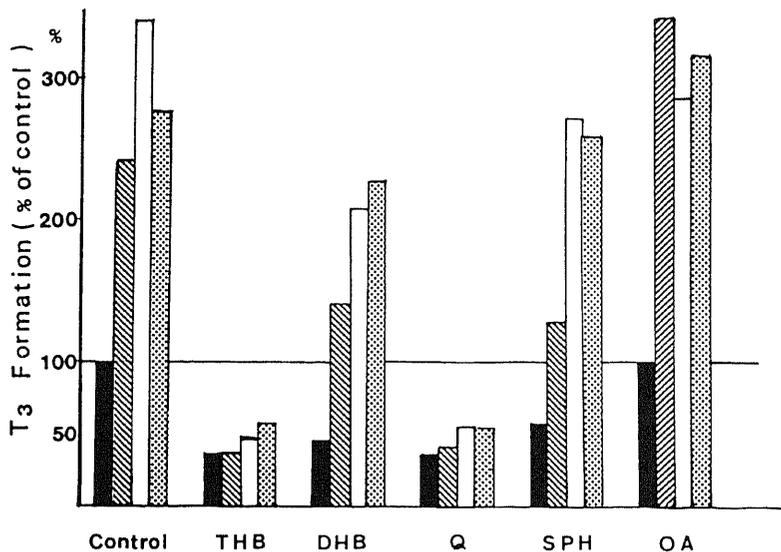


Fig. 2. Restoration of  $T_4$ 5'-deiodinase inhibition with the addition of NADPH and/or reduced glutathione (GSH). Hepatic  $T_4$ 5'-deiodinase activity was assayed in the presence of  $10^{-4}$ M inhibitor with 0.5 mM NADPH ( $\square$ ), 5 mM GSH ( $\text{▨}$ ), 0.5 mM NADPH+5 mM GSH ( $\text{▩}$ ) or without the cofactors ( $\blacksquare$ ). Each value represents mean of duplicate samples and is expressed as a per cent activity for control samples without inhibitor. THB, trihydroxybenzophenone; DHB, dihydroxy-methylbenzophenone; Q, quercetin; SPH, spirohydantoin; OA, ophthalmic acid.

た。即ち THB が  $10^{-5}$ M で阻害効果が最も強く、以下  $10^{-4}$ M の 2,4 ジハイドロキシメチルベンゾフェノン および 3 ベンゾイルヒドラトロピン酸、 $10^{-3}$ M の ケルセチン、アルファー 3 (2-クロロフェノキシ) フェニールプロピオン酸、ジフェニールヒダントイン、スピロヒダントインの順であり、2,2',3,4,4'ペンタハイドロキシベンゾフェノン、2,2',3,3',4,4'ヘキサハイドロキシベンゾフェノン、2',4',6'トリハイドロキシプロピオフェノン、2-アミノベンゾフェノン、3-メチルベンゾフェノンおよびオフタルミン酸には検討した濃度範囲では  $T_4$ 5'脱ヨード活性抑制効果を認めなかった。陽性対照として用いた PTU の  $ID_{50}$  は  $10^{-6}$ M であった (図 1)。

2,4 ジハイドロキシメチルベンゾフェノンおよびスピロヒダントインの阻害効果は NADPH および GSH の添加により回復したが、THB およびケルセチンでは阻害効果の解消を認めなかった (図 2)。

## 2. $T_4$ 脱ヨード活性に対する $T_4$ , THB の用量反応関係

THB の  $T_4$ 5'脱ヨード活性阻害効果は基質  $T_4$ 濃度依存性でライン・ウェーバー、パークプロット解析より、その阻害形式は基質  $T_4$  との競合阻害と考えられた (図 3)。

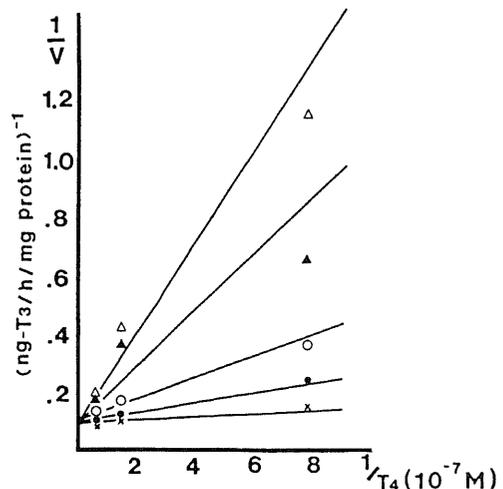


Fig. 3. Line-Weaver Burk plots of the dose-response relationship between THB and generated  $T_3$ . The relation was examined in the presence of 0 M ( $\times$ ),  $10^{-5}$ M ( $\bullet$ ),  $3 \times 10^{-5}$ M ( $\circ$ ),  $10^{-4}$ M ( $\blacktriangle$ ),  $3 \times 10^{-4}$ M ( $\triangle$ ) of THB. Each value represents mean of duplicate samples and the regression lines were obtained by the least square method.

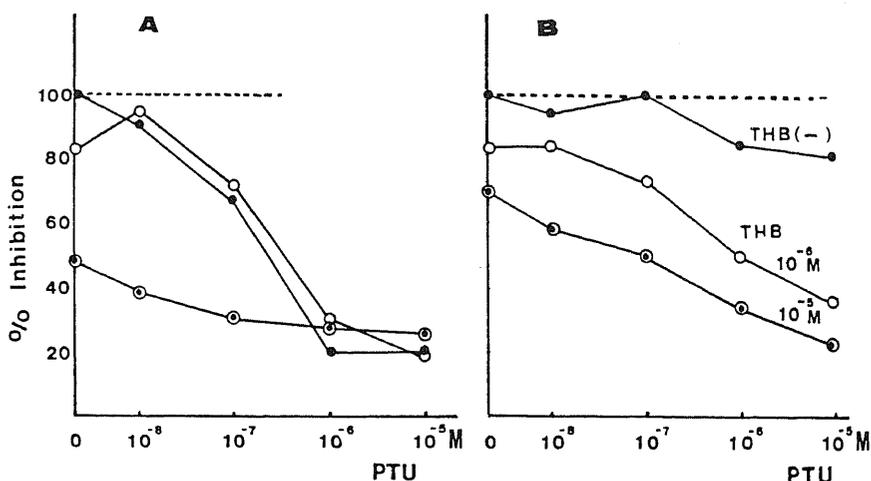


Fig. 4. Combined effect of THB and PTU on T<sub>4</sub>,5'-deiodinase activity in fresh (panel A) and stocked (panel B) liver homogenates. T<sub>4</sub>,5'-deiodinase activity was assayed with the addition of 10<sup>-6</sup>M (○), 10<sup>-5</sup>M (●) or without THB (●) to varied doses (0-10<sup>-5</sup>M) of PTU. In stocked liver homogenate, 0.5 mM NADPH and 5 mM GSH were added as the cofactors. Values are expressed as a per cent activity of control samples without inhibitors.

### 3. T<sub>4</sub>脱ヨード活性に対する THB と PTU の併用効果

低濃度(10<sup>-6</sup>, 10<sup>-7</sup>M)の PTU (ID<sub>50</sub>=10<sup>-6</sup>M)と 10<sup>-5</sup>M THB の併用で明らかな T<sub>4</sub>,5'脱ヨード活性抑制相乗効果を認めた (図4)。

### 4. 甲状腺培養細胞に及ぼす THB の影響

培地中への T<sub>4</sub>分泌は 10<sup>-5</sup>M THB の添加で促進(24時間後 189%)され、逆に T<sub>3</sub>分泌は培養 24 時間以降も抑制(48 時間後 59%)された(図5)。一方、甲状腺細胞内 T<sub>3</sub>は培養 24~48 時間は培地中の T<sub>3</sub>に平行し、対照の 50%に減少した。甲状腺細胞内 T<sub>4</sub>濃度には対照と差がなかった(図6)。

### 5. 培養肝細胞に及ぼす THB の影響

培養肝細胞における L-T<sub>4</sub>から T<sub>3</sub>への転化は 10<sup>-5</sup>M THB の添加により、肝ホモジネートの場合と同様に抑制(24 時間後 61%)された(図7)。

### 6. 肝細胞膜 T<sub>4</sub>受容体に対する THB の影響

肝細胞膜 T<sub>4</sub>受容体に結合した <sup>125</sup>I-T<sub>4</sub>は、10<sup>-4</sup>~10<sup>-6</sup>M THB により濃度依存性に排除された(図8)。

### 7. TBG の T<sub>4</sub>結合能に対する THB の影響

<sup>125</sup>I-T<sub>4</sub>と TBG の結合は、10<sup>-3</sup>~10<sup>-6</sup>M THB により濃度依存性に阻害された。10<sup>-3</sup>M THB の阻害効果は 50 nM の非標識 L-T<sub>4</sub>の添加で解消した(図9)。

8. 幼若ラットにおける THB 投与の T<sub>4</sub>代謝への影響

#### 1) 体重増加率 (図10)

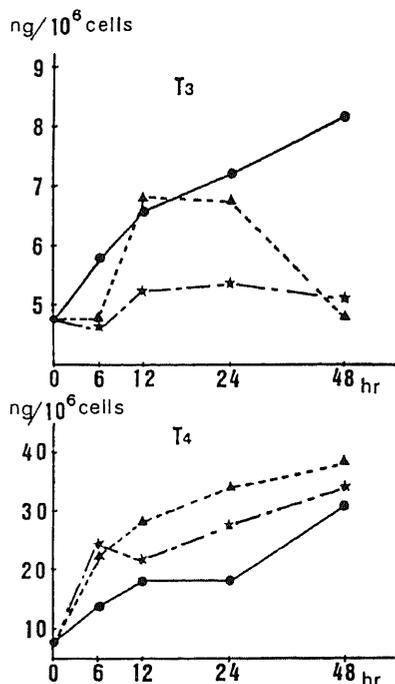


Fig. 5. Effect of THB or PTU on secretion of T<sub>3</sub> (upper panel) and T<sub>4</sub> (lower panel) into medium from cultured thyroid cells. THB (▲) or PTU (★) was added at 10<sup>-5</sup>M concentration and release of T<sub>3</sub> and T<sub>4</sub> during 48 hrs of incubation period was compared with control (●). Each value represents mean of triplicate samples.

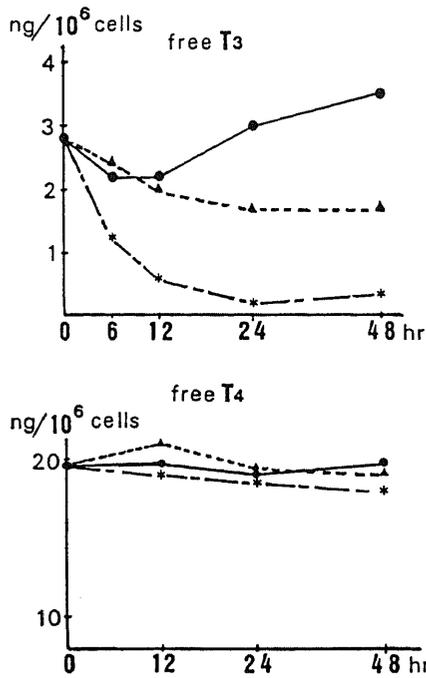


Fig. 6. Effect of THB or PTU on intracellular concentration of T<sub>3</sub> (upper panel) and T<sub>4</sub> (lower panel) in cultured thyroid cells. THB (▲) or PTU (\*) was added at 10<sup>-5</sup>M concentration. After 0, 6, 12, 24 and 48 hrs of incubation, thyroid cells were separated by centrifugation, washed, sonicated and T<sub>3</sub> and T<sub>4</sub> concentrations were assayed. Control values are expressed with (●).

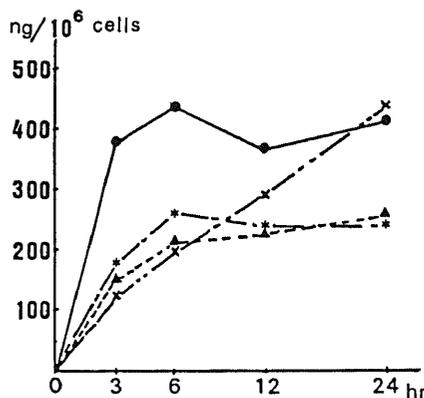


Fig. 7. Effect of graded doses of THB on conversion of T<sub>4</sub> to T<sub>3</sub> in cultured liver cells. T<sub>4</sub> was added to medium at 0.25 μM concentration with 10<sup>-6</sup>M (×), 10<sup>-5</sup>M (▲), 10<sup>-4</sup>M (\*) or without THB (●). After 3, 6, 12, and 24 hrs of incubation, T<sub>3</sub> concentration in the medium was measured. Each value represents mean of triplicate samples.

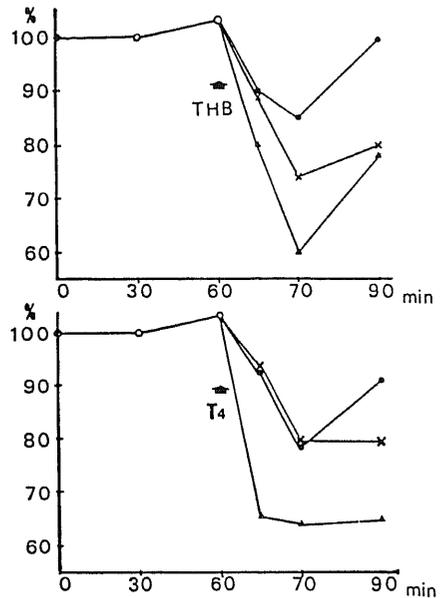


Fig. 8. Displacement of <sup>125</sup>I-T<sub>4</sub> bound to plasma membrane from liver by THB (upper panel) and by cold T<sub>4</sub>. After 60 min of equilibrium, 10<sup>-6</sup>M (●), 10<sup>-5</sup>M (×), 10<sup>-4</sup>M (▲) THB or 10<sup>-7</sup>M (●), 10<sup>-6</sup>M (×), 10<sup>-5</sup>M (▲) T<sub>4</sub> were added. After 5, 10 and 30 min, radioactivity of membrane pellet was measured, and count was expressed as a per cent of control samples without THB nor T<sub>4</sub>. On molar basis, displacing potency of THB is one tenth of T<sub>4</sub>.

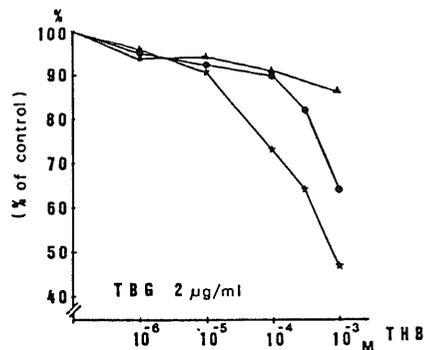


Fig. 9. Competitive inhibition of graded doses of THB with T<sub>4</sub> in <sup>125</sup>I-T<sub>4</sub> binding to thyroglobulin-binding protein (TBG). Mixture of TBG (2 μg/ml), graded dose of THB (10<sup>-6</sup>-10<sup>-3</sup>M), <sup>125</sup>I-T<sub>4</sub> and unlabelled T<sub>4</sub> (0, ★; 5 nM, ●; 50 nM, ▲) was incubated for 3 hrs. TBG was precipitated by the addition of anti-TBG antiserum and radioactivity of the pellet was measured. Value is expressed as a per cent of control samples without THB nor cold T<sub>4</sub>. Dose-dependent inhibition of labelled T<sub>4</sub>-binding to TBG by THB is attenuated with the addition of cold T<sub>4</sub>.

THB群およびPTU群の平均体重増加率は対照群に比して軽度低下していたが、統計学的有意差は認められなかった。しかしTHB+PTU群の増加率は対照群に比し有意に低下していた( $p < 0.01$ )。外見上特に

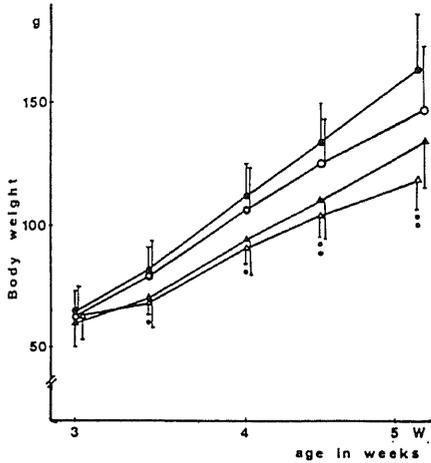


Fig. 10. Body weight gain. Body weight gain of young rats administered THB (▲), PTU (○), and THB+PTU (△) in comparison with control (●). Vertical bar indicates mean  $\pm$  SD. \* $p < 0.005$ , \*\* $p < 0.01$  vs control group.

一般状態の異常、中毒症状は認められなかった。

## 2) 甲状腺重量と $T_4$ , $T_3$ 含量 (表 1)

甲状腺重量は対照群  $13.5 \pm 1.3$  mg に比し、THB群は  $7.1 \pm 2.1$  mg と著明に減少 ( $p < 0.001$ ) し、 $T_4$  および  $T_3$  含量も対照群の  $649 \pm 172$  ng/腺、 $42 \pm 10$  ng/腺に比し、 $285 \pm 79$  ng/腺、 $25 \pm 13$  ng/腺と有意に減少していた (各々  $p < 0.01$ ,  $p < 0.05$ )。一方、PTU群では甲状腺の腫大 ( $43.6 \pm 13.0$  mg,  $p < 0.001$ ) と著明な  $T_4$  および  $T_3$  含量の低下が認められた (各々  $3.1 \pm 0.3$  ng/腺、 $2.5 \pm 1.1$  ng/腺,  $p < 0.001$ )。THB+PTU群では、腺腫の形成に加えてホルモン含量は更に減少し、 $T_4$  値は測定感度以下であった。

## 3) 血清 $T_4$ , $T_3$ 濃度と肝 $T_4$ 脱ヨード活性 (表 2)

PTU群およびTHB+PTU群では血清  $T_4$  濃度は対照群の  $4.5 \pm 0.5$   $\mu$ g/dl より有意に低下 ( $1.0 \pm 0.2$   $\mu$ g/dl,  $0.8 \pm 0.1$   $\mu$ g/dl,  $p < 0.001$ ) したが、THB群は  $4.8 \pm 1.0$   $\mu$ g/dl と正常域に保たれていた。一方、血清  $T_3$  濃度はいずれの実験群においても対照群に比し有意に低下していた。肝  $T_4$  5'脱ヨード酵素活性も血清  $T_3$  値と平行し、対照  $9.1 \pm 2.1$  (ng/h/mg-protein) に対し THB群  $5.8 \pm 1.0$ 、PTU群  $2.1 \pm 0.3$ 、THB+PTU群  $1.8 \pm 0.3$  と有意の低下が認められた。

## 4) 肝 $\alpha$ -GPD 活性と腎 ATP アーゼ活性 (表 3)

肝  $\alpha$ -GPD 活性は対照群  $5.8 \pm 0.7$  ( $\mu$ moles/min/

Table 1. Weight of the thyroid gland and its  $T_4$  and  $T_3$  contents after chronic administration of THB and/or PTU.

Experimental group	No. of rats	Thyroid weight (mg)	$T_4$ (ng/gland)	$T_3$ (ng/gland)
Control	5	$13.5 \pm 1.3$	$649 \pm 172$	$42 \pm 10$
THB	5	$7.1 \pm 2.1$ ***	$285 \pm 79$ **	$25 \pm 13$ *
PTU	5	$43.6 \pm 13.0$ ***	$3.1 \pm 0.3$ ***	$2.5 \pm 1.1$ ***
THB+PTU	5	$35.5 \pm 10.0$ ***	UD	$2.0 \pm 0.8$ ***

\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$  vs control. UD; undetectable. Values are expressed in mean  $\pm$  SD.

Table 2. Serum  $T_4$  and  $T_3$  concentration and hepatic  $T_4$  5'-deiodinase activity after 2 weeks of THB and/or PTU administration (mean  $\pm$  SD.)

Experimental group	No. of rats	Serum $T_4$ ( $\mu$ g/100ml)	Serum $T_3$ ( $\mu$ g/100ml)	$T_4$ 5'-deiodinase (ng/ $T_3$ /h/mg-protein)
Control	5	$4.5 \pm 0.5$	$100 \pm 15$	$9.1 \pm 2.1$
THB	5	$4.8 \pm 1.0$	$67 \pm 10$ **	$5.8 \pm 1.0$ *
PTU	5	$1.0 \pm 0.2$ **	$30 \pm 11$ **	$2.1 \pm 0.3$ **
THB+PTU	5	$0.8 \pm 0.1$ **	$20 \pm 4$ **	$1.8 \pm 0.3$ **

\* $p < 0.01$ , \*\* $p < 0.001$  vs control value.

mg-protein)に対し, THB群  $3.3 \pm 0.6$ , PTU群  $2.3 \pm 0.5$ , THB+PTU群  $2.0 \pm 0.3$  と有意の低下が認められた ( $p < 0.001$ ). 腎 ATP アーゼ活性も, 総 ATP アーゼ活性で実験群に有意の低下が認められた ( $p < 0.02 \sim 0.01$ )が,  $\alpha$ -GPD 活性に認められたほどの顕著な変化ではなかった. しかし THB+PTU 併用により, いずれの酵素活性に対しても明らかな相乗効果を認めた.

#### 9. T<sub>4</sub>補充効果に対する THB の影響

前述の THB の効果が T<sub>4</sub> の末梢作用に対して特異

的か否かを検討する意味で, PTU 投与によって甲状腺機能低下ラットを作成し, これに T<sub>4</sub> を補充投与し, THB がいかに T<sub>4</sub> の作用を阻害するかを検討した. PTU 経口投与によって血中 T<sub>4</sub>  $0.3 \pm 0.05 \mu\text{g/dl}$ , T<sub>3</sub>  $40 \pm 11 \text{ ng/dl}$  と明らかな機能低下状態になり, これらのラットに  $20 \mu\text{g}$  の T<sub>4</sub> を 1 回投与すると血中 T<sub>4</sub>  $4.7 \pm 0.6 \mu\text{g/dl}$ , T<sub>3</sub>  $82 \pm 15 \text{ ng/dl}$  と機能正常化が認められた (表 5). この過程で  $0.2 \text{ mg}$ ,  $2 \text{ mg}$ ,  $10 \text{ mg}$  の THB を 4 日間連続投与した場合,  $10 \text{ mg}$  投与群では体重増加率が明らかに抑制された ( $p < 0.01$  vs T<sub>4</sub> 補

Table 3. Hepatic GPD and renal ATPase activities after 2 weeks of THB and/or PTU administration (mean  $\pm$  SD).

Experimental group	No. of rats	GPD ( $\mu\text{moles/min/mg-prot}$ )	ATPase	
			Total (Na-K-Mg) ( $\mu\text{moles/min/mg-Protein}$ )	(Na-K)
Control	5	$5.8 \pm 0.7$	$3.0 \pm 0.3$	$1.0 \pm 0.2$
THB	5	$3.3 \pm 0.6^{***}$	$2.5 \pm 0.2^*$	$0.8 \pm 0.3$
PTU	5	$2.3 \pm 0.5^{***}$	$2.5 \pm 0.2^*$	$0.7 \pm 0.1^*$
THB+PTU	5	$2.0 \pm 0.3^{***}$	$2.4 \pm 0.3^{**}$	$0.6 \pm 0.2^{**}$

\* $p < 0.02$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$  vs control value.

Table 4. Body weight on 12th day of PTU administration and on 5th day of T<sub>4</sub> and/or THB treatment (mean  $\pm$  SD).

Experimental group	Number of rats	Body weight (g)	
		12th day of PTU	5th day of T <sub>4</sub> /THB
PTU	6	$115 \pm 8$	$128 \pm 10$
T <sub>4</sub>	6	$119 \pm 6$	$150 \pm 7 \text{ §}$
T <sub>4</sub> +0.2mg THB	6	$120 \pm 5$	$146 \pm 7$
T <sub>4</sub> +2mg THB	6	$120 \pm 4$	$149 \pm 5$
T <sub>4</sub> +10mg THB	6	$117 \pm 8$	$134 \pm 8^*$

\* $p < 0.01$  vs T<sub>4</sub> group, § $p < 0.001$  vs PTU group.

Table 5. Serum T<sub>4</sub> and T<sub>3</sub> concentration (mean  $\pm$  SD).

Experimental group	No. of rats	Serum T <sub>4</sub> ( $\mu\text{g}/100\text{ml}$ )	Serum T <sub>3</sub> (ng/100ml)
PTU	6	$0.3 \pm 0.05$	$40 \pm 11$
T <sub>4</sub>	6	$4.7 \pm 0.6 \text{ §}$	$82 \pm 15 \text{ §}$
T <sub>4</sub> +0.2mg THB	6	$4.1 \pm 0.7$	$112 \pm 22^*$
T <sub>4</sub> +2mg THB	6	$6.4 \pm 1.3^*$	$78 \pm 8$
T <sub>4</sub> +10mg THB	6	$3.7 \pm 1.1$	$63 \pm 20$

§ $p < 0.001$  vs PTU group, \* $p < 0.02$  vs T<sub>4</sub> group.

充群) (表4)。一方、血中 $T_4$ 濃度は2mg投与群で $6.4 \pm 1.3 \mu\text{g}/\text{dl}$ と有意の高値 ( $p < 0.02$ ) を、 $T_3$ 濃度は0.2mg投与群で $112 \pm 22 \text{ ng}/\text{dl}$ と高値を示した ( $p < 0.02$ ) (表5)。肝 $T_4$ 5'脱ヨード酵素活性は対照の $T_4$ 補充群 $4.9 \pm 0.5 \text{ (ng-T}_3\text{/h/mg-protein)}$ に比し、0.2mg投与群で $6.3 \pm 0.8$ と有意に上昇し、2ng、10ng投与群では $2.8 \pm 0.7$ 、 $2.8 \pm 1.5$ と有意の低下が認められ、二相性の効果を示した。肝 $\alpha$ -GPD活性の $T_4$ 投与による上昇効果は10mg投与群で有意に抑制 ( $p < 0.02$ )され、腎Na-K ATPアーゼ活性も2mg、10mg投与群で有意の抑制効果を認めた ( $p < 0.001$ ,  $p < 0.01$  vs  $T_4$ 補充群) (表6)。

10. 胎児および新生児ラットに与える THB の影響 (表7)

上述した THB の作用が非特異的毒性によるものか否か、また甲状腺ホルモン依存成長期に対する影響をみるために、胎児期およびラットにおける甲状腺ホルモン依存期 (生後1~2週) をえらんで THB を投与し、その影響を検討した。生下時体重は対照群 $5.4 \pm$

0.3g、I群 $5.9 \pm 0.3$ g、II群 $5.3 \pm 0.3$ g、III群 $5.2 \pm 0.3$ gといずれの群にも差はなく、胎児期の成長に対して THB は影響を及ぼさなかった。

血中 $T_4$ 濃度はIII群でやや低下 ( $p < 0.01$  vs 対照群)する他は、対照群と差を認めなかった。血中 $T_3$ 濃度はTHB投与群全群で著明に低下 (I群 $p < 0.01$ , II群 $p < 0.001$ , III群 $p < 0.001$  vs 対照群)し、 $T_4$ 5'脱ヨード活性の低下 (全群 $p < 0.001$  vs 対照群)および $\alpha$ -GPD活性の低下 (I群 $p < 0.05$ , II群 $p < 0.001$ , III群 $p < 0.01$  vs 対照群)が認められた。

### 考 察

現在臨床および実験的に使用されている抗甲状腺剤の多くは、甲状腺ホルモン合成系の特定部位を抑制することで効果を呈し、その結果血中甲状腺ホルモンが低下し、下垂体からの甲状腺刺激ホルモン (thyroid-stimulating hormone, 以下 TSH と略) 分泌の亢進をうながし、甲状腺腫を招来するため goitrogen とも呼ばれている。一方、血中に存在する $T_3$ の約80%は末

Table 6. Hepatic  $T_4$  5'-deiodinase, GPD and renal Na-K ATPase activities.

Experimental group	No. of rats	$T_4$ deiodinase (ng $T_3$ /h/mg-prot)	GPD ( $\mu\text{moles}/\text{min}/\text{mg-protein}$ )	Na-K ATPase ( $\mu\text{moles}/\text{min}/\text{mg-protein}$ )
PTU	6	$0.9 \pm 0.1$	$1.9 \pm 0.2$	$0.59 \pm 0.04$
$T_4$	6	$4.9 \pm 0.6$ §	$2.9 \pm 0.3$ §	$0.74 \pm 0.03$ §
$T_4 + 0.2\text{mg THB}$	6	$6.3 \pm 0.8^{**}$	$2.7 \pm 0.3$	$0.70 \pm 0.07$
$T_4 + 2\text{mg THB}$	6	$2.8 \pm 0.7^{***}$	$2.6 \pm 0.5$	$0.65 \pm 0.02^{***}$
$T_4 + 10\text{mg THB}$	6	$2.8 \pm 1.5^{**}$	$2.4 \pm 0.3^*$	$0.60 \pm 0.05^{**}$

§  $p < 0.001$  vs PTU group, \*  $p < 0.02$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$  vs  $T_4$  group. Values are expressed in mean  $\pm$  SD.

Table 7. Effects of THB administration on serum  $T_4$  and  $T_3$  concentrations, hepatic  $T_4$  5'-deiodinase and  $\alpha$ -glycerophosphate dehydrogenase ( $\alpha$ -GPD) activity during fetal and neonatal period.

Experimental groups	Control	I	II	III
Number of samples	6	6	6	6
serum $T_4$ ( $\mu\text{g}/100\text{ml}$ )	$2.7 \pm 0.3$	$2.7 \pm 0.2$	$2.7 \pm 0.3$	$2.0 \pm 0.4^*$
serum $T_3$ (ng/100ml)	$96 \pm 18$	$65 \pm 8^*$	$46 \pm 6^{**}$	$41 \pm 8^{**}$
$T_4$ 5'-deiodinase (ng/h/mg-protein)	$1.07 \pm 0.17$	$0.52 \pm 0.11^{**}$	$0.66 \pm 0.12^{**}$	$0.54 \pm 0.08^{**}$
$\alpha$ -GPD ( $\mu\text{M}/\text{min}/\text{mg-protein}$ )	$38.6 \pm 6.2$	$31.5 \pm 2.9$ #	$25.5 \pm 3.4^{**}$	$28.6 \pm 3.1^*$

Group I; THB (10 mg) was injected in mother rats for 2 w pre- and postpartum.  
Group II; THB (10 mg) was injected in mother rats for 2 w postpartum.  
Group III; THB (10 mg) was injected in lactating mother rats in the 2nd week after birth.  
Values are expressed in mean  $\pm$  SD. #  $p < 0.05$ , \*  $p < 0.01$ , \*\*  $p < 0.001$  vs control.

梢組織、特に肝、腎での  $T_4$  からの転化に由来するとされ、甲状腺から分泌される  $T_3$  量をはるかに上回っていると考えられている<sup>4)~7)16)~19)</sup>。末梢での  $T_4$  から  $T_3$  への転化は組織中の  $T_4$  5'脱ヨード酵素によって行なわれ、その反応は活性 SH 基依存性であり、ジチオスレイトール (dithiothreitol), メルカプトエタノール (mercaptoethanol), NADPH および GSH 等の SH 基保護剤により促進され、SH 基酸化剤であるジアミド (diamide) や酸化型グルタチオンおよび SH 基遮断剤である N-エチルマレイミド (N-ethylmalaimide) 等により阻害されることが知られている<sup>3)20)~29)</sup>。Saberi 等<sup>30)</sup> は本来甲状腺ホルモン合成阻害剤として使用されている PTU に  $T_4$  5'脱ヨード活性抑制効果のあることを報告し、PTU は酵素蛋白の活性 SH 基と可逆的に結合して活性基を遮断し、非競合的阻害効果を呈し、また NADPH, GSH の添加により阻害効果の回復が見られることが明らかになった<sup>31)</sup>。Chopra<sup>3)</sup> は  $T_4$  の代謝産物である数種のヨード含有サイロニンの  $T_4$  5'脱ヨード活性阻害効果を検討し、3, 3', 5'-トリヨードサイロニン (3, 3', 5'-triiodothyronine, reverse  $T_3$ ) に最も強い競合阻害効果のあることを報告した。またグルココルチコイド (glucocorticoid) が活性 SH 基の酸化をうながし、 $T_4$  5'脱ヨード活性を阻害することも明らかになったが<sup>32)</sup>、現在まで脱ヨード酵素の純化がなされておらず、その作用機序には不明の点が多い。最近 Goswami 等<sup>33)</sup> はクマリン系抗凝固剤のジクマロール (dicumarol) が脱ヨード活性に対して強い競合阻害効果のあることを報告した。また Auf' mkolk 等<sup>10)</sup> も、ある種の植物に含まれているフラビン色素のアリュージジン (Auersidin) に  $T_4$  5'脱ヨード活性競合的阻害効果のあることを報告し、阻害作用に必要な構造上の条件として ①少なくとも 2 個のフェノール環と ② A 環の 1, 3 位, B 環の (3') と 4' 位に水酸基を持ち ③ 両環はケトン基で結合し ④ 2 個のフェノール環は互いに垂直位にある必要があると報告した。以上の構造上の特徴が  $T_4$  に類似していることに着目し、著者は数種の非ヨード含有  $T_4$  類似化合物について  $T_4$  代謝に及ぼす影響を *in vitro* および *in vivo* で検討した。*in vitro* ではカルコン (chalcone) 構造を持つ THB に最も強い  $T_4$  5'脱ヨード活性抑制効果を認めたが、同じ基本構造を持つが水酸基の数の異なる 2, 2', 3, 4, 4'-ペンタハイドロキシベンゾフェノンおよび 2, 2', 3, 3', 4, 4'-ヘキサハイドロキシベンゾフェノンには抑制効果をほとんど認めなかった。一方、THB の  $T_4$  5'脱ヨード活性阻害効果は NADPH および GSH の添加で回復せず、PTU による脱ヨード反応抑制効果とは異なる機序によると考えられた。その阻害機序は  $T_4$  5'脱ヨード活性に

対する  $T_4$  と THB の用量反応関係から、脱ヨード酵素蛋白の  $T_4$  結合部位において基質  $T_4$  と競合するためと考えられた。この点は  $10^{-7}$ ~ $10^{-8}$ M の PTU と  $10^{-5}$  THB の併用により、 $10^{-6}$ M PTU 単独におけるより以上の強い相乗効果が得られることから支持される。

肝ホモジネートを用いて導かれた THB の  $T_4$  5'脱ヨード酵素蛋白と  $T_4$  との結合阻害作用は異った実験系においても確認された。即ち THB は甲状腺培養細胞内では甲状腺ホルモン合成は阻害せず、 $T_4$  から  $T_3$  への転化を阻害し、細胞外への甲状腺ホルモン分泌を促進した。培養肝細胞では  $T_4$  から  $T_3$  への転化が THB で抑制されたが<sup>3</sup>、これに加えて肝細胞膜の  $T_4$  受容体で基質  $T_4$  と THB が競合する機序も想定された。また血清 TBG においても  $T_4$  と THB はその  $T_4$  結合部位で競合し、 $T_4$  の血中輸送に関しても影響を及ぼすことが示唆された。以上の点を総合すると、 $T_4$  5'脱ヨード酵素、肝細胞膜  $T_4$  受容体、甲状腺内サイログロブリンおよび血清 TBG の  $T_4$  結合部位のいずれに対しても、THB は共通した競合阻害作用を示すと考えられる。

以上 *in vitro* で THB の作用と  $T_4$  代謝の間に密接な関連性のあることが示唆されたが<sup>3</sup>、この点をさらに *in vivo* で検討した。100 mg/kg の THB を 2 週間ラットに皮下注射すると、血中  $T_3$  濃度の低下とともに肝ミトコンドリア分画の  $\alpha$ -GPD 活性および腎 Na-K ATP アーゼ活性の低下が認められた。従来より  $\alpha$ -GPD 活性および腎 Na-K ATP アーゼ活性は甲状腺ホルモン依存性で、末梢での甲状腺機能状態をよく反映するといわれている<sup>13)14)39)~41)43)</sup>。即ち Ruegamer 等<sup>39)</sup> は  $\alpha$ -GPD が  $T_4$  に特異的に反応し末梢での  $T_4$  作用を基礎代謝率以上に鋭敏に反映すると報告した。また Lo 等<sup>14)</sup> は甲状腺ホルモンが腎 Na-K ATP アーゼによる細胞膜 Na 輸送に直接的作用を有していると報告し、Katz 等<sup>37)</sup> も甲状腺摘出ラットで低下した Na-K ATP アーゼ活性が  $T_3$  補充により回復することを報告している。今回の実験成績で THB はこれらの酵素活性を低下させ、さらに甲状腺機能低下ラットに対する  $T_4$  補充過程で、 $T_4$  による両酵素活性の回復を阻害することより、その作用は甲状腺ホルモン依存性であることが示唆された。さらに妊娠あるいは授乳期の母ラットに THB を投与した場合、胎児の発育、生下時体重に差を認めず、仔ラットの甲状腺ホルモン依存期 (生後 1~2 週) に一致して発育阻害効果が顕著になり、血中濃度の低下と平行関係を認めた。以上の結果は、THB の直接的阻害作用より、甲状腺ホルモン末梢作用阻害による間接的作用であることを支持するものと考えられる。従って THB は *in vivo* において末梢レ

ベルで甲状腺機能低下状態をもたらすといえよう。

in vivo における THB の効果に関し、従来の抗甲状腺剤にはみられない特徴的所見として、甲状腺腫を発生させず、逆に甲状腺重量の減少と血中  $T_4$  濃度の上昇を来すことがあげられる。この理由としては、in vitro の実験成績に基づいて次の様に推論される。即ち、甲状腺内では  $T_4$  から  $T_3$  への転化が阻害されるが、 $T_4$  の血中への放出は促進される。一方、肝においては  $T_4$  5' 脱ヨード活性の抑制により、 $T_4$  から  $T_3$  への転化が阻害され、その結果末梢レベルでは機能低下状態におちいる。しかし血中  $T_4$  濃度は低下しないので、下垂体よりの TSH 分泌の亢進は起らず、結果的に甲状腺は縮小すると考えられる。この推論の直接的証明には血中 TSH 濃度および下垂体 TSH 含量の変動を測定する必要があるが、この点は将来の問題として残された。

以上の in vitro および in vivo の実験成績から、THB の  $T_4$  末梢代謝に対するかなり特異性の高い阻害効果が認められたが、厳密な意味での特異性については問題が残る。即ち THB と構造的に類似しているフラビン色素が生体内酸化還元反応の電子伝達系に直接関与していることは衆知の事実であり、 $T_4$  5' 脱ヨード機序もピンポン機構に基づく酸化還元反応とみなされている。この点で THB が非特異的にある種の酸化還元反応の電子伝達系に直接影響している可能性は充分考えられる。また THB と類似構造を有するケルセチンは Na-K ATP アーゼ活性に対して直接的阻害作用を有することも報告されている<sup>43)</sup>。事実 in vivo での THB 少量投与群 (0.2 mg 群) では  $T_4$  から  $T_3$  への転化がかえって促進されるという二相性の効果がみられ、この点は単に  $T_4$  との競合阻害機序からだけでは説明がつかない。また in vitro における甲状腺培養細胞からの  $T_4$  放出機序についても今後の解明が必要である。しかしながら、THB のユニークな甲状腺ホルモン末梢作用阻害効果は、今後甲状腺ホルモンの作用機序の解明および臨床応用の点で有力な手段となろう。

## 結 論

1. カルコン構造を有する化学物質の  $T_4$  5' 脱ヨード活性阻害効果を検討し、THB が  $T_4$  の競合阻害剤であることを見出した。

2. THB の  $T_4$  5' 脱ヨード活性抑制効果は、NADPH および GSH の補酵素の添加により回復しない。

3. THB は甲状腺内で  $T_4$  から  $T_3$  への転化を抑制するが、甲状腺からのホルモン分泌は促進する。

4. 肝細胞膜  $T_4$  受容体および血清 TBG の  $T_4$  結合部位において、THB と  $T_4$  は競合する。

5. in vivo では、THB により血中  $T_3$  濃度の減少および肝  $T_4$  5' 脱ヨード活性、肝ミトコンドリア分画の  $\alpha$ -GPD 活性、腎 Na-K ATP アーゼ活性が低下し、甲状腺機能低下状態を呈する。

6. 血中  $T_4$  濃度は正常又は上昇し、甲状腺腫を形成しない。

7. THB と PTU は併用により相乗効果を認める。

8. THB は乳汁に移行し、仔ラットに甲状腺機能低下状態を発現する。

以上より THB は今後甲状腺ホルモンの作用機序の解明ならびに甲状腺疾患治療の点から有力な手段となる可能性がある。

## 謝 辞

稿を終えるにあたり、御指導と御校閲を賜りました谷口昂教授に深謝致します。また終始直接御指導、御鞭撻頂いた佐藤保助教授はじめ、研究に御協力頂きました教室員の皆様に感謝致します。最後に本研究のために貴重な薬剤を提供していただきました、福井医科大学中井昇博士、ならびにエーザイ探索企画室野村圭一博士に心から御礼申し上げます。

なお、本論文の要旨は、2nd Asia & Oceania Thyroid Association Meeting (Tokyo, 1982) および 7th Asia & Oceania Congress of Endocrinology (Tokyo, 1982) に発表した。

## 文 献

- 1) Slingerand, D. W., Graham, D. E., Joseph, R. K., Mulvey, P. F., Trakas, A. P. & Yamazaki, E.: The effect of propylthiouracil on the conversion of moniodothyronine to diiodothyronine. *Endocrinology*, **65**, 178-188 (1959).
- 2) Iino, S., Yamada, T. & Greer, N. A.: Effect of graded doses of propylthiouracil on biosynthesis of thyroid hormones. *Endocrinology*, **68**, 582-588 (1961).
- 3) Chopra, J. L.: A study of extrathyroidal conversion of thyroxine to 3, 3', 5-triiodothyronine in vitro. *Endocrinology*, **101**, 453-461 (1977).
- 4) Visser, T. J., Van der Does-Tobe, I., Doctet, R.: Conversion of thyroxine into triiodothyronine by rat liver homogenate. *Biochem. J.*, **150**, 489-497 (1975).
- 5) Chopra, I. J.: Characteristics of outer ring (5'-or 3'-) monodeiodination of 3', 5'-and 3, 3', diiodothyronine; Evidence suggesting one outer ring monodeiodinase for various iodothyronines. *Endocrinology*, **108**, 464-475 (1981).

- 6) **Chopra, I. J.**: Inhibition of outer ring monodeiodination of  $T_4$  and reverse  $T_3$  by some radiocontrast agents. *Clin. Res.*, **26**, 303A (1978).
- 7) **Burgi, H., Wimpfheimer, C., Burger, A., Zaunbauer, W., Rosler, H. & Lemarchand-Beraud, T.**: Changes of circulating thyroxine, triiodothyroxine and reverse triiodothyronine after radiographic contrast agent. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **43**, 1203-1211 (1976).
- 8) **Noorden, C. J. P., Wiersinga, W. M. & Touber, J. L.**: Propranolol inhibits the in vitro conversion of thyroxine into triiodothyronine by isolated rat liver parenchymal cells. *Horm. Metab. Res.*, **11**, 366-370 (1979).
- 9) **Chopra, I. J., Williams, D. E. & Solomn, D. H.**: Opposite effect of dexamethazone on serum concentration of 3,3',5'-triiodothyronine (reverse  $T_3$ ) and 3,5,3'-triodothyronine ( $T_3$ ). *J. Clin. Endometab.*, **41**, 911-920 (1975).
- 10) **Auf'mkolk, M., Köhrle, J., Kaminski, T. & Jorgensen, E. C.**: Flavonoids and plant pigment inhibit iodothyronine deiodinase. *Acta Endocrinol.* **96**, Supple **240**, 2 (1981).
- 11) **Lowry, O. H., Rosenbrough, N. J., Farr, A. L. & Randall, R. J.**: Protein measurement with Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**, 256-267 (1961).
- 12) **Emmelot, P., Bos, C. J., Benedetti, E. L. & Rümke, P. H.**: Studies on plasma membranes. 1, Chemical composition and enzyme content of plasma membranes isolated from rat liver. *Biochim. Biophys. Acta*, **90**, 126-233 (1964).
- 13) **Lee, Y. P. & Lardy, H. A.**: Influence of thyroid hormones on L- $\alpha$ -glycerophosphate dehydrogenase and other dehydrogenases in various organs of the rat. *J. Biol. Chem.*, **240**, 707-715 (1965).
- 14) **Lo, C. S., August, T. R., Liberman, U. A. & Edelman, I. S.**: Dependence of renal ( $Na^+$ - $K^+$ )-adenosine triphosphate activity on thyroid status. *J. Biol. Chem.*, **251**, 7826-7833 (1976).
- 15) **Fiske, C. R. & Subbarow, Y.**: The colorimetric determination of phosphorus. *J. Biol. Chem.*, **66**, 375-382 (1925).
- 16) **Surk, M. I. & Oppenheimer, J. H.**: Formation of iodoprotein during the peripheral metabolism of 3,5,3'-triiodo-L-thyronine  $^{125}I$  in the euthyroid man and rat. *J. Clin. Invest.*, **48**, 685 (1969).
- 17) **Braverman, L. E., Ingbar, S. H. & Sterling, K.**: Conversion of thyroxine to triiodothyronine in athyrotic human subjects. *J. Clin. Invest.*, **49**, 855-864 (1970).
- 18) **Pittman, C. S., Chambers Jr, J. B. & Read, V. H.**: The extrathyroidal conversion of thyroxine to triiodothyronine in normal man. *J. Clin. Invest.*, **50**, 1187-1195 (1971).
- 20) **Visser, T. J., Van der Does-Tobe, I., Docter, R. & Hennemann, G.**: Subcellular localization of rat liver enzyme converting thyroxine into triiodothyronine and possible involvement of essential thiol groups. *Biochem. J.*, **157**, 449-456 (1976).
- 21) **Visser, T. J.**: Mechanism of action of iodothyronine 5'-deiodinase. *Biochim. Biophys. Acta*, **569**, 302-310 (1979).
- 22) **Chopra, I. J.**: Sulfhydryl groups and the monodeiodination of thyroxine to triiodothyronine. *Science*, **199**, 904-905 (1978).
- 23) **Balsam, A. & Ingbar, S. H.**: Observations on the factors that control the generation of triiodothyronine from thyroxine in rat liver and the nature of the defect induced by fasting. *J. Clin. Invest.*, **63**, 1145-1150 (1979).
- 24) **Harris, A. R. C., Fang, S. L., Hinerfeld, L. Braverman, L. E. & Vagenakis, A. G.**: The role of sulfhydryl groups on the impaired hepatic 3',3,5-triiodothyronine generation from thyroxine in the hypothyroid, starved, fetal and neonatal rodent. *J. Clin. Invest.*, **63**, 516-522 (1979).
- 25) **Leonard, J. L. & Rosenberg, I. N.**: Thyroxine 5'-deiodinase activity; observations on activation by thiol and inhibition by propylthiouracil. *Endocrinology*, **103**, 2137-2144 (1978).
- 26) **Leonard, J. L. & Rosenberg, I. N.**: Characterization of essential enzyme-sulfhydryl groups of thyroxine 5'-deiodinase from rat kidney. *Endocrinology*, **106**, 444-451 (1980).
- 27) **Visser, T. J. & Van Obermeeren, E.**: Substrate requirement for inactivation of iodothyronine 5'-deiodinase activity by thiouracil. *Biochim. Biophys. Acta*, **685**, 202-209 (1981).
- 28) **Knopp, J. & Brtko, J.**: Effect of thiol blocking agent on the binding of  $T_3$  and  $T_4$  in rat liver nuclear extract. *Acta Endocrinol.*, **98**, 68-75

(1981).

- 29) Sato, T., Maruyama, S. & Takata, I. : On the role of NADPH and glutathione in the catalytic mechanism of hepatic thyroxine 5'-deiodination. *Endocrinol. Japon*, 28, 451-459 (1981).
- 30) Saberi, M., Francis, H. S. & Robert, D. U. : Reduction in extrathyroidal triiodothyronine production by propylthiouracil in man. *J. Clin. Invest.*, 55, 218-223 (1975).
- 31) Leonard, J. L. & Isadore, N. R. : Thyroxine 5'-deiodinase activity of rat kidney : Observations on activation by thiol and inhibition by propylthiouracil. *Endocrinology*, 103, 2137-2145 (1978).
- 32) Goswami, A., Leonard, J. L. & Losenberg, I. N. : Inhibition by coumarin anticoagulants of enzymatic outer ring monodeiodination of iodothyronines. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 104, 1231-1238 (1982).
- 33) Ruegamer, W. R., Newman, G. H., Richert, D. A. & Westerfeld, W. W. : Specificity of the  $\alpha$ -glycerophosphate dehydrogenase and malic enzyme response to thyroxine. *Endocrinology*, 77, 707-712 (1965).
- 34) Schapiro, S. & Percin, C. J. : Thyroid hormone induction of  $\alpha$ -glycerophosphate dehydrogenase in rats of different ages. *Endocrinology*, 79, 1075-1084 (1966).
- 35) Richert, D. A. & Westerfeld, W. W. : Growth and liver glycerophosphate dehydrogenase responses to thyroxine and p-chlorophenoxyisobutyrate. *Endocrinology*, 87, 1274-1285 (1970).
- 36) Oppenheimer, J. H., Coulombe, P. & Schwartz, H. L. : Nonlinear (amplified) relationship between nuclear occupancy by triiodothyronine and the appearance rate of hepatic  $\alpha$ -glycerophosphate dehydrogenase and malic enzyme in the rats. *J. Clin. Invest.*, 61, 987-995 (1978).
- 37) Katz, A. & Lindheimer, M. D. : Renal sodium and potassium-activated adenosin triphosphatase and sodium reabsorption in the hypothyroid rat. *J. Clin. Invest.*, 52, 796-805 (1973).
- 38) Gambert, S. R., Ingbar, S. H. & Hagen, T. C. : Interaction of age and thyroid hormone status on  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$  in rat renal cortex and liver. *Endocrinology*, 108, 27-36 (1981).
- 39) Skou, J. C. : Enzymatic basis for active transport on  $\text{Na}^+$  and  $\text{K}^+$  across cell membrane. *Physiol. Rev.*, 45, 596-603 (1965).
- 40) Ismail-Beigi, F. & Edelman, I. S. : Time course of the effects of thyroid hormone on respiration and  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$  activity in rat liver. *Pros. Soc. Exp. Biol. Med.*, 146, 983-991 (1974).
- 41) Asano, Y., Lieberman, U. A. & Edelman, I. S. : Thyroid thermogenesis ; relationships between  $\text{Na}^+$ -dependent respiration and  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-adenosine triphosphatase}$  activity in rat skeletal muscle. *J. Clin. Invest.*, 57, 368-377 (1976).
- 42) Fewrell, C. M. S. & Gompert, B. D. : Effect of flavone inhibitors of transport ATPase on histamine secretion from rat mast cells. *Nature*, 265, 635-636 (1977).
- 43) Yuriki, Y. & Racker, E. : Inhibitor of  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-adenosine triphosphatase}$  and its partial reactions by quercetin. *Biochemistry*, 15, 4951-4955 (1976).

**Competitive Inhibitors of Peripheral Thyroxine Metabolism—A Mode of Action of Trihydroxybenzophenone** Taizo Kato, Department of Pediatrics, (Director. Prof. N. Taniguchi), School of Medicine, Kanazawa University Kanazawa 920 — *J. Jusen Med. Soc.*, 93, 275—290 (1984)

**Key words:** Thyroxine, Trihydroxybenzophenone, T4 5'-deiodinase, Competitive Inhibitor

#### Abstract

In an attempt to find out the specific inhibitor of thyroxine (T4), inhibitory effect on hepatic T4 5'-deiodination was studied with phenolic, phenylic and imidazole ring compounds containing functional keton group; 2, 4, 4'-trihydroxybenzophenone (THB), 2, 2', 3, 4, 4'-pentahydroxybenzophenone, 2, 2', 3, 3', 4, 4'-hexahydroxybenzophenone, 2-aminobenzophenone, 3-

methylbenzophenone, quercetin, 2, 4-dihydroxy-methylbenzophenone, 3-benzoylhydratropic acid, 2', 4', 6'-trihydroxypropiofenone,  $\alpha$ [3(2-chlorophenoxy)phenyl] propionic acid, diphenylhydantoin, spirohydantoin and ophthalmic acid. Among these compounds, THB showed the strongest inhibitory effect and its fifty per cent inhibition dose ( $ID_{50}$ ) was  $10^{-5}$  M. The inhibition of T4 5'-deiodinase by THB was competitive with the substrate T4, and was not affected by the supplementation of NADPH and/or reduced glutathione, cofactors of T4 5'-deiodinase. Combined use of  $10^{-5}$  M THB with  $10^{-7}$ - $10^{-8}$  M propylthiouracil (PTU) exhibited a marked additive effect on T4 5'-deiodination. In cultured porcine thyroid cells,  $10^{-5}$  M THB stimulated T4 release into medium, but intrathyroidal conversion of T4 to T3 was reduced. THB inhibited also the binding of  $^{125}$ I-T4 to hepatic plasma membranes and to T4-binding globulin in vitro. The subcutaneous administration of 1-2 mg THB for 2 weeks to growing rats produced decrease in body weight gain, thyroid weight, intrathyroidal hormone contents, serum triiodothyronine (T3) level, hepatic T4 5'-deiodinase,  $\alpha$ -glycerophosphate dehydrogenase ( $\alpha$ -GPD), and renal Na-K dependent ATPase activities. Despite these changes, serum T4 level remained within normal range. Combined use of PTU with THB exaggerated these changes in addition to goiter formation and depression of serum T4 level. The administration of 10 mg of THB to pregnant or lactating rats revealed again reduction of serum T3 level, hepatic T4 5'-deiodinase and  $\alpha$ -GPD activities in the neonates in accordance with the critical period of thyroid hormone actions in the rats (1-2 weeks after birth). These results indicate that THB stimulates T4 release from the thyroid gland, but competitively inhibits T4 5'-deiodination and T4 binding to receptor in peripheral tissues, producing a unique form of hypothyroid state. THB may be a potent tool for the study of thyroid hormone actions in the target organ.