

新規頻尿・尿失禁治療剤 (±)-4-diethylamino-1,1-dimethylbut-2-yn-1-yl
2-cyclohexyl-2-hydroxy-2-phenylacetate monohydrochloride monohydrate
(NS-21) のラットにおける甲状腺機能亢進の機序

石橋成太良, 中沢素邦, 俵谷武治, 吉田 勝, 田村博信,
安達孝浩, 河口和寛, 岩倉啓子, 鷺見信好, 若林克己*

日本新薬株式会社 創薬研究本部
〒601 京都市南区西大路通八条下ル
*群馬大学 生体調節研究所 生理活性物質センター
〒371 群馬県前橋市昭和町3丁目39-15

THE MECHANISM OF INCREASED THYROIDAL FUNCTION
CAUSED BY (±)-4-DIETHYLAMINO-1,1-DIMETHYLBUT-2-YN-
1-YL 2-CYCLOHEXYL-2-HYDROXY-2-PHENYLACETATE
MONOHYDROCHLORIDE MONOHYDRATE(NS-21),
A NOVEL DRUG FOR URINARY FREQUENCY AND
INCONTINENCE, ADMINISTRATION IN RATS

Seitaro ISHIBASHI, Motokuni NAKAZAWA, Takeharu TAWARATANI,
Masaru YOSHIDA, Hironobu TAMURA, Takahiro ADACHI,
Kazushiro KAWAGUCHI, Keiko IWAKURA,
Nobuyoshi SUMI and Katumi WAKABAYASHI *

*Research Laboratories, Nippon Shinyaku Co., Ltd.,
Nishiohji Hachijo, Minami-ku, Kyoto 601, Japan*

** Biosignal Research Center, Institute for Molecular and Cellular Regulation,
Gunma University, 3-39-15, Showa-machi, Maebashi-shi, Gunma 371, Japan*

(Received September 2, 1996; Accepted February 6, 1997)

Abstract— A study was conducted to elucidate the mechanism of the increased thyroidal function caused by oral administration of (±)-4-diethylamino-1,1-dimethylbut-2-yn-1-yl 2-cyclohexyl-2-hydroxy-2-phenylacetate monohydrochloride monohydrate (NS-21), a new drug for the treatment of urinary frequency and incontinence, in rats. Rats were given

連絡先: 岩倉啓子 〒601 京都市南区西大路通八条下ル
日本新薬株式会社 創薬研究本部

500 mg/kg of NS-21 orally for 13 weeks. Rats were also given 500 mg/kg of the drug and 15 μ g/animal of thyroxine (T_4) in order to assess the influence of T_4 treatment.

NS-21 caused decreases in both total and free T_4 and increases in TSH and thyroxine uridine diphosphate glucuronyltransferase (T_4 UDP-GT). Morphological examination of thyroid gland revealed stimulated follicles indicating heightened thyroidal function. The treatment of T_4 inhibited the stimulating effect of NS-21 on thyroid gland.

These results show that the administration of NS-21 caused induction of T_4 UDP-GT, which resulted in a compensatory stimulation of the thyroidal function by the increased secretion of pituitary TSH in response to increased blood thyroid hormone metabolism.

KEY WORDS : NS-21, Urinary frequency, Urinary incontinence, Mechanism of increased thyroidal function, Rats

要 約

NS-21 のラット甲状腺機能亢進の機序解明を目的として 500mg/kg の投与量で 13 週間の反復経口投与を行った結果、肝ミクロソーム中の T_4 UDP-GT の増加、血清中 total T_4 および free T_4 の減少ならびに TSH の増加が投与 10 日目および 13 週目で同程度に認められた。形態学的には甲状腺の機能亢進像も観察された。 T_4 を補うことで甲状腺の機能亢進が抑制されるか否かを検討する為、15 μ g/animal を NS-21 と同時投与した結果、肝ミクロソーム中の T_4 UDP-GT は増加したが、血清中 total T_4 および free T_4 の減少はみられなくなり、TSH はむしろ減少した。また、形態学的には甲状腺の機能亢進像は観察されなかった。

以上のことから、ラットに NS-21 を投与すると、 T_4 UDP-GT が誘導され、血中の T_4 の代謝が亢進した結果、代償性に下垂体からの TSH の分泌亢進が引き起こされ、甲状腺の機能亢進に至ると推察された。

結 言

(\pm)-4-Diethylamino-1,1-dimethylbut-2-yn-1-yl 2-cyclohexyl-2-hydroxy-2-phenylacetate monohydrochloride monohydrate (以下、NS-21 と略称) は日本新薬(株)にて開発中の頻尿、尿失禁治療剤である。NS-21 は本剤の有している抗コリン作用およびカ

ルシウム拮抗作用により膀胱平滑筋での過剰興奮に基づく頻尿や尿失禁等の症状を改善すると考えられている。

これまでに実施した NS-21 のラット 13 週間および 26 週間反復経口投与毒性試験(西口ら, 1997: 岡崎ら, 1997)において、甲状腺の機能亢進像が、肝臓における酵素誘導を示唆する滑面小胞体の増生とともに雌雄に認められ、その発現は雌に比し雄でより低用量から認められた。これらの変化は、代表的な酵素誘導剤である phenobarbital をラットに投与した場合にも認められ、肝臓で甲状腺ホルモン(thyroxine: 以下、 T_4 と略称)のグルクロン酸抱合における律速酵素である uridine diphosphate glucuronyltransferase (以下、UDP-GT と略称) が誘導され、 T_4 の代謝が亢進して血中の T_4 が低下した結果、代償性に下垂体からの TSH の分泌が惹起され、甲状腺機能亢進に結びついたものと考えられている(McClain, 1989)。そこで今回、著者らは NS-21 のラットにおける甲状腺機能亢進の機序が phenobarbital によるものと同様と仮定し、反復経口投与毒性試験でより低用量から甲状腺の変化が認められた雄ラットを用いて、NS-21 を 13 週間反復経口投与し、血清中 T_4 および thyroid stimulating hormone (以下、TSH と略称)、肝ミクロソーム中 T_4 UDP-GT (以下、 T_4 UDP-GT と略称) の測定ならびに甲状腺について濾胞上皮細胞の細胞増殖率計測および病理形態学的検査を行った。同時に T_4 を皮下投与により補うことで甲状腺機能亢進の発現

が抑制されるか否かを検討したので、その成績を報告する。

実験材料および方法

被験物質

NS-21 は、Fig.1 に示す構造を有し、分子量 440.02 の白色の結晶または結晶性の粉末である。Methanol または glacial acetic acid に極めて溶けやすく、dehydrated ethanol に溶けやすく、acetone にやや溶けやすく、水に溶けにくく、ether にほとんど溶けない。本品の 2% dehydrated ethanol 溶液は旋光性がない。本試験ではロット 21 (純度 100.1%) を使用した。

T₄ は L-THYROXINE Sodium Salt · 5H₂O を SIGMA CHEMICAL CO. (St. Louis, Missouri, U.S.A.) より購入し使用した。

使用動物および飼育条件

4 週齢の Slc:SD 系の SPF 雄ラットを日本エスエルシー(株) (浜松) より購入し、馴化飼育の後、健康でかつ飼育環境に馴化した動物を選択し、6 週齢で試験に供した。

動物は温度 21 ~ 25 °C, 湿度 45 ~ 65 %, 人工照明 12 時間および換気回数 15 回/時間以上を環境条件としたバリアーシステムの飼育室で、金網ケージに個別に収容し、水道水および固型飼料 (CE-2, 日本クレア(株), 東京) を自由に与えて飼育した。

投与用量および群分け

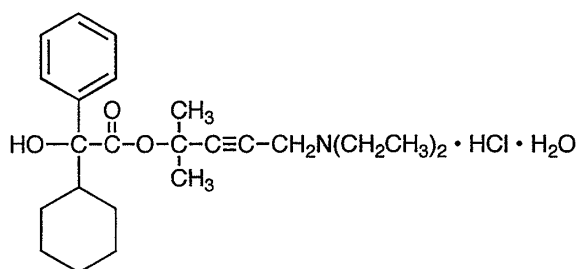


Fig 1. Chemical structure of (±)-4-diethylamino-1,1-dimethylbut-2-yn-1-yl 2-cyclohexyl-2-hydroxy-2-phenylacetate monohydrochloride monohydrate (NS-21).

NS-21 のラットにおける 13 週間反復経口投与毒性試験 (投与用量: 0, 6, 30, 150 および 750 mg/kg) (西口ら, 1997) の結果を基に、甲状腺の機能亢進像が明確に発現する用量として 500 mg/kg を選択した。また、T₄ は phenobarbital の甲状腺機能亢進の抑制実験 (Japundzic, 1969) の結果を基に 15 μg/animal と設定した。

群構成は、NS-21 の 500 mg/kg 投与群 (以下、NS-21 投与群と略称) と対照群に加え、それぞれに T₄ を同時に投与する群 (以下、NS-21 + T₄ 投与群および T₄ 投与群と略称) を設けて計 4 群とし、投与終了時 (13 週目) に加え、初期変化を捉えるべく投与 10 日目に検査に供する動物としてそれぞれ各群 30 匹、合計 240 匹の動物を使用した。これらの供試動物は、投与開始前日に体重を指標とした層別連続無作為化により群分けした。

被験物質の調製方法、投与方法および投与期間

NS-21 は投与容量が 10 ml/kg になるよう、0.5% methylcellulose (信越化学工業(株), 東京, 以下 MC と略称) 水溶液に懸濁調製した後、胃管を用いて強制経口投与した。対照群には、媒体の 0.5% MC 水溶液を同様の方法で投与した。T₄ は 50 μg/ml の濃度になるように生理食塩液に溶解し、NS-21 ないしは 0.5% MC 水溶液投与後、0.3 ml (15 μg/animal) を背部皮下に投与した。投与は 1 日 1 回、週 7 日、13 週間行った。

検査項目および方法

血清中 T₄ および TSH の測定

投与 10 日および 13 週目の投与 24 時間後に、各群 20 匹の動物 (非絶食) の頭部強打後、断頭採血した血液を室温にて約 1 時間放置後、遠心分離 (3000 rpm, 10 分間) して得られた血清を用い、total T₄ および free T₄ を オース・クリニカル・ダイアグノスティクス(株) (Amersham, Buckinghamshire, UK) から購入した RIA キット (total T₄: アマレックス-M T₄, free T₄: アマレックス-MAB フリー T₄) により測定した。TSH は National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases (NIDDK) より供与された rat TSH RIA キット (標準物質: RP-2, 抗血清: S-5, 標識用抗原: I-9)

を用いて測定した。

肝ミクロソーム中T₄UDP-GTの測定

上記採血に引き続き、各群20匹のうち10匹の動物を開腹して肝臓を採取し、ミクロソームを調製した。これについてT₄UDP-GTを Barter and Klassen (1992) の方法に従い測定し、ミクロソーム蛋白当たりの活性で表示した。ミクロソーム蛋白量は Lowry法 (Lowry *et al.*, 1951) により測定した。

甲状腺の病理学的検査

投与10日および13週目の投与24時間後に、各群8匹の動物(非絶食)を ether 麻酔下で腹大動脈より放血致死せしめ、体重測定後、甲状腺を摘出し肉眼的に観察した。甲状腺は、periodate-lysine-paraformaldehyde (PLP) で固定後、絶対重量を測定し、放血後の体重を基に相対重量を算出した。右側の甲状腺の凍結切片を作製し、マウス抗 proliferative cell nuclear antigen (PCNA) 抗体(ダコ・ジャパン, 京都)を用いて avidin-biotinylated peroxidase complex (ABC) 法 (Avrameas and Ternyck, 1971) にて免疫染色を施し、濾胞細

胞の増殖率を求めた。すなわち、一定数(1000個以上)の甲状腺濾胞細胞の観察細胞総数および PCNA 抗体に陽性を示す細胞数をカウントし、一定の観察細胞数にしめる陽性細胞数の割合 (labelling index) を算出した。左側の甲状腺は、PLP 固定液から10%中性緩衝 formalin 液に移し換え、常法に従いH.E.染色標本を作製して病理組織学的検索を実施した。

また、各群2匹の動物(非絶食)から甲状腺を摘出し、電子顕微鏡検査を実施した。摘出した甲状腺は glutaraldehyde formalin 溶液で固定、1% osmium 酸で後固定を行い、epoxy 樹脂に包埋した。次いで、包埋試料より超薄切片を作製し、uranyl acetate と lead citrate の二重染色を施して、電子顕微鏡(H-7100型, 株式会社日立製作所, 東京)を用いて観察した。

統計学的処理

血清中T₄およびTSH濃度、T₄UDP-GT活性、甲状腺の器官重量および濾胞上皮細胞の細胞増殖率について、Bartlett の等分散検定を行った後、群

Table 1. Serum concentrations of T₄ and TSH in rats after 13 weeks of oral administration of NS-21.

Sex	Compound	Dose	Total T ₄ (μ g/dl)		Free T ₄ (ng/dl)		TSH (ng/ml)		
			10days	13weeks	10days	13weeks	10days	13weeks	
Male	Control	0 mg/kg	N	20	20	20	20	20	20
			Mean	6.905	7.590	1.740	1.870	1.622	1.511
			S.D.	0.737	0.982	0.193	0.385	0.634	0.589
	T ₄	15 μ g/animal [#]	N	20	17	20	17	16	9
			Mean	10.625*	10.506*	2.930*	2.665*	0.344*	0.410*
			S.D.	1.701	1.472	0.641	1.315	0.103	0.130
	NS-21	500mg/kg	N	20	19	20	19	20	19
			Mean	5.800*	5.795*	1.366*	1.330*	2.125	1.945
			S.D.	0.860	0.736	0.195	0.294	0.711	0.578
	NS-21 +	500mg/kg +	N	18	19	18	19	18	19
			Mean	7.917	7.995	1.917	1.832	0.991*	0.660*
			S.D.	1.622	0.994	0.355	0.314	0.392	0.299
T ₄	15 μ g/animal [#]	N	18	19	18	19	18	19	
		Mean	7.917	7.995	1.917	1.832	0.991*	0.660*	
		S.D.	1.622	0.994	0.355	0.314	0.392	0.299	

: s.c.

* : Significantly different from the control values at P<0.05.

間で分散が等しい場合は二元配置分散分析を実施した。その結果、有意ならばSchefféの検定を行った (Gad, S. and Weil, C.S., 1988)。群間で分散が異なった場合は、対数変換を行い群間の等分散性を確認した後、同様に二元配置分散分析およびSchefféの検定を実施した。なお、検量限界値以下のホルモン測定値は統計学的処理から除外した。

実験結果

血清中T₄およびTSH

結果を Table1 に示した。

NS-21 投与群では、totalT₄およびfreeT₄の有意な減少およびTSHの増加傾向が投与10日および13週目に認められた。

NS-21 + T₄投与群では、TSHの有意な減少が投与10日および13週目に認められた。

T₄投与群では、totalT₄およびfreeT₄の有意な増加ならびにTSHの有意な減少が投与10日および13週目に認められた。

肝ミクロソーム中T₄UDP-GT

結果を Table2 に示した。

NS-21 投与群および NS-21 + T₄投与群で、肝相対重量およびT₄UDP-GTの有意な増加が、投与10日および13週目に認められた。

T₄投与群では特に記すべき変化は認められなかった。

甲状腺の病理学的所見

剖検所見

T₄投与群で、甲状腺の色調の淡明化が投与10日および13週目に認められた。

NS-21 および NS-21 + T₄投与群では、特に記すべき変化は認められなかった。

器官重量

結果を Table3 に示した。

NS-21 投与群で、甲状腺相対重量の有意な増加が投与13週間に認められた。

NS-21 + T₄投与群およびT₄投与群では、特に記すべき変化は認められなかった。

Table 2. T₄UDP-GT and liver organ weight in rats after 13 weeks of oral administration of NS-21.

Sex	Compound	Dose		T ₄ UDP-GT		Absolute weight		Relative weight	
				(pmol/mg protein/min)		(g)		(g%)	
				10days	13weeks	10days	13weeks	10days	13weeks
	Control	0 mg/kg	N	10	10	8	8	8	8
			Mean	232.8	171.5	12.299	17.256	4.721	3.471
			S.D.	40.3	33.3	1.301	2.027	0.214	0.142
	T ₄	15 μg/animal [#]	N	10	10	8	8	8	8
			Mean	196.0	155.8	11.778	17.635	4.638	3.702
			S.D.	45.5	15.8	1.179	1.413	0.178	0.127
Male	NS-21	500mg/kg	N	10	9	8	8	8	8
			Mean	574.0*	563.5*	15.837*	20.217	6.731*	5.945*
			S.D.	82.3	103.3	0.943	2.326	0.174	0.274
	NS-21 + T ₄	500mg/kg + 15 μg/animal [#]	N	10	10	8	7	8	7
			Mean	546.0*	666.8*	15.906*	20.703*	6.648*	5.934*
			S.D.	115.5	133.0	1.674	2.241	0.205	0.363

[#]: s.c.

*: Significantly different from the control values at P<0.05.

Table 3. Organ weights of thyroid gland in rats after 13 weeks of oral administration of NS-21.

Sex	Compound	Dose	Post mortal body weight		Thyroid gland				
			(g)		(mg)		(mg%)		
			10days	13weeks	10days	13weeks	10days	13weeks	
Male	Control	0 mg/kg	N	8	8	8	8	8	8
			Mean	260.0	496.5	15.0	17.1	5.8	3.5
			S.D.	17.8	48.0	3.1	3.4	1.3	0.6
	T ₄	15 µg/animal [#]	N	8	8	8	8	8	8
			Mean	253.6	477.0	12.5	15.8	5.0	3.3
			S.D.	18.6	43.1	4.1	3.6	1.7	0.9
	NS-21	500mg/kg	N	8	8	8	8	8	8
			Mean	235.4	340.1*	16.5	19.8	7.0	5.9*
			S.D.	14.5	35.7	2.7	5.3	1.0	2.1
	NS-21 +	500mg/kg +	N	8	7@	8	7@	8	7@
			Mean	238.9	349.9*	14.3	13.3	6.0	3.8
			S.D.	19.4	41.2	2.1	3.1	0.7	0.9
T ₄	15 µg/animal [#]	N	8	7@	8	7@	8	7@	
		Mean	238.9	349.9*	14.3	13.3	6.0	3.8	
		S.D.	19.4	41.2	2.1	3.1	0.7	0.9	

: s.c.

@ : dead animal; 1 / 8

* : Significantly different from the control values at P<0.05.

Table 4. Labelling index of thyroid follicular cells in rats after 13 weeks of oral administration of NS-21.

Sex	Compound	Dose	Labelling index (%)	
			10days	13weeks
			Control	0 mg/kg
Mean	2.19	3.42		
S.D.	0.52	3.80		
T ₄	15 µg/animal [#]	N	8	8
		Mean	1.47	2.61
		S.D.	1.16	2.94
NS-21	500mg/kg	N	8	8
		Mean	3.11	3.36
		S.D.	1.28	4.05
NS-21 +	500mg/kg +	N	8	7@
		Mean	1.61	3.86
		S.D.	0.40	4.54
T ₄	15 µg/animal [#]	N	8	7@
		Mean	1.61	3.86
		S.D.	0.40	4.54

: s.c.

@ : dead animal ; 1 / 8

細胞増殖率

結果を Table4 に示した。

T₄投与群、NS-21投与群および NS-21 + T₄投与群のいずれの投与群にも特に記すべき変化は認められなかった。

病理組織学的所見

所見を Table5 に示した。

NS-21 投与群では、甲状腺の濾胞上皮が円柱状でコロイドの乏しい小さな濾胞が多数みられる、いわゆる甲状腺の機能亢進像 (Photo.1) が投与10日および13週目の多数例で認められた。

NS-21 + T₄投与群では、少数例で甲状腺の濾胞上皮が扁平で、コロイド量の多い大きな濾胞が多数みられ、いわゆる甲状腺機能低下を示唆する組織像が投与10日目に認められた。また、投与13週目には、少数例で機能亢進像が認められた。しかしながら、投与10日および13週目ともに半数例以上で対照群と同様の組織像 (Photo.2) が観察された。

T₄投与群では、甲状腺機能の低下を示唆する上述した組織像 (Photo.3) が投与10日および13週目の全例で認められた。

その他、特に記すべき変化は認められなかった。

Table 5. Histopathological findings of thyroid glands in rats after 13 weeks of oral administration of NS-21

Findings	Test article		Control 0 mg/kg		T ₄ 15 μg/animal#		NS-21 500 mg/kg		NS-21 500mg/kg + T ₄ 15 μg/animal#	
	Administration period		13weeks		13weeks		10days		10days	
	No. of animals		8	8	8	8	8	8	8	7@
Flattened epithelial cells and large follicular lumen					8	8			2	
Tall columnar epithelial cells and small follicular lumen							7	7		2

: s.c.

@ : dead animal; 1/8

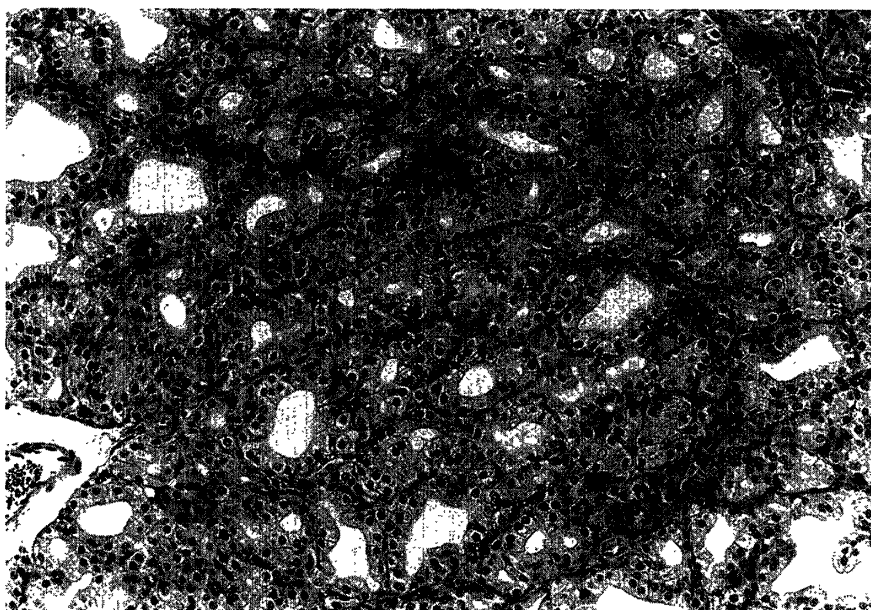


Photo 1. Thyroid gland from a male rat showing tall columnar epithelial cells and small follicular lumen. The rat received 500 mg/kg of NS-21 for 10 days. H.E. staining.
× 150.

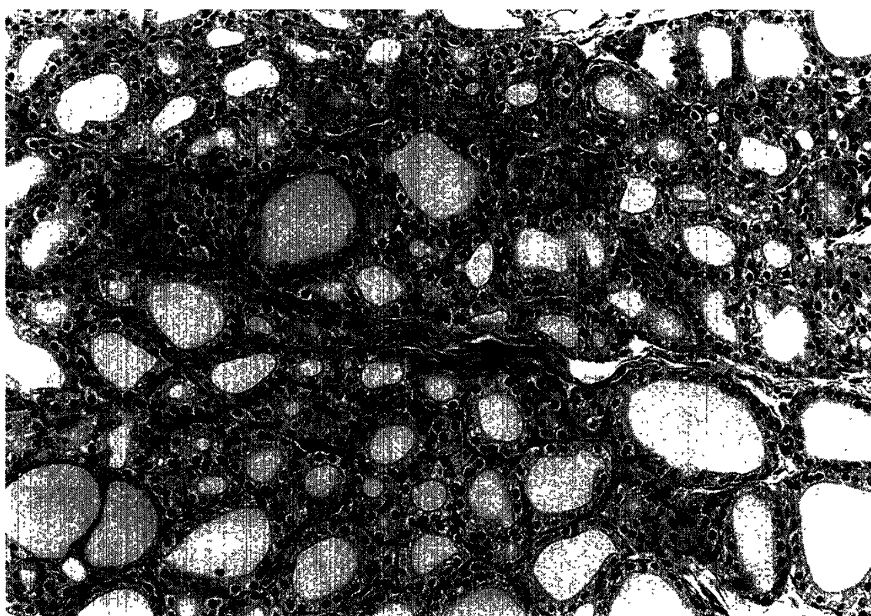


Photo 2. Thyroid gland from a male rat showing no abnormal changes. The rat received 500 mg/kg of NS-21 and 15 μ g/animal of T₄ for 10 days. H.E. staining.
× 150.

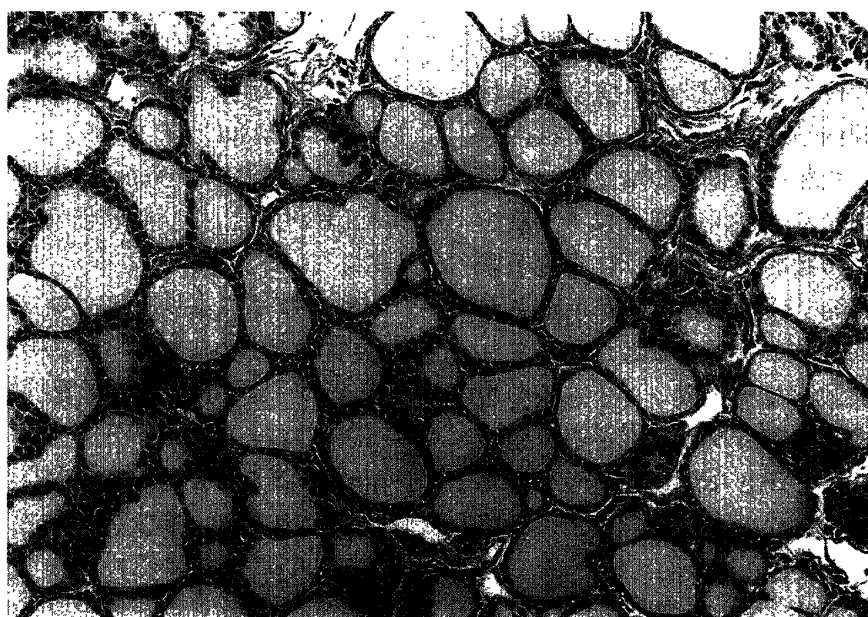


Photo 3. Thyroid gland from a male rat showing flattened epithelial cells and large follicular lumen. The rat received $15 \mu\text{g}/\text{animal}$ of T_4 for 10 days. H.E. staining. $\times 150$.

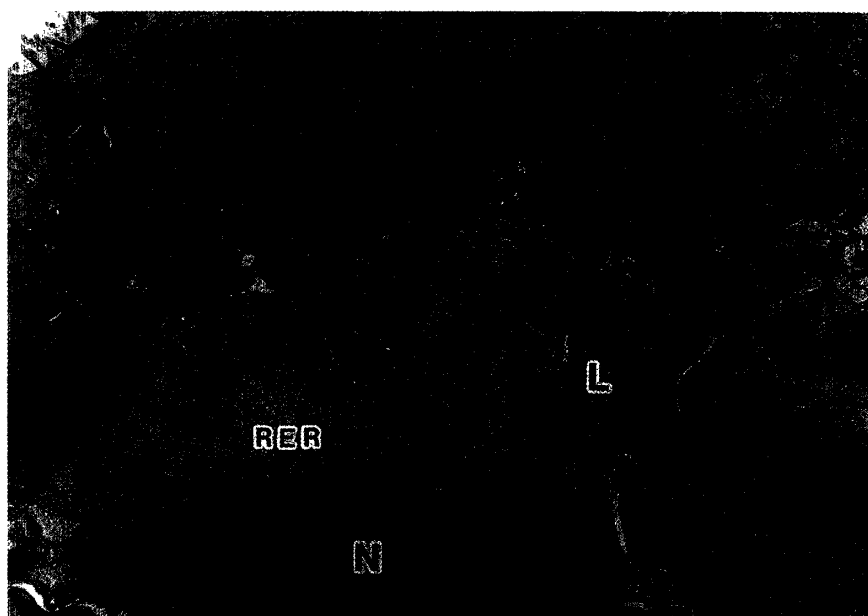


Photo 4. Thyroid gland from a male rat showing irregular-shaped nucleus(N), proliferated and dilated rough-surfaced endoplasmic reticulum(RER), well-developed Golgi apparatus and increased lysosomes(L) with high density in the follicular epithelial cells. The rat received $500 \text{mg}/\text{kg}$ of NS-21 for 10 days. $\times 4400$.

甲状腺の電子顕微鏡所見

NS-21 投与群では、甲状腺の濾胞腔の狭小化、上皮細胞の円柱化、核の形の不整化が投与10日目に認められた。細胞内小器官の変化としては内腔の著しい拡張を伴った粗面小胞体の増生、ゴルジ装置の発達、分泌顆粒および再吸収コロイド滴の増加、ライソゾームの数的増加ならびに高電子密度化が認められ (Photo.4)、機能亢進が示唆された。投与13週目にも同様の機能亢進像が認められたが、投与10日目に比べて再吸収コロイド滴の増加、ライソゾームの増加ならびに高電子密度化の進行が顕著であった。しかしながら、粗面小胞体は細胞全体に分布するものの、内腔の拡張は顕著ではなく、分泌顆粒はむしろ減少していた。

NS-21 + T₄投与群では、NS-21 投与群とほぼ同様の所見が投与10日目に認められたが、濾胞腔の狭小化および粗面小胞体の内腔の著しい拡張は認められなかった (Photo.5)。投与13週目には投与10日目とほぼ同様の所見が認められたが、再吸収コロイド滴の増加、ライソゾームの増加ならびに高電子密度化の進行は顕著であった。

T₄投与群では投与10日および13週目ともに、濾胞腔の拡張、上皮細胞および核の扁平化が認められた他、粗面小胞体およびゴルジ装置が未発達で、再吸収コロイド滴は認められず、ミトコンドリア、分泌顆粒、ライソゾームおよび微絨毛も減少し、甲状腺機能の低下を示唆する所見 (Photo.6) が認められた。

その他、特に記すべき変化は認められなかった。

考 察

NS-21のラットの反復経口投与毒性試験 (西口ら, 1997; 岡崎ら, 1997) において、甲状腺の機能亢進像が認められた。甲状腺の機能亢進を誘導する薬物や化合物は多数知られており、その機序は幾つかのカテゴリーに分類される (Alison *et al.*, 1994) が、NS-21 投与による甲状腺機能亢進の機序は、肝臓での酵素誘導を示唆する滑面小胞体の増生とともに認められることから、いわゆる phenobarbital 型の範疇に入るものと推測された。すなわち、phenobarbital 投与では T₄UDP-GT を誘

導することにより、血中の T₄ の代謝が進み、この T₄ の低下に対して代償性に TSH の分泌亢進が惹起され、甲状腺の機能亢進に結びつくものと考えられている (McClain, 1989)。この仮定に基づき、ラットに NS-21 を 500mg/kg の投与用量で13週間反復経口投与し、甲状腺機能亢進の発現機序を検討した。

NS-21 投与により肝ミクロソーム中の T₄ 代謝の律速酵素である T₄UDP-GT の増加が NS-21 投与により認められ、T₄ 投与の影響は認められなかった。血清中 T₄ および TSH の測定では、NS-21 投与により total T₄ および free T₄ の減少ならびに TSH の増加が認められたが、T₄ を同時に投与すると total T₄ および free T₄ の減少は認められなくなり、TSH についても減少に転じた。

甲状腺の病理学的検査では、NS-21 投与により重量増加がみられ、組織学的に機能亢進を示唆する甲状腺濾胞上皮の円柱化およびコロイド量の少ない小濾胞の増加が認められた。また電子顕微鏡的には、濾胞腔の狭小化および上皮細胞の円柱化を始め機能亢進を示唆する所見が得られ、特に投与10日目に比べ投与13週目には再吸収コロイド滴の増加、ライソゾームの増加ならびに高電子密度化が進行していた。これらの変化は TSH 投与による甲状腺の機能亢進像 (Fujita, 1975) と一致しており、また上述したごとく NS-21 投与によっても TSH 分泌亢進が認められていることから、TSH 分泌亢進を反映した像と考えられた。NS-21 に加え T₄ を投与した群では重量増加はみられず、組織学的にも対照群と同様の像が認められた。電子顕微鏡的には、前述した甲状腺の機能亢進を示唆する所見が一部みられたが、NS-21 単独投与群でみられた濾胞腔の狭小化や粗面小胞体の著しい拡張は認められなかった。

以上の結果は、NS-21 投与による甲状腺の機能亢進が T₄UDP-GT の誘導によって血中の T₄ の代謝が促進され、代償性に下垂体からの TSH の分泌が亢進して生じた二次的な作用によるものであるという仮定を裏付けるものであった。

また phenobarbital については、initiation/promotion モデルで甲状腺腫瘍の promoter であることが明らかにされており (McClain *et al.*, 1988)、NS-21 の

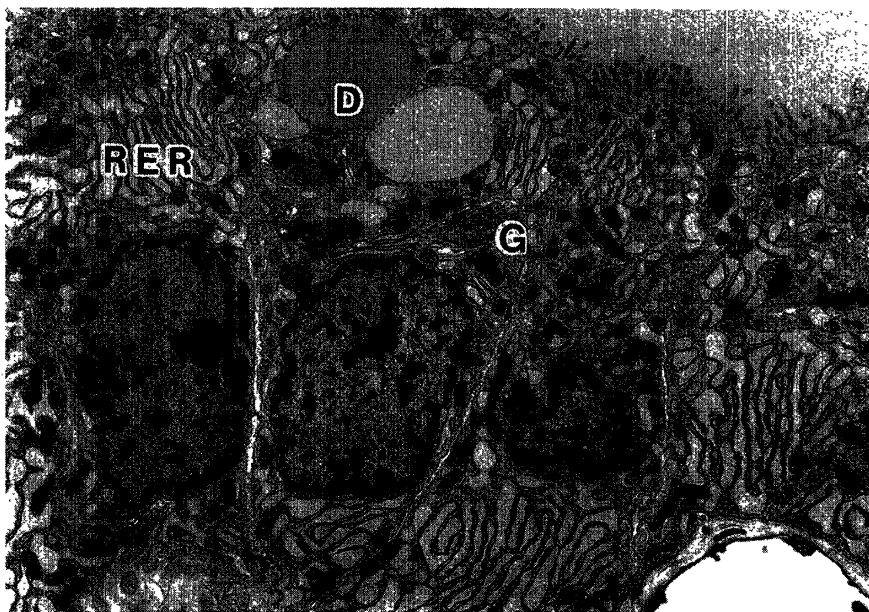


Photo 5. Thyroid gland from a male rat showing proliferated rough-surfaced endoplasmic reticulum(RER), well-developed Golgi apparatus(G), increased lysosomes with high density, secretory granules and reabsorbed colloid droplets(D) in the epithelial cells. The rat received 500 mg/kg of NS-21 and 15 μ g/animal of T₄ for 10 days. \times 4400.



Photo 6. Thyroid gland from a male rat showing flattened nucleus (N) and reduced organelles and microvilli in the flattened epithelial cells. The rat received 15 μ g/animal of T₄ for 10 days. \times 4400.

甲状腺に対する promoter としての発癌性が懸念された。そこで今回、甲状腺の細胞増殖率を計測したところ、NS-21 投与による上昇は認められず、組織学的および電子顕微鏡的に濾胞細胞の肥大は認められたものの、増殖性変化は明らかではなかった。また、NS-21 のマウスおよびラットの発癌性試験 (Hatch *et al.*, 1997a : Hatch *et al.*, 1997b) でも甲状腺濾胞細胞由来の腫瘍性変化の発現率に増加は認められなかった。6から7週齢の雄ラット (Wistar系) に 80mg/kg の phenobarbital を7日間経口投与し、BrdUを用いて甲状腺の細胞増殖率を測定した実験 (Jones H.B. and Clarke A.B., 1993) では投与1日から7日目にかけて細胞増殖率は対照群に比し統計学的に有意な上昇が認められている。しかしながら、今回の我々の実験では、NS-21 500mg/kg 投与群で細胞増殖率の増加は認められず、NS-21 の甲状腺濾胞細胞に対する細胞増殖作用は有るとしても極めて弱いと考えられた。

今回確認された機序に基づき、NS-21 の甲状腺機能亢進のヒトへのリスクを外挿すると、以下のごとく考えられた。すなわち、T₄ の血中での結合蛋白には種差がみられ、ヒトでは T₄ の主な輸送蛋白が T₄ と極めて親和性の高い T₄ 結合グロブリン (TBG) であり、rifampicin の様な強力な代謝酵素誘導剤を投与した場合でも、僅かに血中での T₄ 濃度に変動は来すものの、TSH 濃度にまでは影響を与えていない事実が報告されている (Alison *et al.*, 1994)。一方、ラットでは TBG がごく僅かしか存在せず、T₄ の輸送は主に T₄ と親和性の低いアルブミン類との結合によりなされていることから、ラット血中での T₄ の半減期はヒトの約 1/10 と非常に短いと言われている (Alison *et al.*, 1994 : 日本製薬工業協会, 1992)。その結果、血中 T₄ の恒常性維持の為に甲状腺にかかる負荷は、ヒトに比較してラットで著しく高いと考えられている (Alison *et al.*, 1994)。しかしながら、今回の実験では NS-21 のラット甲状腺濾胞細胞に対する細胞増殖作用は有るとしても極めて弱いことが明らかとなった。従って、ヒトでは、今回ラットで認められたような代謝酵素誘導に伴う T₄ の低下、代償性に発現した下垂体からの TSH の上昇、さらには甲状腺の機能亢進が発現する可能性は極めて低いと考えられた。

謝 辞

TSH の測定に際し、NIDDK キットを供与して頂いた The National Hormone and Pituitary Program および Pituitary Hormones and Antisera Center, Harbor-UCLA Medical Center の Dr.A.F.Parlow に深く感謝致します。

(実施期間：1994年11月2日～1995年9月14日)

文 献

- Alison, R.H., Capen, C.C. and Prentice, D.E. (1994) : Neoplastic lesions of questionable significance to human. *Toxicol. Pathol.* 22, 179-186.
- Avrameas, S. and Ternyck, T. (1971) : Peroxidase labeled antibody and Fab conjugates with enhanced intracellular penetration. *Immunochemistry.* 8, 1175-1179.
- Barter, R.A. and Klassen, C.D. (1992) : Rat liver microsomal UDP-glucuronyl-transferase activity toward thyroxine: Characterization, induction, and form specificity. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 115, 261-267.
- Fujita, H. (1975) : Fine structure of the thyroid gland. *Int. Rev. Cytol.*, 40, 197-280.
- Gad, S. and Weil, C.S. (1988) : Statistics and Experimental Design for Toxicologists (Gad, S. and Weil, C.S. eds), pp.43-45, pp.82-84, pp.86-91, Telford Press, Caldwell, New Jersey.
- Hatch, R.C., Regan, K.S., Ishibashi, S., Nakazawa, M., Iwakura, K. and Sumi, N. (1997a) : Seventy-eight-week dietary carcinogenicity study of (±)-4-diethylamino-1, 1-dimethylbut-2-yn-1-yl 2-cyclohexyl-2-hydroxy-2-phenylacetate monohydrochloride monohydrate (NS-21), a novel drug for urinary frequency and incontinence, in mice. *J. Toxicol. Sci.*, 22, Suppl. I, 275-287.
- Hatch, R.C., Regan, K.S., Ishibashi, S., Nakazawa, M., Iwakura, K. and Sumi, N. (1997b) : Two-year dietary carcinogenicity study of (±)-4-diethylamino-1, 1-dimethyl-but-2-yn-1-yl 2-cyclohexyl-2-hydroxy-2-phenylacetate monohydrochloride monohydrate (NS-21), a novel drug for urinary frequency and inconti-

- nence, in rats. *J. Toxicol. Sci.*, 22, Suppl. I, 289-306.
- Huw B.Jones and Noel A.B.Clarke (1993) : Assessment of the influence of subacute phenobarbitone administration on multi-tissue cell proliferation in the rat using bromodeoxyuridine immunocytochemistry. *Archives of Toxicology*, 67, 622 -628.
- Japundzic, M.M. (1969) : The goitrogenic effect on phenobarbital-Na on the rat thyroid. *Acta. Anat.* 74, 88-96.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J. (1951) : Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265-275.
- McClain, R.M. (1989) : The significance of hepatic microsomal enzyme induction and altered thyroid function in rats: Implications for thyroid gland neoplasia. *Toxicol. Pathol.*, 17, 294-306.
- McClain, R.M., Posch, R.C., Bosakowski, T. and Armstrong, J.M. (1988) : Studies on the mode of action for thyroid gland tumor promotion in rats by phenobarbital. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 94, 254-265.
- 日本製薬工業協会・医薬品評価委員会・基礎研究部会・第3分科会 (1992) : Thyroid tumor inducing agents. 遺伝子毒性を示さない化学物質 (医薬品) の発癌性評価. 製薬協・医薬品評価委・基礎研・資料53, pp.191-251.
- 西口保幸, 安達孝浩, 中沢素邦, 俵谷武治, 内本啓史, 吉田 勝, 石橋成太良, 北山英太, 岩倉啓子, 鷺見信好 (1997) : 新規頻尿・尿失禁治療剤 (±)-4-diethylamino-1,1-dimethylbut-2-yn-1-yl 2-cyclohexyl-2-hydroxy-2-phenylacetate monohydro-chloride monohydrate (NS-21) のラットにおける13週間反復経口投与毒性試験ならびに5週間回復試験. *J. Toxicol. Sci.*, 22, Suppl. I, 27-57.
- 岡崎啓幸, 馬場澄明, 千早豊, 鮫島秀暢, 永田良一, 石橋成太良, 岩倉啓子, 鷺見信好 (1997) : 新規頻尿・尿失禁治療剤 (±)-4-diethylamino-1,1-dimethylbut-2-yn-1-yl 2-cyclohexyl-2-hydroxy-2-phenylacetate monohydrochloride monohydrate (NS-21) のラットにおける26週間反復経口投与毒性試験ならびに9週間回復試験. *J. Toxicol. Sci.*, 22, Suppl. I, 59-92.