

T_3 ^{9)~11)}, またはサイログロブリン¹²⁾の放出を指標とする方法である。これらの中でも甲状腺ホルモンの分泌刺激効果を指標とするバイオアッセイ法が最も理想的と考えられる。これまで T_3 の放出を指標とした方法はいくつか報告されているが、これらの報告では T_3 が de novo に合成され、分泌されたという証明はされておらず、甲状腺内に残存していた甲状腺ホルモンが分泌されてきた可能性が強い。

ところで、ジメチルスルホキシド (DMSO) は、一般には細胞凍結に使用される薬剤である。しかしながら、培養液に添加した場合には、promyelocytic leukemia cell (HL-60細胞) が myelocyte に分化するのを促進したり¹³⁾、培養ラット肝細胞のアルブミン合成能を長期間維持する作用があることが報告されている¹⁴⁾。そこで我々は培養液中に DMSO を添加し、DMSO のヒト甲状腺濾胞細胞に対する効果を検討した。そして TSH および TRAb に反応して甲状腺ホルモンを de novo に合成し、分泌する理想的な TRAb のバイオアッセイ法を確立したので報告する。

方 法

1. TRAb 測定の対象患者および IgG の抽出法

TRAb 測定の対象となった患者は、内分泌センターに入院してきたバセドウ病患者 6 名である。採血時 1 名は未治療であり、5 名は抗甲状腺剤治療 2~3 週以内で機能亢進状態にあった。血清からの IgG の抽出には、プロテイン A セファロース CL4B カラム (1.3×5cm, Pharmacia 社製) を用いた¹⁵⁾。また、コントロールとして正常人 6 名の IgG を用いた。

2. 甲状腺濾胞細胞の培養法

手術時に得られたバセドウ病患者の甲状腺組織 (10~15g) をハサミで細切し、コラゲナーゼ (Sigma 社製 Type II) 0.3mg/ml, ディスパーゼ (合同酒精社製) 4mg/ml を含む Ca^{++} , Mg^{++} フリーの Hanks 液 (50ml) 中で、32℃にて30分間振盪した (120回/分)。その後、未消化組織と甲状腺遊離細胞を100メッシュのナイロンメッシュで分離し、未消化組織について同様の処理をさらに2回行なった。得られた甲状腺細胞浮遊液を400

rpm, 10分遠心して上清を除去した後、細胞を Hanks 液にて2回洗浄した。このようにして得られた甲状腺細胞を1%ウシ胎児血清を含む RPMI-1640培養液 (Gibco 社製) に浮遊させ、37℃, 5%CO₂-95%air の培養器内で培養した。なお、24ウェルプラスチックディッシュ (Nunc 社製) は、細胞の接着を阻止するようにあらかじめ1%アガロスを塗布しておいたものを使用し¹⁶⁾、これに細胞浮遊液を1ウェルあたり1mlずつ分注した。細胞は、濾胞数として1ウェルあたり2,000~3,000個であり、蛋白量として1ウェルあたり約10 μ gであった。なお、蛋白量は Bradford 法¹⁷⁾にて測定した。また、培養液には、NaI (10⁻⁸M), インスリン (8 μ g/ml), ハイドロコチゾン (10⁻⁸M), 1.7%DMSO, トランスフェリン (5 μ g/ml) および種々の濃度の TSH (Sigma 社製) を加え、その効果を検討した。5日間培養した後 Na¹²⁵I を 2×10⁶cpm/well 添加し、さらに3日間培養した後、甲状腺濾胞と培養液をプラスチックチューブに移し、遠心分離した。培養液中に分泌された有機ヨード (主としてヨードサイロニン) には、キャリアーとしてヒト血清100 μ l を添加した後、50%トリクロロ酢酸 (TCA) 200 μ l (最終濃度6%) を加えて沈降させ、遠心して上清を除去した後、5%TCA にて2回洗浄した。一方、甲状腺濾胞はそのまま γ -カウンターにかけて測定し、甲状腺濾胞に摂取された¹²⁵I と培養液に分泌された有機ヨードの放射活性を測定した。

3. 有機ヨード分泌を指標とした TRAb の新しいバイオアッセイ法

TRAb の測定時には、TSH のかわりに、精製したバセドウ病患者 IgG (1.3mg/ml) を添加し、上記のごとく培養した。5日間培養後、¹²⁵I を添加し、さらに3日間培養した後、甲状腺濾胞に取り込まれた¹²⁵I と培養液中に分泌された有機ヨードの放射活性を測定した。また、コントロールとしては、IgG を添加しないで同様に培養した時に、甲状腺濾胞に取り込まれた¹²⁵I と培養液中に分泌された有機ヨードの放射活性を用いた。また、正常人 6 名の IgG についても同様の検討を行った。なお、バセドウ病患者 IgG の刺激活性が有意なもの

であるか否かについては Student の t 検定を用いて検討した。

4. 有機ヨードの分析

Na ^{125}I 添加後 3 日間で培養液中に分泌されてきたヨード蛋白とフリーの有機ヨードを検討する目的で, Gavin らの方法¹⁸⁾により, conditioned medium 1ml を直接セファデックス G-25 (medium) のカラム (2.2×25cm) に添加して分析した。カラムを 0.5M NaCl—0.054N NaOH (pH 11.8) にて平衡化しておいた後, ^{125}I を含んだ培養液 1ml をカラムに添加した。ついで 0.005M NaCl—0.1N NaOH (pH 12.5) で溶出し, 4ml ずつ分取した後, 各分画の放射活性を測定した。また, 甲状腺濾胞細胞内で合成された有機ヨードを Inoue & Taurog の方法¹⁹⁾に従い分析した。 ^{125}I 添加後 3 日目に甲状腺濾胞をホモジェナイズした後, 3.5% プロナーゼ 50 μl (最終濃度 0.17%) を添加し, 37℃ で 16~18 時間, 酵素処理した。ついで, 甲状腺濾胞のプロナーゼ分解産物中の有機ヨードを塩酸・ブタノールで抽出し, 薄層プレート (thin layer chromatography; TLC, Whatman 社製薄層プレート K5F を使用) にて展開した後, autoradiogram にて分析した²⁰⁾。また, 培養液中に分泌された有機ヨードも TCA で沈降させた後塩酸・ブタノールで抽出し, 同様に TLC にて分析した。なお, 展開液には, 2N NH_4OH ・ブタノールを用いた。

結 果

1. 培養ヒト甲状腺細胞に及ぼす DMSO の効果

1) DMSO 濃度の検討

培養液中に 0~4% の DMSO を添加し, TSH (100 $\mu\text{U/ml}$) 刺激下における ^{125}I の取り込みおよび有機ヨードの分泌に及ぼす効果を検討した。図 1 に示すように, 培養液に 0.5~2% の DMSO を添加した場合には, ^{125}I の取り込みも有機ヨードの分泌も有意に増加し, 1~2% で最大となった。しかしながら, より高濃度 (4%) の DMSO を添加した場合には, ^{125}I の取り込みも有機ヨードの分泌もほとんど認められなくなった。したがって, 以下の実験では, 培養液中に添加する DMSO の

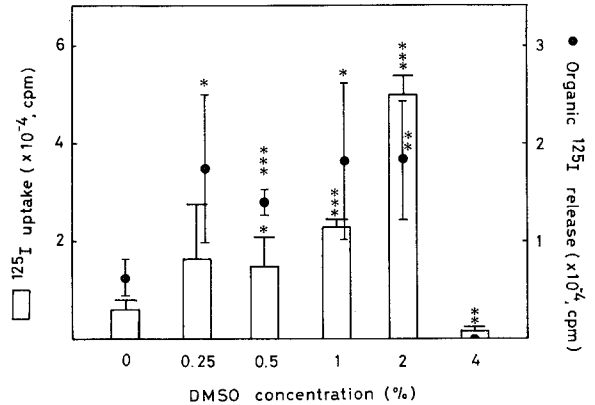


図 1 DMSO 濃度の甲状腺濾胞細胞におよぼす効果 TSH (100 $\mu\text{U/ml}$), DMSO (0~4%) を添加し, 甲状腺濾胞細胞を 5 日間培養した後, Na ^{125}I を添加し, 8 日目に甲状腺濾胞細胞に取り込まれた ^{125}I と培養液中に分泌された有機ヨードの放射活性を測定した。□ は甲状腺濾胞細胞に取り込まれた ^{125}I を示し, ● は培養液中に分泌された有機ヨードの放射活性を示す (平均値 \pm 標準偏差, n=4)。

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$

DMSO 非添加群を対照とした。

濃度は, 1.5% 程度とした。

2) DMSO の効果についての時間経過

DMSO の効果について経時的に検討した結果は図 2 に示す。培養液に TSH 100 $\mu\text{U/ml}$ と 1.7% DMSO を添加して, ヒト甲状腺濾胞細胞を培養した。培養 1 日目, 3 日目, 5 日目, 7 日目, 9 日目, 11 日目に Na ^{125}I を 2×10^5 cpm/well ずつ添加し, さらに 2 日間ずつ培養した後, 濾胞に取り込まれた ^{125}I および培養液中に分泌された有機ヨードの放射活性を測定した。培養液に DMSO を添加しなかった場合には, ^{125}I の取り込みと有機ヨードの分泌能は徐々に減少していき, 培養 7 日目以降ではほぼ完全に消失した。しかしながら DMSO を添加した場合には, 有機ヨードの分泌能は, 培養 3~5 日目で最大となり, このような甲状腺細胞の機能は 11 日以上維持された。

3) TSH 濃度の効果

DMSO (1.7%) 存在下で TSH に対する用量反応性について検討した。図 3 に示すように TSH は 1 $\mu\text{U/ml}$ にて有意に有機ヨードの分泌を増加させた。 ^{125}I の取り込みも TSH の濃度依存性に刺激

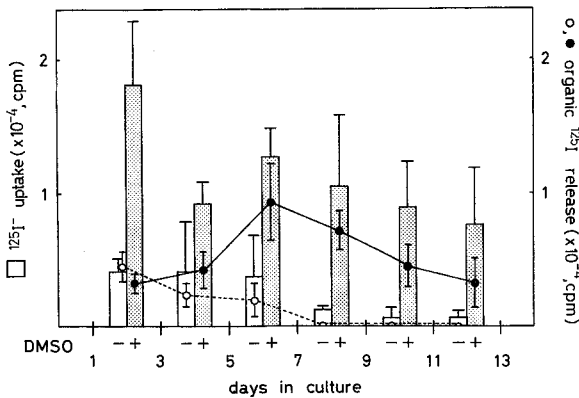


図2 甲状腺細胞機能におよぼすDMSO効果の時間経過

□はDMSO非添加時に甲状腺細胞に取り込まれた ^{125}I , ○は培養液中に分泌された有機ヨードの放射活性を示す。■はDMSO 1.7%添加時に甲状腺細胞に取り込まれた ^{125}I , ●は培養液中に分泌された有機ヨードの放射活性を示す(平均値±標準偏差, n=4)。

され、 $100\mu\text{U/ml}$ にて最大の刺激効果が認められた。しかしながら、 $1,000\mu\text{U/ml}$ 以上の高濃度では逆に ^{125}I の取り込みも有機ヨードの分泌もともに減弱する傾向が認められた。

4) ウシ胎児血清(FCS)の濃度の検討

培養液に添加するFCS濃度(0~10%)の効果について検討するため、甲状腺濾胞細胞をTSH $100\mu\text{U/ml}$, DMSO 1.7%の存在下で培養した。図4Aに示すように、DMSO非添加時には、2%以上のFCSは ^{125}I の取り込みと有機ヨードの分泌を有意に抑制し、5%以上では、甲状腺細胞の機能はほぼ完全に消失した。これに対しDMSO(1.7%)を添加した場合(図4B)には、 ^{125}I の取り込みと有機ヨードの分泌促進効果は、2%のFCSを添加しても認められ、甲状腺細胞の機能も良好に維持された。しかしながら、2%以上のFCS添加では、甲状腺細胞の機能は、濃度依存性に抑制される傾向が認められた。

2. 培養ヒト甲状腺細胞に対するバセドウ病患者IgGの効果

バセドウ病患者IgGの甲状腺細胞に対する刺激効果について検討した(図5)。バセドウ病患者IgG(Y.N.)は、甲状腺細胞の有機ヨードの分泌を、 1.3mg/ml ~ 3.9mg/ml の範囲で用量依存性に刺

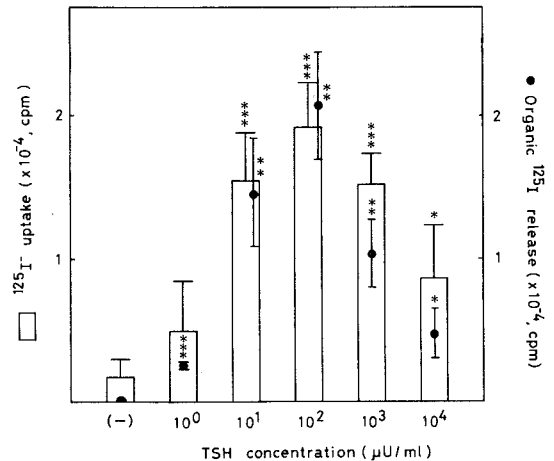


図3 甲状腺細胞機能におよぼすTSH濃度の効果
DMSO(1.7%)の存在下で種々の濃度のTSH($0\sim 10^4\mu\text{U/ml}$)とともに培養した甲状腺濾胞細胞の機能を示す。□は甲状腺濾胞細胞に取り込まれた ^{125}I を示し、●は培養液中に分泌された有機ヨードの放射活性を示す(平均値±標準偏差, n=4)。
* $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$ 。
TSH非添加群を対照とした。

激した。したがって、以後添加するIgGの濃度は、1回に採取できる血清量をも考慮し、 1.3mg/ml とした。

次に正常人とバセドウ病患者より抽出したIgGの培養ヒト甲状腺細胞に対する効果について検討した。図6にその代表例を示す。正常人のIgG(1.3mg/ml)を添加した場合には、刺激効果はほとんど認められなかったが、バセドウ病患者のIgG(1.3mg/ml)を添加した場合には、 ^{125}I の取り込みも有機ヨードの分泌も有意に増加した。この甲状腺刺激効果は自己のIgGのみならず、他のバセドウ病患者IgGを添加したばあいにも認められた。これまでに20数回のバイオアッセイを行っており、その結果を表1に示した。甲状腺機能亢進症の著しいバセドウ病患者より得られたIgGは、全例で自己および他人の甲状腺細胞を刺激し、有機ヨードの分泌を増加させた。一方、正常人のIgGでは、このような刺激活性は認められなかった(n=6)。

3. 有機ヨードの分析

Na ^{125}I を添加して3日後に培養液上清の一部

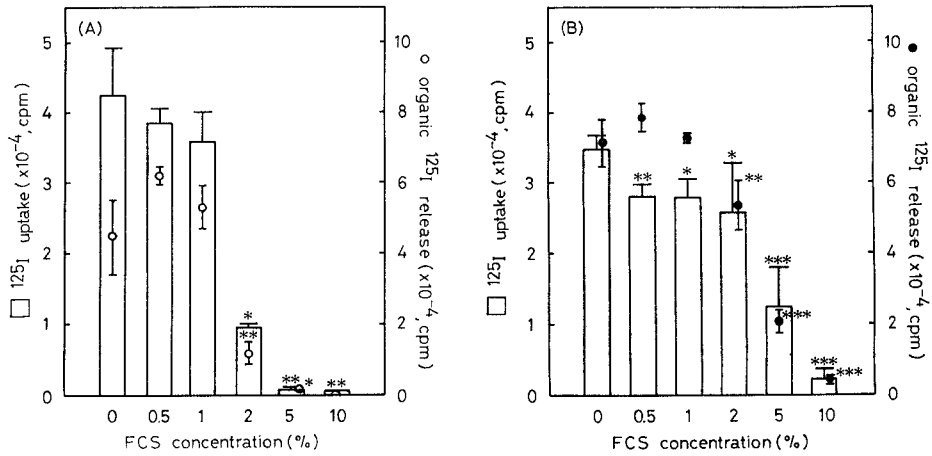


図4 甲状腺細胞機能におよぼすFCS濃度の効果

培養液に TSH(100 μ U/ml), FCS(0~10%)を添加して甲状腺細胞を培養し, DMSO 非添加時 (A) および添加時 (B) における FCS 濃度の効果について検討した。□は甲状腺に取り込まれた ^{125}I , ○, ●は培養液中に分泌された有機ヨードの放射活性を示す (平均値 \pm 標準偏差, n=4).

*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001

FCS 非添加群を対照とした。

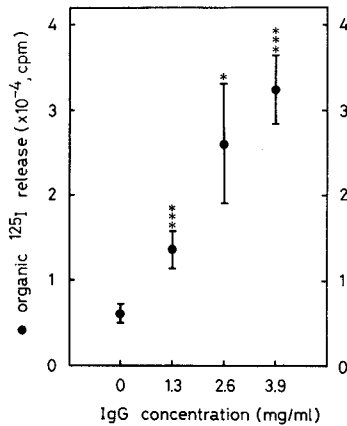


図5 バセドウ病患者のIgGの用量反応性

培養液に DMSO 1.7%, バセドウ病患者 IgG 0~3.9 mg/ml を添加し, バセドウ病患者 IgG の用量反応性について検討した。●は培養液中に分泌された有機ヨードの放射活性を示す (平均値 \pm 標準偏差, n=4).

*p<0.05, **p<0.001

IgG 非添加群を対照とした。

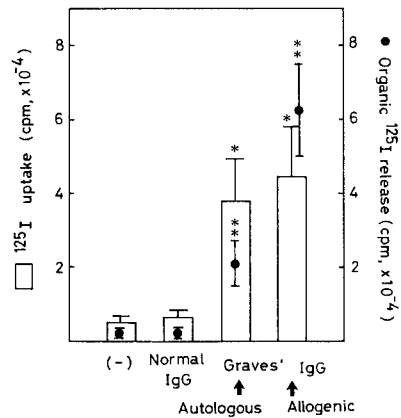


図6 甲状腺濾胞細胞に対する正常人およびバセドウ病患者 IgG の効果

(-) は IgG を添加しないで培養したことをしめす, “normal” はバセドウ病患者 (表 1 の症例 2) の甲状腺細胞に正常人 IgG を添加して培養したもの, “Autologous” はバセドウ病患者 (症例 2) の甲状腺細胞に自己の IgG を添加して培養したもの, “Allogenic” は他のバセドウ病患者 (症例 1) の IgG と培養したことを示す。□は甲状腺細胞に取り込まれた ^{125}I , ●は培養液中に分泌された有機ヨードの放射活性を示す (平均値 \pm 標準偏差, n=4).

*p<0.05, **p<0.01.

IgG 非添加群を対照とした。

をセファデックス G-25 のカラムに添加し, TSH 存在下で分泌されてきた有機ヨードを分析した。図 7 に示すように, void volume の部分に溶出されるヨード蛋白 (蛋白に結合した有機ヨード) は

表1 バセドウ病患者 IgG の甲状腺刺激活性

		IgG prepared from					
		1	2	3	4	5	6
Graves' thyroid tissue	1	⊕					
	2	+	⊕				
	3		+	⊕		+	
	4		+	+	⊕		
	5	+					
	6				+		
	7			+		+	
	8		+				
	9						+

バセドウ病患者 IgG と バイオアッセイ に用いた甲状腺組織の組み合わせを示した。⊕ はバセドウ病患者 IgG が自己の甲状腺濾胞細胞を刺激して有機ヨードの分泌を増加させたことを示す。+ は他の患者由来の甲状腺濾胞細胞を刺激したことを示す

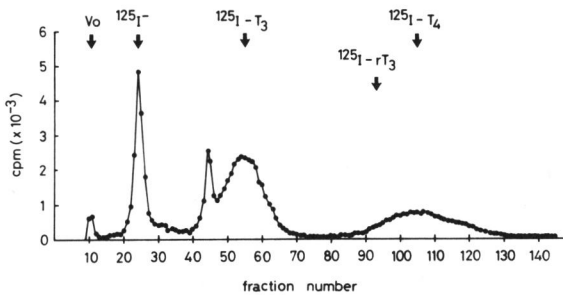


図7 Conditioned medium 中の有機ヨードの分析
甲状腺濾胞細胞を TSH (100 μ U/ml), DMSO (1.7%) の存在下で培養し, 125 I 添加後 3 日目に培養上清の一部をセファデックス G-25 のカラム (2.2 \times 25cm) にてゲル濾過したもの。矢印は左からそれぞれ Vo(void volume, blue dextran), 125 I-, 125 I-T₃, 125 I-rT₃, 125 I-T₄ の溶出部位を示す。

ごく一部であり, 大部分は蛋白に結合しない有機ヨードであった。また, その溶出部位は, 125 I-T₃, 125 I-T₄ の溶出部位に一致していた。次に, 甲状腺濾胞および培養液中の有機ヨードを酸・ブタノールで抽出し, 薄層クロマトグラフィー (TLC) にて分析した結果を図 8 に示す。甲状腺濾胞内には, monoiodotyrosine (MIT), diiodotyrosine (DIT), T₃, T₄ が認められ, MIT > DIT, T₄ > T₃ であった。また, 培養液中に分泌された有機ヨ-

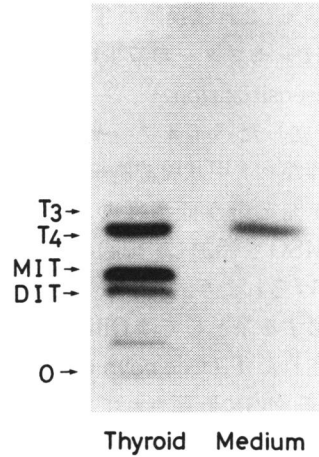


図8 甲状腺濾胞細胞内および培養液中に分泌された有機ヨードの autoradiogram
甲状腺濾胞細胞を TSH (100 μ U/ml), DMSO (1.7%) 存在下で培養し, 125 I 添加後 3 日目に, 甲状腺濾胞内と培養液中に分泌された有機ヨードを酸・ブタノールで抽出し, 薄層クロマトグラフィー (TLC) にて分析したもの。展開液には, 2N NH₄OH-ブタノールを使用した。O は Origin, MIT は Monoiodotyrosine, DIT は Diiodotyrosine を示す。

ドは大部分 T₃ と T₄ であった。

考 察

我々は, 培養液に DMSO を添加してバセドウ病甲状腺濾胞細胞を長期間培養し, TSH の存在下で de novo に甲状腺ホルモンを合成し, 分泌する甲状腺濾胞細胞の培養系を確立した。さらに, 甲状腺機能が著明に亢進しているバセドウ病患者より得られた IgG (1.3mg/ml) を添加して甲状腺濾胞細胞を培養したところ, 125 I の取り込みと有機ヨードの分泌を刺激する作用が認められた。したがって, 我々は, バセドウ病患者の甲状腺内で生じている現象を in vitro の系ではじめて再現することに成功したわけである。なお, このバイオアッセイ法は, 非常に感度がよく, TSH 1~3 μ U/ml, バセドウ病患者 IgG 1.3mg/ml に反応した。ちなみに, 正常人の血中 TSH は 4 μ U/ml 以下であり, 血中 IgG の濃度は 8~18mg/ml であるので, 非常に高感度なバイオアッセイ法といえよう。なお, 高濃度の TSH (1,000 μ U/ml 以上) を添加した時, 甲状腺濾胞細胞の反応はむしろ減弱する傾向が認めら

れたが(図3), これは過剰のTSHによる甲状腺細胞のTSHレセプターの減少によるものと推測された(desensitization)²¹⁾.

我々の確立したバイオアッセイ法の特徴として,(1)新鮮なヒト甲状腺濾胞細胞を用いたこと,(2)0.5~1%という低濃度のFCSを用いたこと,(3)DMSOを添加し,細胞の脱分化を抑制したことがあげられよう.これまでTSHに反応してT₃を分泌する系としてはOllisら²²⁾の報告があるが,分泌されたT₃はde novoに合成されたものではなく,細胞内に貯蔵されていたものであると推測している.彼らは,DMSOのような脱分化抑制剤は使用しておらず,また10%という高濃度のFCSを使用しており,このような培養条件下では細胞の機能(ヨードの取り込みとヨードの有機化能)は失われてしまっているはずである(図4参照).また,培養液に添加するFCSの濃度が高いとヨードの取り込みが抑制されるという現象は,最近,Readerら²³⁾によっても報告されている.

DMSOがなぜ細胞機能を維持するのかその理由は不明であるが,ある種の栄養素やホルモンのキャリアーとして作用したり,細胞核に作用して分化に関連した遺伝子に作用する機序が考えられている¹⁴⁾.さらに都合なことには,DMSOには,radioprotectiveな作用もあり²⁴⁾,甲状腺細胞の¹²⁵Iによる放射線障害を減らしているものと推測される.

ところで,最近,バセドウ病患者IgGには自己の甲状腺のみを刺激し,他人の甲状腺は刺激しないという報告がされている¹¹⁾.しかしながら,Adamsら²⁵⁾は,正常人にバセドウ病患者血清を静注したところ,甲状腺刺激活性を認めたと報告している.また,Hoermannら²⁶⁾は,バセドウ病患者のIgGと他の患者由来の甲状腺スライスをインキュベートしてT₃分泌刺激活性を認めている.また,今回の我々の研究からも,バセドウ病患者IgGの甲状腺刺激作用は,自己のみならず,他人の甲状腺細胞にも認められる普遍的な現象と考えられる.

我々の測定法には,新鮮な甲状腺組織を必要とし,操作がやや煩雑であるという欠点があるもの

の,甲状腺の無機ヨードの取り込みとホルモン分泌を同時に測定できるという理想的な方法である.

今回,我々は,液性免疫の立場からバセドウ病患者の甲状腺内に起こっている現象をin vitroで再現することに成功した.向後は,免疫担当細胞をこの系に添加することによりバセドウ病の成因を細胞性免疫の立場から検討していきたい.

結 語

1. ヒト甲状腺細胞は,長期間培養するとしだいにヨードの有機化能を失っていくが,低濃度のFCSを含有する培養液中に脱分化抑制剤であるDMSOを添加して培養することにより,甲状腺細胞の機能(ヨード有機化能およびT₃, T₄の分泌能)を長期間(約2週間)にわたり維持することができた.

2. この系を用い,TSHおよびTRAbに反応して,甲状腺ホルモンをde novoに合成し,分泌するバイオアッセイ法を開発した.

3. バセドウ病患者のIgGは,全例(n=6)自己のみならず他人の甲状腺細胞を刺激し,ホルモン分泌を刺激した.

4. このバイオアッセイ法は,TRAbの作用機序の解明やバセドウ病の寛解の判定および抗甲状腺剤の中止時期の決定上,有用な測定法と思われる.

稿を終えるにあたり,御助言,御校閲を賜りました鎮目和夫教授,対馬敏夫教授,直接御指導頂きました佐藤幹二助教授に深謝いたします.また,御協力下さいました東京女子医大第二内科小澤稔先生,今村英仁先生,内分泌外科藤本吉秀教授,小原孝男助教授,伊藤悠基夫講師,八代享先生,金地嘉春先生その他内分泌外科の諸先生方および金地病院院長金地嘉夫先生に謝意を表します.

なお,本論文の要旨は,第60回日本内分泌学会学術総会にて発表した.

文 献

- 1) McKenzie JM, Zakarija M: Assay of the thyroid stimulating antibodies (TSAb) of Graves' disease. In The Thyroid. 5th ed. (Ingbar SH, Braverman LE ed), pp559-575, JB

- Lippincott, Philadelphia (1986)
- 2) **Smith BR, Hall R**: Thyroid stimulating immunoglobulins in Graves' disease. *Lancet* **ii**: 427-431, 1974
 - 3) **Endo K, Kasagi K, Konishi J et al**: Detection and properties of TSH-binding inhibitor immunoglobulins in patients with Graves' disease and Hashimoto's thyroiditis. *J Clin Endocrinol Metab* **46**: 734-739, 1978
 - 4) **Onaya T, Koyani M, Yamada T et al**: New in vitro tests to detect the thyroid stimulator in sera from hyperthyroid patients by measuring colloid droplet formation and cyclic AMP in human thyroid slices. *J Clin Endocrinol Metab* **36**: 859-866, 1973
 - 5) **Orgiazzi J, Williams DE, Chopra IJ et al**: Human thyroid adenyl cyclase-stimulating activity in immunoglobulin G of patients with Graves' disease. *J Clin Endocrinol Metab* **42**: 341-354, 1976
 - 6) **Kasagi K, Konishi J, Iida Y et al**: A new in vitro assay for human thyroid stimulator using cultured thyroid cells: Effect of sodium chloride on adenosine 3',5'-monophosphate increase. *J Clin Endocrinol Metab* **54**: 108-114, 1982
 - 7) **Isozaki O, Tsushima T, Shizume K et al**: Thyroid-stimulating antibody bioassay using porcine thyroid cells cultured in follicles. *J Clin Endocrinol Metab* **61**: 1105-1111, 1985
 - 8) **Vitti P, Rottella CM, Valente WA et al**: Characterization of the optimal stimulatory effects of Graves' monoclonal and serum immunoglobulin G on adenosine 3',5'-monophosphate production in FRTL-5 thyroid cells: A potential clinical assay. *J Clin Endocrinol Metab* **57**: 782-791, 1983
 - 9) **Lauberg P, Weeke J**: T_3 release from thyroid slices as an assay for thyroid stimulators. *Scand J Clin Lab Invest* **33**: 723-727, 1975
 - 10) **Atkinson S, Kendall-Taylor P**: The stimulation of thyroid hormone secretion in vitro by thyroid-stimulating antibodies. *J Clin Endocrinol Metab* **53**: 1263-1266, 1981
 - 11) **Yamashita S, Izumi M, Nagataki S**: Specific stimulatory effects of Graves' IgG on the release of triiodothyronine from the patients' own thyroids. *Acta Endocrinol* **112**: 204-209, 1986
 - 12) **Fukue Y, Uchimura H, Mitsuhashi T et al**: Thyroglobulin release-stimulating activity in immunoglobulin G from patients with Graves' disease studied by human thyroid cells in vitro. *J Clin Endocrinol Metab* **63**: 261-265, 1987
 - 13) **Collins SJ, Ruscetti FW, Gallagher RE et al**: Terminal differentiation of human promyelocytic leukemia cells induced by dimethyl sulfoxide and other polar compounds. *Proc Natl Acad Sci USA* **75**: 2458-2462, 1978
 - 14) **Isom HC, Secott T, Georgoff I et al**: Maintenance of differentiated rat hepatocytes in primary culture. *Proc Natl Acad Sci USA* **82**: 3252-3256, 1985
 - 15) **Borges M, Ingbar JC, Endo K et al**: A new method for assessing the thyrotropin binding inhibitory activity in the immunoglobulins and whole serum of patients with Graves' disease. *J Clin Endocrinol Metab* **54**: 552-558, 1982
 - 16) **Nitsch L, Wollman SH**: Suspension culture of separated follicles consisting of differentiated thyroid epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA* **77**: 472-476, 1980
 - 17) **Bradford MM**: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**: 248-254, 1976
 - 18) **Gavin LA, Hammond ME, Castle JN et al**: 3,3'-diiodothyronine production, a major pathway of peripheral iodothyronine metabolism in man. *J Clin Invest* **61**: 1276-1285, 1978
 - 19) **Inoue K, Taurog A**: Digestion of ^{131}I -labeled thyroid tissue with maximum recovery of ^{131}I -iodothyronines. *Endocrinology* **81**: 319-332, 1967
 - 20) **Sato K, Robbins J**: Thyroid hormone metabolism in cultured monkey hepatocarcinoma cells. *J Biol Chem* **255**: 7347-7352, 1980
 - 21) **Holmes SD, Gitlin J, Titus G et al**: Effect of increased circulating thyroid-stimulating hormone on in vitro thyroid-stimulating hormone stimulation of thyroid and adipose tissues. *Endocrinology* **106**: 1892-1899, 1980
 - 22) **Ollis CA, Fowles A, Brown BL et al**: Human thyroid cells in monolayer retain the ability to secrete triiodothyronine in response to thyrotrophin. *J Endocrinol* **104**: 285-290, 1985
 - 23) **Reader SCJ, Davison B, Ratcliffe JG et al**: Measurement of low concentrations of bovine thyrotrophin by iodide uptake and organification in porcine thyrocytes. *J Endocrinol* **106**: 13-20, 1985
 - 24) **Ashwood-Smith MJ**: Radioprotective and cryoprotective properties of dimethyl sulfoxide in cellular systems. *Ann NY Acad Sci* **141**:

- 45-62, 1967
- 25) **Adams DD, Fastier FN, Howie JB et al:**
Stimulation of the human thyroid by infusions
of plasma containing LATS protector. J Clin
Endocrinol Metab 39 : 826-832, 1974
- 26) **Hoermann R, Mueller R, Saller B et al:** T₃
releasing activity by Graves' sera from Graves'
thyroid in vitro. Acta Endocrinol 111 : 487-493,
1986
-