Studies on the Behavioral Pharmacology of TRH-T in Cytosine Arabinoside-Induced Ataxic Mice : A Comparison with Genetically Ataxic Mice

Kyoko MATSUI, Yukio MANO, Masakuni MUKOYAMA, Osamu MURAMOTO,
Eitoku TOYOSHIMA and Kazuya ANDO.

*National Center for Nervous, Mental and Muscular Disorders.
2620, Ogawa-Higashi-Machi, Kodaira, Tokyo, 187, Japan*

(Received for publication : March 24, 1982)

The effects of thyrotropin releasing hormone tartrate (TRH-T) on the behavior of cytosine arabinoside (Ara-C) induced ataxic mice were studied. The ataxic mice were prepared by injecting 50 mg/kg/day subcutaneously on the 2nd, 3rd and 4th postnatal days. Spontaneous motor activities were measured with a movement spectrum analyzer (ANIMEX-2) and the degree of ataxic gait determined by an open-field study. Cerebella from these animals were subjected to histopathologic examination at 4, 8 and 12 weeks of age. Ataxic gait became improved moderately and spontaneous motor activities increased slightly following administration of TRH-T. The effects of TRH-T on ataxia and spontaneous motility in the Ara-C injected mice varied with the age, and resembled those seen in weaver mice but not those in the Rolling mouse Nagoya. The results also suggest that the effects of TRH-T on the behavior of ataxic mice correlate with the extent of pathologic changes evoked in their cerebella.

Cytosine arabinoside による薬物性運動失調マウスに対する TRH-T 投与後の行動薬理学的研究：遺伝性運動失調 マウスとの比較検討

松井京子・真野行生・向山昌邦・村本 治・豊島英徳・安藤一也

国立武蔵療養所神経センター

序 文

遺伝性運動失調マウスの一種である Rolling mouse Nagoya (RMN) では thyrotropin releasing hormone (L-pyroglutamyl-L-histidyl-L-prolinamide tartrate : TRH-T) 投与で著明な運動失調改善効果が

みられるが[1, 3, 10], 薬物性運動失調マウスに対する TRH-T の影響については未だ報告をみない。そこで、我々は cytosine arabinoside (Ara-C) を投与して薬物性運動失調マウスを作出し (Ara-C マウス), この Ara-C マウスについて週齢別に病理組織学的検査を行ない、それぞれに TRH-T を投与し、運動失調改善効果の有無および運動量に対する影響を検討した。また、

遺伝性運動失調マウスの RMN および weaver マウスに TRH-T を投与した場合と比較検討を行ない、病理組織学的変化との関連について言及する。

材料および方法

使用薬物：TRH-T は TRH-T 2 mg 注射液（武田薬品）、Ara-C は cytoside 20mg 注射液（日本新薬）を使用した。

実験動物：Ara-C マウスは新生仔期（JCL：ICR 系）に Ara-C 50mg/kg を 3 回皮下注射して作成し、生後 4, 8, および 12 週齢（♂）を実験に使用した。RMN, weaver マウスは生後 8 週齢（♂）を実験に使用した。

病理組織学的検索：4, 8 および 12 週齢の正常マウスと Ara-C マウスを断頭後、脳を取出し、10%ホルマリン固定、パラフィン包埋後、hematoxyline-eosine 染色で光顕標本を作製し、病理組織学的に検索した。

open field での計測：本実験に用いた open-field は 70cm² の正方形のフィールドで縦・横に七等分し、周囲には高さ 10cm の柵をつけたものである（Fig. 1）。マウスがフィールド内の一区画を横切った場合を移動量『1』とし、単位時間内の移動量および転倒回数を計測した。『転倒回数 / 移動量』の値を転倒指数とし、運動失調状態の程度のパラメータとした。4, 8 および 12 週齢の Ara-C マウスそれぞれ 8 匹に TRH-T 25mg/kg または同量の生理食塩水を腹腔内注射し、5 分毎に投与後 30 分まで転倒指数を計測し、TRH-T による失調改善効果および作用持続時間などについて検討した。RMN, weaver マウスについても同様の方法で実験を行なった。

ANIMEX-II での計測：ANIMEX-II は電磁的運動

Fig. 1. Apparatus for open field study.

量測定装置でマウスの運動の変化を電気容量の変化として記録することができる。この ANIMEX-II により 4, 8 および 12 週齢の Ara-C マウスと正常マウスそれぞれ 10 匹に TRH-T 25mg/kg または同量の生理食塩水を腹腔内注射し、10 分毎に 80 分間にわたり運動量を測定し、TRH-T の運動量に対する影響について検討した。RMN, weaver マウスについても同様の方法で実験を行なった。さらに X-Y レコーダにて Ara-C マウスの TRH-T 投与前後のケージ内での動きを歩行軌跡として記録した。

成績

病理組織学的検索：4, 8 および 12 週齢の Ara-C マウスの小脳小葉の幅は正常マウスに比べはほぼ半程度であった。各小葉の構造をみると顆粒細胞の数が正常マウスに比べて著しく減少していた。プルキンエ細胞の配列は乱れて 2 層～5 層に重層状に存在している部位を認めた。これらの所見は 4, 8 および 12 週齢においても同様であり、顆粒細胞やプルキンエ細胞の変性または再生の過程が進行した所見はこれらの時期においては認められなかった（Fig. 2）。

open field での計測：TRH-T を各週齢の Ara-C マウスに投与すると生理食塩水投与に比べ、転倒指数の平均値は低下するが、有意に低下する時間が週齢によりやや異なった。4 週齢の Ara-C マウスでは投与 20 分後まで転倒指数の値は有意に低下し、投与 5 分以内において最低の値を示した。8 週齢の Ara-C マウスでは投与 5 分後から 15 分後まで転倒指数の値は有意に低下し、投与 5 分後から 10 分後の間に最低の値を示した。12 週齢の Ara-C マウスでは投与 5 分後から 10 分後の間のみ転倒指数の値は有意に低下し、最低の値を示した（Fig. 3）。

weaver マウスでは TRH-T 投与により投与 15 分後まで転倒指数の値は有意に低下し、投与 10 分から 15 分の間に最低の値を示した（Fig. 4, upper）。

RMN では投与 25 分後まで転倒指数の値は有意に低下し、投与 5 分から 10 分の間に最低の値を示した（Fig. 4, lower）。

ANIMEX-II での計測：正常マウスでは TRH-T 投与は生理食塩水投与に比べ 4 週齢では投与 40 分後まで、8 週齢では投与 60 分後まで、12 週齢では投与 40 分後まで有意に運動量が増加した（Fig. 5）。

4 週齢の Ara-C マウスは生理食塩水投与時でも運動量は、8, 12 週齢に比べて多く、TRH-T 投与によって

Fig. 2. Neuropathologic findings of the cerebellum.

Upper : normal mouse at 4 weeks of age

Lower : Ara-C mouse at 4 weeks of age, demonstrating loss of granule cells and persistent external granule cells.

も生理食塩水投与時に比べて、有意な運動量の増加はみられなかった。しかし、8週齢の Ara-C マウスでは TRH-T 投与20分後まで、また、12週齢の Ara-C マウスでは TRH-T 投与10分後から40分後の間において、生理食塩水投与に比べ、有意に運動量が増加した (Fig. 6)。X-Yレコーダ上にての歩行軌跡では TRH-T 投与前のきわめて不規則な軌跡は投与10分後には軽減された (Fig. 7)。

weaver マウスでは TRH-T 投与10分後においてのみ有意に運動量が増加し、その後徐々に運動量が低下した (Fig. 8, upper)。

RMN では TRH-T 投与50分後まで有意に運動量が増加し、投与60分後から70分後にかけて再び有意に運動量が増加した (Fig. 8, lower)。

考 察

Ara-C マウスの小脳の病理組織学的変化は遺伝性運動失調マウスのうちでは顆粒細胞の欠損を特徴とする weaver マウス[4]と比較的類似していた。TRH-T の薬理学的効果もまた両マウスで類似し、中等度の運動失調の改善と軽度の運動量の増加を示したが、このような

Fig. 3. Fall index (number of fall/number of movement) in Ara-C mice (n=8) at 4, 8 and 12 weeks of age.
 Upper : Ara-C mice at 4 weeks of age.
 Middle : Ara-C mice at 8 weeks of age.
 Lower : Ara-C mice at 12 weeks of age.
 ※ p < 0.05

Fig. 4. Fall index (number of fall/number of movement) in genetical mutant mice (n=8) at 8 weeks of age.

Upper : weaver Lower : RMN

※※ p < 0.01 ※ p < 0.05

TRH-T 投与後の薬理学的反応の類似性は小脳の病理組織学的変化の類似性を反映しているものと考えられた。

RMNは小脳におけるアミノ酸伝達物質の異常と中枢神経系の多くの部位でのカテコールアミン合成酵素 (tyrosine hydroxylase: TH) 活性の上昇が認められているが[8], RMNのように小脳の病理組織学的変化の乏しいマウス[6]の方が weaver マウス, Ara-C マウスのように小脳の病理組織学的変化のはっきりしたマウス

Fig. 5. Total length of movements after injections of TRH-T and saline (n=10).
 Upper : normal mice at 4 weeks of age.
 Middle : normal mice at 8 weeks of age.
 Lower : normal mice at 12 weeks of age.
 ※※ $p < 0.01$ ※ $p < 0.05$

スに比べ TRH-T の薬理学的効果がより明確に発現する可能性があると考えられた。

正常マウスでは生理的食塩水投与後の運動量について 4, 8 および 12 週齢時を比べてみると加齢に伴って運動量が低下するが、この傾向は Ara-C マウスについても同様であった。しかし、4 週齢時には生理食塩水投与

Fig. 6. Total length of movements after injection of TRH-T and saline (n=10).
 Upper : Ara-C mice at 4 weeks of age.
 Middle : Ara-C mice at 8 weeks of age.
 Lower : Ara-C mice at 12 weeks of age.
 ※※ $p < 0.01$ ※ $p < 0.05$

時の運動量は Ara-C マウスの方が正常マウスに比べて多く、より活発な運動を示した。薬物投与による動物の運動量の異常増加に関しては methylazoxymethanol (MAM) を妊娠 14 日目のラットに投与し、生まれた小頭症ラットにおいても認められたという報告があるが

Fig. 7. Comparison of loci of movement before and after injection of TRH-T in Ara-C mice.

(第16回, 日本実験動物学会, 1981), このような現象がどのような機序に基づいているのか今後の検討が必要であらう。

正常マウスでは, 4, 8 および 12 週齢時において TRH-T 投与後少なくとも 40 分間は生理的食塩水投与に比べ有意に運動量が増加したが Ara-C マウスでは全週齢期間を通じて TRH-T 投与後も正常マウスほどには有意な運動量の増加はみられなかった。この傾向はとくに幼若なマウスほど著明であった。一方, TRH-T 投与による運動失調改善効果は幼若マウスほど失調改善傾向がより明確で効果の持続時間も長く, 加齢による薬理学的反応の差がみられた。しかし, 小脳における病理組織学的所見では加齢による明らかな差はみられなかった。Ara-C マウスの脳内カテコールアミンの生化学的検索では小脳 NA, 5-HT 濃度は, 10, 20 日目では対照に比べて増加を認め, 特に 70 日目では DNA あたりの 5-HT, NA 濃度は対照群の 6 倍の増加が認められ, 加齢による Ara-C マウスの小脳の生化学的変化が認められたとされている [11]。このようなことが TRH-T の薬理学的

Fig. 8. Total length of movements after injection of TRH-T and saline (n=10).

Upper : weaver Lower : RMN

*** p < 0.01 ** p < 0.05

効果の発現にも影響を及ぼし週齢による差が生じたとも考えられた。

TRH-T を側坐核に直接注入することによって惹起される運動量亢進作用は haloperidol や pimozide の注入により抑制されることから TRH-T の自発運動亢進作用は主として大脳辺縁系の DA ニューロン終末から DA の遊離促進に由来するといわれている [5]。RMN では TRH-T による運動量亢進は正常マウスと同程度であるのに対し, Ara-C マウスおよび weaver は TRH-T 投与による運動量亢進が少ないことから DA ニューロンの遊離機構の異常などの関連も考えられる。

TRH-T の運動失調改善効果について RMN では NA の代謝回転の促進によるとの説も提唱されている [2]。

しかし、RMNを含め運動失調マウスの小脳における生化学的検索ではNAの過剰蓄積がなく、逆に代謝回転は亢進し、このような代謝回転はweaverはより高度でAra-Cマウスは中等度、RMNでは軽度という報告もある[7]。この生化学的検索結果からはTRH-Tの運動失調改善効果と小脳のNA代謝異常とは必ずしも平行しないといえる。TRHの中樞作用は多彩であり、運動失調改善効果の発現のメカニズムにはNA代謝回転の促進以外の機序についても今後さらに検討する必要があると思われる。

いづれにしても、薬物性運動失調マウス(Ara-Cマウス)にも遺伝性運動失調マウスと同様にTRH-T投与による運動失調改善効果が今回の実験により確かめられた。TRH-Tの運動失調改善の作用機序が解明されればヒトの運動失調症の病態解明にも役立つと考えられ、さらに詳細に検索する必要がある。

Ara-Cマウスは小脳の低形成以外に網膜の形成異常、成長抑制なども認められている[9]。しかし、他の遺伝性運動失調マウスに比べると飼育が簡単であり、生存率がよく神経疾患の病態モデル動物の研究には適した運動であると考えられる。

要 約

マウスの新生仔期にcytosine arabinoside 50mg/kgを3回皮下注射して作成した運動失調マウス(Ara-Cマウス)にTRH-T 25mg/kgを週齢別に腹腔内注射し、運動失調に対する効果および運動量に対する影響をopen fieldおよびANIMEX-IIにより行動薬理的に検討した。さらに週齢別に小脳の病理組織学的変化についても検討を加えた。TRH-T投与によりAra-Cマウスの運動失調は中等度の改善を示し、幼若なAra-Cマウスの方が成獣のAra-Cマウスよりも運動失調改善の傾向が著しく、TRH-T投与による運動量の増加は逆に成獣のAra-Cマウスの方がより多く週齢によりTRH-Tの薬理学的効果の差異が認められた。しかし、

加齢による明らかな病理組織学的所見の変化は認められなかった。Ara-CマウスのTRH-T投与による行動薬理的反応は遺伝性運動失調マウスのweaverマウスと類似し、Rolling mouse Nagoyaとは異なっていたが、これは小脳の病理組織学的変化の相違によるものと考えられた。

文 献

- [1] 足立皓岑・小長谷正明・室賀辰夫・満間照典・仁瓶礼之・高柳哲也・祖父江逸郎・織田銃一・亀山義郎(1977). Thyrotropin releasing hormone 投与による Rolling mouse Nagoya の失調性歩行への影響, 医学のあゆみ, **101**, 74-75.
- [2] 小長谷正明・高柳哲也・室賀辰夫・足立皓岑・祖父江逸郎(1980). Rolling mouse Nagoya の脳内ノルアドレナリンと thyrotropin releasing hormone の影響, 臨床神経, **20**, 181-188.
- [3] 松井京子・真野行生・豊島英徳・安藤一也(1980). 各種遺伝性運動失調マウスに対するTRH投与の影響について. 国立武蔵療養所神経センター年報 第3号, 141-143.
- [4] 御子柴克彦(1979). 運動失調モデル——遺伝性小脳変性症マウス——(weaver, staggerer, reeler, nervous, pcd). 神経進歩, **23**, 918-936.
- [5] Miyamoto, M., and Nagawa, Y. (1977). Mesolimbic involvement in the locomotor stimulant action of thyrotropin releasing hormone (TRH) in rats. *Eur. J. Pharmacol.*, **44**, 143-152.
- [6] 向山昌邦・水野恵介(1976). Rolling mouse Nagoya の小脳——光顕的および電顕的研究——. 最新医学, **31**, 233-238.
- [7] Muramoto, O., Ando, K., and Kanazawa, I. (1982). Central noradrenaline metabolism in cerebellar ataxic mice. *Brain Res.* **237**, 387-395.
- [8] Muramoto, O., Kanazawa, I., and Ando, K. (1981). Neurotransmitter abnormality in Rolling mouse Nagoya, an ataxic mutant mouse. *Brain Res.*, **215**, 295-304.
- [9] Shimada, M., Wakaizumi, S., and Kasubuchi, Y. (1973). Cytosine arabinoside and rosette formation in mouse retina. *Nature*, **256**, 151-152.
- [10] 祖父江逸郎(1977). 視床下部ホルモンと中枢機能との新しい接点——TRHと運動失調との関連をめぐって. 臨床神経, **17**, 791-799.
- [11] 辻 元宏・岩瀬則文・佐藤啓二・高橋三郎・島田司己(1979). Cytosine arabinoside 投与による小脳形成不全マウスの脳内物質の変化と組織化学. 神経化学, **18**, 320-323.