TRH 誘導体 (DN-1417) および TRH-T 投与の ラット脳内ソマトスタチンにおよぼす影響

Effects of TRH-analog (DN-1417) and TRH-T on
Immunoreactive Somatostatin Contents in the Rat Brain

永 木 茂* 加 藤 進 昌

要旨: TRH の誘導体 DN-1417 と TRH-T を各々 0.2 mg/kg, 2 mg/kg をラット腹腔内へ1回投与(急性投与群), 1日1回連続10日間投与(慢性投与群)し, ラット脳内ソマトスタチン様免疫活性(IR-SRIF)の変化を検討した。その結果, DN-1417 慢性投与群で, ラット脳内 IR-SRIF の減少を大脳辺縁系を中心とする部位に認めた。投与量は, 0.2 mg/kg 投与の方が, 2 mg/kg 投与よりも, より有意の IR-SRIF の減少を示した。その減少は, ゲル濾過による検討で, ソマトスタチン-14が減少したためと思われた。SRIF が, 実験てんかんモデルにおいてけいれん惹起作用を有するとの報告とも合わせ, DN-1417 の抗けいれん作用発現機序の一部に内因性 SRIF が関与している可能性が示唆された。

てんかん研究 1985 ; 3 : 158-163

Key Words: DN-1417, TRH-T, Somatostatin, rat brain.

緒 言

けいれん発現の生化学的機序については, アミンをはじめとして多くの研究があるが, その中で, 神経ペプチドの関与を検討した報告も増加しつつある。その大部分は, β -endorphin⁸⁾, enkephalin²⁷⁾ などの内因性オピオイド物質に関するものであるが, 最近になってソマトスタチン(somatostatin release-inhibiting factor, SRIF) や甲状腺刺激ホルモン放出ホルモン(thyrotropin releasing hormone, TRH) が, けいれん発現に関与している可能性を示唆する報告がみられる^{9,13,18,23)}。それらの報告によれば, SRIF は, けいれん惹起作用を有し, 一方, TRH は, けいれん抑制作用を有するといわれている。

そこで今回われわれは, TRH のアナログである DN-1417(γ -butyrolactone- γ -carbonyl-histidyl-prolinamide-citrate) と TRH の酒石酸塩 TRH-tartarate (TRH-T) の抗けいれん作用解明の一つとして, DN-1417, TRH-T の急性投与, 慢性投与によるラット脳内 SRIF 様免疫活性(immunoreactive-SRIF, IR-SRIF) の変化を検討した。なお, DN-1417 は, TRH-T よりも数倍の中樞作用を有し, その内分泌作用は, 数10分の1といわれている^{6,16)}。

I. 方 法

Wistar 系雄性ラット(実験開始時体重 220~280 g) 各群 7~8 匹に, DN-1417, TRH-T (武田薬品) をそれぞれ 0.2 mg/kg ないし 2 mg/kg

* 国立武蔵療養所神経センター診断研究部

[〒187 東京都小平市小川東町 4-1-1]

Shigeru Nagaki, Nobumasa Kato

Division of Diagnostics, National Center for Nervous, Mental and Muscular Disorders

1985年7月8日受理

となるように調製し、1回(a.m. 11:00)腹腔内投与した。対照群には、同量の生食を腹腔内投与した。投与後1時間で、ペプチドの酵素による分解²²⁾を防ぐ目的でマイクロウェーブを照射(4.5 kw, 1.5秒)して脳を固定した(急性投与群)。

同様に慢性投与は、1日1回(a.m. 11:00~p.m. 2:00)連続10日間、腹腔内投与し、対照群には、同量の生食を投与した。最終投与後18時間で、マイクロウェーブ処理し、脳を固定した(慢性投与群)。

屠殺後すみやかに脳をとり出し、氷上で Glowinski and Iversen⁷⁾ の原法を基本として¹²⁾、線条体、扁桃核、皮質知覚運動野、海馬、大脳辺縁系皮質(entorhinal cortex と pyriform cortex を合わせた部位に相当する)の5倍位に分別し、0.1N 酢酸中にて超音波破碎後、遠心分離(3000 r.p.m., 20分間, 2回)した上清を測定時まで、-40°C で保存した。IR-SRIF の測定は、既に発表した方法¹²⁾に従い、ラジオイムノアッセイ(RIA)によって行った。標識抗原には、ラクトペルオキシダーゼ法により調製した、¹²⁵I-Tyr¹-SRIF を用い、二抗体法により測定した。用いた抗血清は、モル比で somatostatin-28 (SRIF-28)と60%交叉した。測定感度は、10 pg, 測定内変動係数16%, 測定間変動係数21%であった。ラット脳内 IR-SRIF 濃度は、ng/g 湿重量で求め、各群の平均±標準誤差について t 検定を行い、危険率5%以下を有意とした。

薬物投与による変化がみられた SRIF 様免疫活性の内容を検討するために、ラット脳抽出物のゲル・クロマトグラフィーを行った。DN-1417 慢性投与群および対照群の大脳皮質抽出液 12 ml をプールし、コンセントレーター(Savant)により減圧乾固後、1 ml の 1N 酢酸に再溶解して、Sephadex G-50 カラム(1.5×80 cm)にかけ、1N 酢酸で溶出した。各 2 ml の分画について、IR-SRIF の値を RIA によって求め比較検討した。

TRH-T の甲状腺に対する内分泌作用の程度を検討するために慢性投与群と対照群ラットにおける血中サイロキシン(T₄)濃度をラット尾静脈より8日目の投与1時間後に濾紙上に採取した。自

Fig. 1 DN-1417 (chronic)

IR-SRIF concentrations in rat brain regions after chronic administration of DN-1417 for 10 days.

然乾燥後、濾紙 血中の T₄ 濃度をコーニング IMMO・PHEASE 新生児 T₄・RIA キットを用いて測定した。

II. 結果

慢性投与群において、TRH-T 投与群と対照群との間にラット体重、ラット血液中 T₄ には、有意の差はみられなかった。

急性投与群では、DN-1417, TRH-T の 0.2 mg/kg, 2 mg/kg 投与において対照群と比較していずれの脳部位においても IR-SRIF 含量に有意の差はみられなかった。一方、Fig. 1 に示すように、DN-1417 慢性投与群では、対照群に比べ扁桃核において 0.2 mg/kg, 2 mg/kg 投与で、大脳皮質において 0.2 mg/kg, 2 mg/kg 投与で、海馬において 0.2 mg/kg 投与で、大脳辺縁系皮質において 0.2 mg/kg 投与で IR-SRIF の有意の減少を認めた。これに対して、Fig. 2 に示すように、TRH-T 慢性投与群では、いずれの脳部位においても有意の差はみられなかった。

DN-1417 慢性投与群の大脳皮質抽出物のゲル・クロマトグラフを対照群についての結果とあわせて Fig. 3 に示す。SRIF 様免疫活性を示す 3 つのピークがみられた。大部分の SRIF 様免疫活性は、合成 SRIF (ペプチド研) の溶出部位に一致して分画されたが、その他に小さいピークが void volume に相当する画分と、合成 SRIF-28 (繊維高分子材料研究所 大箸信一博士より提供)

Fig. 2 TRH-T (chronic)

IR-SRIF concentrations in rat brain regions after chronic administration of TRH-T for 10 days.

に一致する画分とに認められた。DN-1417 投与群を対照群と比較した結果、Fig. 1 に示した大脳皮質における有意の IR-SRIF 濃度の減少は主として合成 SRIF と一致する画分における差を反映したものと考えられた。

III. 考 察

TRH は、視床下部に高濃度に分布し、甲状腺刺激ホルモン、プロラクチンの分泌促進作用のみならず、その中枢作用がいわれ、作用発現にカテコールアミン系への関与がいわれている^{14,15}。

SRIF は、成長ホルモン分泌を抑制する物質として単離、精製されたアミノ酸14個よりなるペプチド²⁾である。また、SRIF のN端側にさらに14個のアミノ酸が連結した SRIF-28 がみつかり⁵⁾、SRIF の前駆体²⁸⁾と考えられている。SRIF は、視床下部に高濃度に存在するが、その他の脳部位にも広範囲に分布されている。

免疫組織化学的な検索によれば、SRIF 陽性の神経細胞体は、主に室旁核にあり、軸索を中央隆起に出しているが⁴⁾、他に、扁桃核、海馬、大脳皮質、線条体などにも SRIF 陽性細胞体と軸索がみられたとの報告²⁶⁾がある。

われわれの RIA による脳内分布の検討でも、視床下部、扁桃核、大脳辺縁系皮質においてとくに高濃度の IR-SRIF が検出された。*in vitro* の実験では、ラットの視床下部、扁桃核の切片より、 Ca^{2+} の存在下に SRIF が分泌された¹¹⁾との証明

Fig. 3 Cerebral cortex

Gel-filtration profiles of brain extracts from control and DN-1417-treated rats. Pooled extracts from cortex were applied onto Sephadex G-50 (1.5×80 cm) column eluted with 1 N acetic acid. The column was calibrated with Blue-dextran (Vo), synthetic SRIF-28 (SRIF 28), SRIF 14 and methylene blue (Vt).

などにより、SRIF が神経伝達物質または、伝達調節物質として作用している可能性が示唆されている。SRIF の中枢作用としては、microiontophoretically に SRIF を神経細胞内に投与すると抑制的に働いた²⁴⁾という報告がある一方、興奮がみられた³⁾という相反した報告もあり一致していない。

SRIF と実験てんかんの関係においては、これまでに、1) 聴原性てんかんに感受性の高いラットの脳内 IR-SRIF の上昇がみられた¹²⁾。2) 扁桃核キンドリングラットの大脳辺縁系皮質において脳内 IR-SRIF の上昇がみられた¹³⁾。3) リドカインによる化学的キンドリングラットにおいても脳内 IR-SRIF の上昇がみられた¹⁰⁾。4) 扁桃核キンドリングラットに、内因性 SRIF を減少させる cysteamine あるいは、抗 SRIF 抗体を投与することによりキンドリングけいれんが抑制された⁹⁾。5) SRIF の脳室内投与により、けいれんがみられた¹⁹⁾。以上の報告により、SRIF は、けいれん惹起性を有し、少なくともキンドリング

ラットのけいれん発現に少なからず関わりをもっていることが示唆される。さらに, pentylenetetrazol による化学的キンドリングでも cysteamine がけいれんを抑制する作用を有する¹⁾ ことが、最近報告された。

そこで、本研究では、抗けいれん作用を有するとされる DN-1417, TRH-T の抗けいれん作用解明の一助として、投与下におけるラット脳内 IR-SRIF の変化を検討した。その結果、DN-1417 慢性投与群で、ラット脳内 IR-SRIF の減少を大脳辺縁系を中心とする部位に認めた。投与量は、0.2 mg/kg 投与の方が、2 mg/kg 投与よりも、より有意の IR-SRIF の減少を認め用量依存性を欠いていた。

扁桃核キンドリングネコに用いた実験では、DN-1417, TRH-T ともに用量依存性を欠いた抗けいれん効果^{17,18)} の報告がある。一方、DN-1417 の脳室内投与では、用量依存性に抗けいれん効果を認めた²⁵⁾ との報告もある。さらに TRH-T は、むしろけいれんを誘発させる²¹⁾ との報告もある。このことは、DN-1417 で IR-SRIF の減少を認め、TRH-T で IR-SRIF の減少がみられなかったということと考え合わせれば興味深いかもしれない。しかし、DN-1417 が TRH-T より強い中枢作用を有することによる可能性は否定できない。

今回のわれわれの結果は、SRIF が少なくとも、実験てんかんモデルにおいて、けいれん惹起作用を示すと考えられるのに対して、DN-1417 は、それと対照的に抗けいれん作用を有すると報告されていることと対応する結果と考えられる。われわれは、広く抗けいれん剤として用いられている CBZ と VPA について同じくその慢性投与がラット脳内 IR-SRIF を減少させる²⁰⁾ との予備的結果を得ており、その結果と合わせ DN-1417 が抗けいれん作用を発揮する機序の一部に脳内の内因性 SRIF が関与していることが本研究によって示唆された。

稿を終えるにあたり、御指導、御助言をいただいた神経センター診断研究部広瀬 浩部長、埼玉医科大学精神科樋口輝彦講師に深謝いたします。また、実験に際して御協力いただいた渡辺倫子、熊田淳子両研究員

に深謝いたします。また、SRIF-28 を提供して戴いた繊維高分子材料研究所大箸 信一博士、DN-1417, TRH-T を提供して戴いた武田薬品工業に深謝いたします。

本研究の一部は厚生省神経疾患研究委託費(84-05-19)によって行われた。本論文の要旨は第18回日本てんかん学会(宇都宮 1984年)において発表した。

文 献

- 1) Assouline G, Barkaie E, Gutnick MJ. Cysteamine suppresses kindled seizures in pentylene-tetrazol-kindled rats. *Euro J Pharmacol* **1985**; 106: 649-652.
- 2) Brazeau P, Vale W, Burgus R, et al. Hypothalamic polypeptide that inhibits the secretion of immunoreactive pituitary growth hormone. *Science* **1973**; 178: 77-79.
- 3) Dodd J, Kell JS. Is somatostatin an excitatory transmitter in the hippocampus? *Nature* **1978**; 273: 674-675.
- 4) Elde RP, Parsons JA. Immunocytochemical localization of somatostatin in cell bodies of the rat hypothalamus. *Am J Anat* **1975**; 144: 541-548.
- 5) Esch F, Böhlen P, Ling N, et al. Primary structure of ovine hypothalamic somatostatin-28 and somatostatin-25. *Proc Natl Acad Sci USA* **1980**; 77: 6827-6831.
- 6) Fukuda N, Nishimura O, Shikata M, et al. Synthesis and pharmacology of TRH analogues to separate central nervous system action from endocrine activity. *Chem Pharm Bull* **1980**; 28: 1667-1672.
- 7) Glowinski J, Iversen LL. Regional studies of catecholamines in the rat brain. *J Neurochem* **1966**; 13: 655-669.
- 8) Henriksen SJ, Bloom FE, McCoy F, Ling N, Guillemin R. β -Endorphin induces nonconvulsive limbic seizures. *Proc Natl Acad Sci USA* **1978**; 75: 5221-5225.
- 9) Higuchi T, Sikand GS, Kato N, Wada JA, Friesen HG. Profound suppression of kindled seizures by cysteamine: possible role of somatostatin to kindled seizures. *Brain Res* **1983**; 288: 359-362.
- 10) Higuchi T, Shah KR, Sikand GS, West M, Friesen HG. Changes in brain immunoreactive somatostatin following lidocaine-induced kindling in rat. *Neuropharmacology* (in press)

- 11) Iversen LL, Iversen SD, Bloom F, et al. Calcium-dependent release of somatostatin and neurotensin from rat brain in vitro. *Nature* **1978**; 273: 161-163.
- 12) Kato N, Sundmark VC, Middlesworth L, Havlicek V, Friesen HG. Immunoreactive somatostatin and β -endorphin content in the brain of mature rats after neonatal exposure to propylthiouracil. *Endocrinology* **1982**; 110: 1851-1855.
- 13) Kato N, Higuchi T, Friesen HG, Wada JA. Changes of immunoreactive somatostatin and β -endorphin content in rat brain after amygdaloid kindling. *Life Sci* **1983**; 32: 2415-2422.
- 14) Keller HH, Bartholini G, Pletscher A. Enhancement of cerebral noradrenaline turnover by thyrotropin-releasing hormone. *Nature* **1974**; 248: 528-529.
- 15) Miyamoto M, Nagawa Y. Mesolimbic involvement in the locomotor stimulant action of thyrotropin-releasing hormone (TRH) in rats. *Eur J Pharmacol* **1977**; 44: 143-152.
- 16) Miyamoto M, Fukuda N, Narumi S, Nagai Y, Saji Y, Nagawa Y. γ -butyrolactone- γ -carbonyl-histidyl-prolinamide citrate(DN-1417): A novel TRH analog with potent effects on the central nervous system. *Life Sci* **1980**; 28: 861-869.
- 17) 森本 清, 森分 隆, 秋山孝子, 佐藤光源, 大月三郎. TRH analog (DN-1417) の抗けいれん効果: 第I報, キンドリングモデルを用いた研究. *脳神経* **1983**; 35(2): 189-195.
- 18) 森本 清, 森分 隆, 佐藤光源, 大月三郎. TRH analog (DN-1417) の抗けいれん効果: 第II報, TRH-T との比較—キンドリングモデルを用いた研究. *脳神経* **1983**; 35(5): 501-504.
- 19) 永木 茂, 加藤進昌, 五十嵐良雄, 渡辺倫子, 村上 昇. ソマトスタチンの脳室内投与によるけいれんおよび発作性脳波異常の発現について, 第17回日本てんかん学会抄録集.
- 20) 永木 茂, 渡辺倫子, 加藤進昌, 樋口輝彦. Sodium dipropylacetate (DPA) および carbamazepine (CBZ) 投与のラット脳内ソマトスタチンにおよぼす影響. 第18回日本てんかん学会抄録集.
- 21) 中村 純, 内村直尚, 山田茂人, ら. TRH analog (DN-1417) および TRH-T の抗けいれん効果—電撃けいれん閾値に対する作用—. *てんかん研究* **1984**; 2(1): 76-83.
- 22) Ogawa N, Panerai AE, Lee S, Forsbach G, Havlicek V, Friesen HG. β -Endorphin concentration in the brain of intact and hypophysectomized rats. *Life Sci* **1979**; 25: 317-326.
- 23) Renaud LP, Martin JB. Thyrotropin releasing hormone (TRH): Depressant action on central neuronal activity. *Brain Res* **1975**; 86: 150-154.
- 24) Renaud LP, Martin JB, Brazeau P. Depressant action of TRH, LH-RH and somatostatin on activity of central neurons. *Nature* **1975**; 255: 233-235.
- 25) 佐藤光源, 森分 隆, 森本 清, ら. TRH 誘導体: DN-1417 脳室内投与による キンドリング予防効果とけいれん効果. 第18回日本てんかん学会抄録集.
- 26) Shiosaka S, Takatsuki K, Sakanaka M, et al. Ontogeny of somatostatin-containing neuron system of the rat: Immunohistochemical analysis. II. Forebrain and diencephalon. *J Comp Neurol* **1982**; 204: 211-224.
- 27) Snead OC, Bearden LJ. Anticonvulsants specific for petit mal antagonize epileptogenic effect of leucine enkephalin. *Science* **1980**; 210: 1031-1033.
- 28) Zingg HH, Patel YC. Processing of somatostatin-28 and a related endogenous rat hypothalamic somatostatin-like molecule by hypothalamic enzymes. *Life Sci* **1981**; 30: 525-533.

Summary

Effects of TRH-analog (DN-1417) and TRH-T on Immunoreactive Somatostatin Contents in the Rat Brain

Shigeru Nagaki, Nobumasa Kato

Somatostatin (SRIF) has been proposed to be involved in the epileptogenic properties in rats, and DN-1417 (γ -butyrolactone- γ -carbonyl-histidyl-prolinamide citrate)

and TRH-T (tartarate) have been reported to have an anticonvulsant action. We have investigated the effects of the drugs administered intraperitoneally (0.2 and 2.0 mg/kg) on immunoreactive SRIF (IR-SRIF) contents in the rat brain. IR-SRIF concentrations were found to be significantly decreased after chronic treatment with DN-1417 (10 days) in the striatum, amygdala, sensorimotor cortex, hippocampus and entorhinal and pyriform cortices. Acute treatment with DN-1417 failed to show any change in brain IR-SRIF. No change were seen after acute or chronic treatment with TRH-T. Changes in brain IR-SRIF after chronic DN-1417-treatment were more prominent at a dose of 0.2 mg/kg as compared to 2.0 mg/kg.

These results, together with the previous findings that somatostatin have an epileptogenic effect on animal models, suggest a possible role of somatostatin in the mechanisms underlying anticonvulsant action of DN-1417.

J. Jpn. Epil. Soc. 1985 ; 3 : 158-163