

Effects of Thyrotropin-Releasing Hormone and Histidyl-Proline Diketopiperazine on the Maturation of Homeothermia in Neonatal Rats

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	http://hdl.handle.net/2297/8127

Thyrotropin-releasing hormone および Histidyl-proline diketopiperazine の 体温調節機構の成熟に及ぼす影響

金沢大学医学部小児科学講座 (主任: 谷口 昂教授)

宮 森 千 明

(平成1年5月26日受付)

甲状腺刺激ホルモン放出ホルモン (thyrotropin-releasing hormone, TRH) とその活性中間代謝産物である histidyl-proline diketopiperazine [cyclo (His-Pro)] の, 幼若ラット体温調節機構の成熟に及ぼす影響を検討した. 生後8日齢のラットに 1×10^{-10} moles の TRH を連日7日間髄注すると, 初期には体温上昇, 後には降下の二相性効果が認められた. この作用はカテコールアミン合成阻害剤である 6-hydroxydopamine の投与で抑制され, カテコールアミンを介して発現すると考えられた. $1 \times 10^{-11} \sim 10^{-9}$ moles の TRH または cyclo (His-Pro) の7日間連続投与は, 脳内ノルエピネフリン, ドーパミン含量を有意に減少させた. この減少は部位により異なり, TRH の作用は間脳, 中脳, 小脳で強く, cyclo (His-Pro) の作用は小脳, 橋, 延髄で顕著であった. さらに TRH は脳, 心臓, および褐色脂肪織におけるカテコールアミンの代謝回転率を2倍に促進した. 生後1, 2, 3週目のラットに時期を違えてそれぞれ 3, 6, 9×10^{-9} moles の TRH または cyclo (His-Pro) を7日間連続投与し, 体温調節成熟過程に対する影響を検討したところ, 生後1~2週目の投与群で体温低下が認められた. 生後6週目の時点で肝ミトコンドリア分画の cytochrome c reductase (CR), α -glycerophosphate dehydrogenase (α GPDH), malic enzyme (ME), glucose-6-phosphate dehydrogenase, hexokinase, glucose-6-phosphatase 活性を測定したところ, TRH 投与群では CR の低下と α GPDH の上昇が, cyclo (His-Pro) 投与群で ME の低下と α GPDH の上昇が認められた. これらの変化は生後1, 2週処置群で著明なことから, 両者の影響は体温調節機構の成熟と密接に関連し, 生後2週がその臨界期と考えられた. 以上の成績は, TRH, cyclo (His-Pro) が体温調節機構の成熟過程にカテコールアミン分泌の調節を介して関与していることを示唆する.

Key words thyrotropin-releasing hormone, histidyl-proline diketopiperazine, 体温調節機構, カテコールアミン, ミトコンドリア

甲状腺刺激ホルモン放出ホルモン (thyrotropin-releasing hormone, TRH) は, 視床下部から初めて抽出されたトリペプチド (L-pyroglutamyl-L-histidyl-L-proline amide) で¹⁾, 甲状腺刺激ホルモンやプロラクチンの分泌刺激作用があることはすでに広く知られ

ている²⁾. またバゾプレッシンやオキシトシンの分泌にも関与しているともいわれている³⁾.

一方, ラジオイムノアッセイや免疫組織化学的方法により, TRH は視床下部以外の他の中枢神経⁴⁻⁶⁾, 消化管, 膵⁷⁾などに広く分布することが判明し, 下垂体

Abbreviations: ADP, adenosine diphosphate; cyclo (His-Pro), histidyl-proline diketopiperazine; CR, cytochrome c reductase; DHBA, dihydroxybenzylamine; EDTA, ethylenediaminetetraacetic acid; GDP, guanosine diphosphate; G6Pase, glucose-6-phosphatase; G6PD, glucose-6-phosphate dehydrogenase; α GPDH, α -glycerophosphate

ホルモン分泌刺激作用以外の中樞作用も有することが明らかとなった。このため TRH は近年、神経伝達物質または神経調節物質として注目されている²⁰⁾。

さらに TRH の代謝過程が解明されるに従い、その代謝産物である histidyl-proline diketopiperazine [cyclo (His-Pro)] の多彩な作用²⁰⁾や脳内分布²¹⁾が明らかにされつつある。

なかでも、TRH と cyclo (His-Pro) は、体温調節に関しては拮抗的に働くとの報告があり¹¹⁾、しかもその効果は甲状腺ホルモンを介さないといわれている¹²⁾。

一方 TRH はカテコールアミン代謝を促進することも数多く報告されており¹³⁾⁻¹⁶⁾、TRH の有する生物活性がそれ自体で発現する可能性の他に、カテコールアミンなどの他の神経伝達物質を介して発現する可能性も考えられている¹⁹⁾。

今回、合成 TRH または cyclo (His-Pro) を種々の条件でラットに投与し、体温に与える効果および、非ふるえ熱産生に重要とされる褐色脂肪織や^{20,21)}、細胞レベルの熱産生の主要な場であるミトコンドリア分画²²⁾の諸酵素に与える影響を検討した。また、TRH を髄腔内投与し、中枢神経系のカテコールアミン代謝に及ぼす影響についても併せて検討した。

材料および方法

I. 試薬および実験動物

使用した試薬のうち TRH は市販の田辺製薬 (大阪) のものを用い、cyclo (His-Pro) は、北陸大学薬学部生物薬品化学教室の橋本忠教授より提供していたものを用いた。ミトコンドリアの [³H] guanosine diphosphate (GDP) 結合能の測定に必要な [³H] GDP (10.0 Ci/mmol) は New England Nuclear (Boston, USA) より購入した。カテコールアミンの定量時に標準物質として使用した dihydroxybenzylamine, norepinephrine bitartrate, epinephrine bitartrate, dopamine hydrochloride は Sigma Chem. Co. (St. Louis, USA) のものを用い、他の試薬は和光純薬 (大阪) のものを用いた。

実験動物は、ウイスター系ラットを用いた。妊娠ラットの飼育よりはじめ、出生直後より実験を開始、または生後 8 日齢より実験を開始した。また、実験によっては生後 3 週齢のウイスター系ラットを用いた。

II. 薬剤の投与方法および実験計画

1. TRH および cyclo (His-Pro) の体温への影響

生後 8 日齢のウイスター系ラットに 1×10^{-10} moles の TRH と、カテコールアミン合成阻害剤として²³⁾ 100 μ g の 6-hydroxydopamine (6OHD) を生理食塩水 10 μ l に溶解して、別々にまたは同時に 7 日間連続髄腔内 (cisterna magna) 投与した。対照には生理食塩水 10 μ l を投与した。投与終了 1 週間後の生後 3 週齢に室温 (22°C) および 5°C 3 時間寒冷暴露後の直腸温を電子体温計を用いて測定した。また中枢投与と末梢投与を比較するため、生後 8 日齢のウイスター系ラットに 1×10^{-9} moles の TRH と 100 μ g の 6OHD を 7 日間連続髄腔内投与し、別の群には 1×10^{-7} moles の TRH と 2 mg の 6OHD を 7 日間連続腹腔内投与し、投与終了 2 週後の生後 4 週齢に室温 (22°C) および 5°C 3 時間寒冷暴露後の体温を比較した。

さらに、生後 8 日齢のウイスター系ラットに、 1×10^{-10} moles の TRH および cyclo (His-Pro) あるいは 100 μ g の 6OHD を 7 日間連続髄腔内投与し、投与終了 1 週後の生後 3 週齢および投与終了 3 週後の生後 5 週齢に断頭屠殺し、直ちに肩甲間褐色脂肪織および肝臓を取り出した。取り出した褐色脂肪織および肝臓は直ちに重量を測定後、5 mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) を含む 0.25M ショ糖液中でホモジナイズしたあと、それぞれミトコンドリア分画を調整し、-20°C に凍結保存した。この一部を用いて数日中に、 α -glycerophosphate dehydrogenase (α -GPDH) 活性、cytochrome c reductase (CR) 活性、[³H] GDP 結合能を測定した。

2. TRH および cyclo (His-Pro) の脳内カテコールアミンへの影響

生後 8 日齢のウイスター系ラットに 1×10^{-11} , 10^{-10} , 10^{-9} (および 10^{-8}) moles の TRH または cyclo (His-Pro) を 10 μ l の生理食塩水に溶解して、7 日間連続髄腔内 (cisterna magna) 投与した。対照には、生理食塩水 10 μ l を投与した。投与終了直後の生後 2 週齢より 1 週毎に、室温および 1 時間から 3 時間の 5°C 寒冷暴露後の直腸温を電子体温計を用いて測定した。また、生後 4 週齢には、エーテル麻酔下で断頭屠殺後直ちに、脳を大脳半球、間脳および中脳、小

dehydrogenase; HK, hexokinase; HPLC, high performance liquid chromatography; ME, malic enzyme; α MPT, α -methyl-p-tyrosine; 6OHD, 6-hydroxydopamine; PCA, perchloric acid; RIA, radioimmunoassay; T₃, triiodothyronine; T₄, thyroxine; TRH, thyrotropin-releasing hormone

脳、橋および延髄の4つに分割摘出し、同時に摘出した副腎とともに重量を測定後、1.0mlの0.1M perchloric acid (PCA) 中でガラスホモジナイザーによりホモジナイズした後、上清を -20°C で凍結保存しておき、後にカテコールアミン量の定量をおこなった。

さらに生後3週齢のウイスター系ラットに、シナス末端におけるカテコールアミンの再蓄積を阻害する目的で²⁰、3mgの α -methyl-p-tyrosine (α MPT)を腹腔内投与し、同時に30ngのTRHを $10\mu\text{l}$ の生理食塩水に溶解して髄腔内(cisterna magna)に投与した。対照には α MPTの腹腔内投与とともに、生理食塩水 $10\mu\text{l}$ を髄腔内投与した。投与前および投与2時間後、4時間後にエーテル麻酔下で断頭屠殺し、直ちに脳を菱脳峽を境に、大脳半球・間脳・中脳と小脳・橋・延髄の2つに分割摘出した。同時に副腎、心臓、肩甲間褐色脂肪織も摘出し、各組織は直ちに重量測定後、カテコールアミンの測定に供した。また、TRH投与前から投与後2時間後のカテコールアミンの減少量を単位時間当たりで算出し、代謝回転率とした。

3. TRH および cyclo (His-Pro) の体温調節成熟過程への影響

ウイスター系ラットを3群に分けI群にはTRH、II群にはcyclo (His-Pro)、III群にはTRHおよびcyclo (His-Pro)をそれぞれ半量ずつあわせて髄腔内(cisterna magna)に投与した。年齢による変化をみるため、さらに生後第1週、第2週および第3週の群に分け、各週にそれぞれ前述のペプチドを3、6、 9×10^{-9} moles 7日間連続髄腔内投与した。対照には $10\mu\text{l}$ の生理食塩水を生後第1週に7日間連続投与した。

投与開始直後の生後2日より1週毎に体重を測定し、生後4週齢に3日間連続して摂食飲水量を測定した。生後5週齢に、室温(25°C)および 5°C 3時間の寒冷暴露後の直腸温を電子体温計を用いて測定した。生後6週齢にエーテル麻酔下で、心腔穿刺による採血後、直ちに肝臓摘出を行った。

摘出した肝臓は5mM EDTAを含む0.25Mシヨ糖液中でホモジナイズした後、ミトコンドリア分画を調整し -20°C に凍結保存しておき、数日中に各種酵素活性を測定した。また同時に血清サイロキシン(thyroxine, T_4)、トリヨードサイロニン(triiodothyronine, T_3)も測定した。

III. ミトコンドリア分画の調整法および [^3H] GDP 結合能, 各種酵素活性の測定法

1. ミトコンドリア分画の調整法

摘出した肝臓または褐色脂肪織は、5mM EDTAを含む0.25Mシヨ糖液中でホモジナイズした後、肝臓はHogeboomらの方法²⁵に従い、また褐色脂肪織はLeeらの方法²⁶に従いミトコンドリア分画を調整し、 -20°C で保存し数日中に各種測定に用いた。

2. [^3H] GDP 結合能の測定法

褐色脂肪織のミトコンドリア内のthermogeninはプリンスクレオチドと結合する特性をもっているため²⁷、Nichollsの方法²⁸に従い [^3H] GDP 結合能を測定した。数匹のラットから集められた褐色脂肪織のミトコンドリア分画を蛋白濃度約0.5mg/mlに調整し、100mMシヨ糖、20mM N-tris (hydroxymethyl)-2-aminoethane sulphonate, 10mM choline chloride, 1mM EDTA, $5\mu\text{M}$ rotenoneを含んだ溶液(pH 7.1)中に、 $100\mu\text{M}$ adenosine diphosphate (ADP)とともに加えた。 [^3H] GDP ($0.25\mu\text{Ci}$, 最終濃度25nM)を加えて反応を開始し、室温で10分間放置した。ミトコンドリアをガラスフィルター(Whatman GF/C)に吸引吸着後、液体シンチレーションカウンターにて放射活性を測定し、 [^3H] GDP 結合能とした。

3. 各種酵素活性の測定法

CR (EC 1, 6, 2, 3)はHoreckerの方法²⁹に従い、 α GPDH (EC 1, 1, 99, 5)はLeeらの方法³⁰、malic enzyme (ME) (EC 1, 1, 1, 40)はOchoaの方法³¹、glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) (EC 1, 1, 1, 49)とhexokinase (HK) (EC 2, 7, 1, 1)はBergmeyerらの方法³²、glucose-6-phosphatase (G6Pase) (EC 3, 1, 3, 9)はBaginskiらの方法³³に従い測定した。蛋白濃度の測定はLowryらの方法³⁴によった。

IV. 血清 T_4 , T_3 の測定法

血清 T_4 , T_3 はラジオイムノアッセイ (radioimmunoassay, RIA) 2抗体法を用いた、栄研 T_4 RIA キットおよび T_3 RIA キット (栄研, 東京)を用いて測定した。

V. カテコールアミンの定量法

組織を0.1M PCA 中でホモジナイズし、遠心後上清の0.5mlに0.5Mトリス塩酸緩衝液(pH 8.6) 2.0mlと活性アルミナ30mg, dihydroxybenzylamine (DHBA) 10ngを加えて30分間振盪した。静置して上清を吸引除去後、アルミナを蒸留水2.0mlで3回洗浄し、最後に0.1M PCAを $100\mu\text{l}$ 加えてカテコールアミンを抽出し、このうち $10\sim 20\mu\text{l}$ をカテコールアミンの測定に用いた。DHBAによるカテコールアミンの回収率は $66 \pm 7\%$ であった。

カテコールアミンの測定には、電気化学検出器 (Coulchem, 5100A) (ESA Inc., Massachusetts, USA) を用いた高速液体クロマトグラフィー (high performance liquid chromatography, HPLC) (島津 LC-5A) (島津, 京都) を使用した。移動相には 50mM sodium monophosphate, 50mM trichloroacetic acid, 0.02% sodium dodecyl sulfate を含み、水酸化ナトリウムを用い pH を 3.4 に調整した後、0.22 μ m のミリポアフィルターを通し、acetonitrile を 15% (v/v) の濃度で加えた。カテコールアミンの分離には

逆相カラムの Spheri-5 RP-18 (10cm \times 4.6 mm) (Brownlee Labs., Santa Clara, USA) を圧 150kg/cm², 流速 1500 μ l/min で用いた。標準物質の norepinephrine bitartrate, epinephrine bitartrate, dopamine hydrochloride, dihydroxybenzylamine bromide は 0.1M PCA に溶解して、組織のカテコールアミン濃度に合わせて加える量を調節した。測定内変動係数は 5% 以内であった。

VI. 統計学的処理

測定値は平均値 \pm 標準偏差で表した。平均値の差の

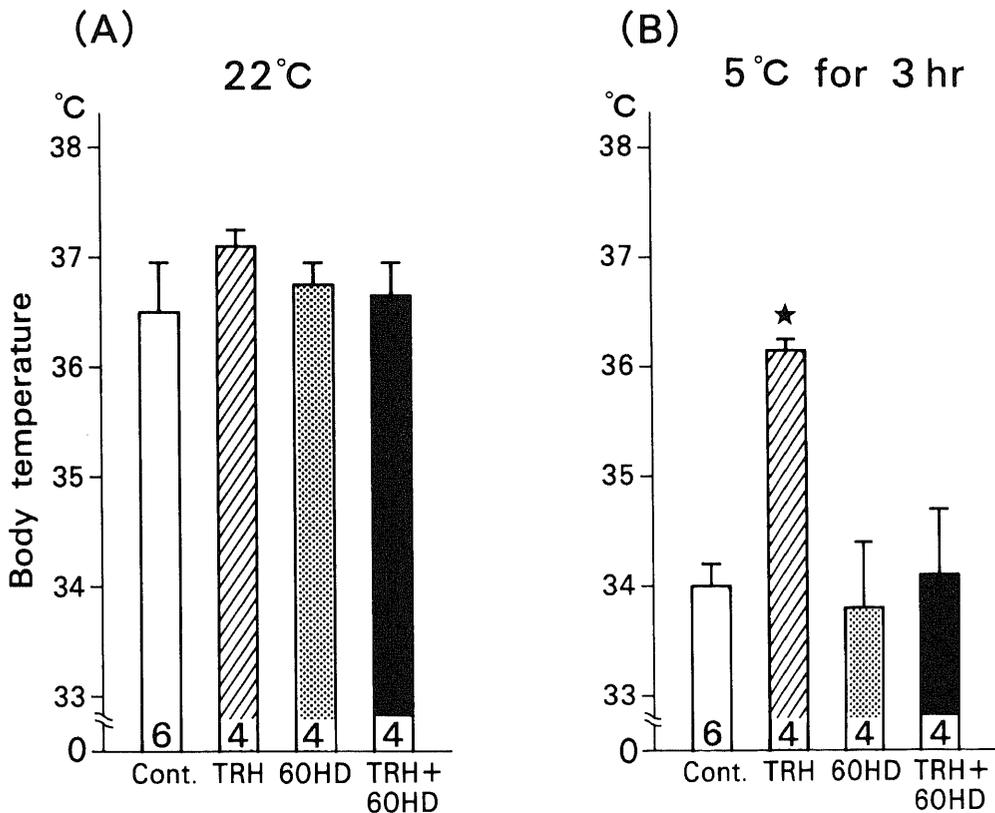


Fig. 1. Effect of intrathecal administration of TRH and/or 6-hydroxydopamine on body temperature in young rats.

Neonatal rats were treated intrathecally (cisterna magna) with TRH (1×10^{-10} moles) and/or 6-hydroxydopamine (6OHD, 100 μ g) for 7 consecutive days during the 2nd week of life. Control group (Cont.) was treated with 10 μ l saline. Body temperature was measured with an electric thermometer at room temperature (22°C) (A) and after exposure to cold (5°C for 3 hours) (B) at 3 weeks of age.

Number in the bottom of the column, number of rats used. Vertical bar, mean \pm SD.

* $p < 0.05$ vs control group by one-way ANOVA followed by Duncan's multiple comparisons.

検定は、t検定または一元配置分散分析を行ったのち Duncan の方法³⁰により多重比較を行い、危険率が 0.05以下をもって有意差ありと判断した。

成 績

I. TRH の体温に及ぼす影響

TRH を生後 2 週目に 1×10^{-10} moles 7 日間連日髄腔内投与することにより、生後 3 週齢では寒冷暴露後で体温上昇効果が現れ (図 1)、生後 4 週齢では体温低下傾向がみられた (図 2)。しかし、カテコールアミン

合成阻害剤である 6OHD を髄腔内投与すると、TRH の体温上昇あるいは低下効果は消失した。また、TRH の腹腔内投与では体温上昇作用は現れず (図 2)、TRH の体温調節作用は中枢神経系のカテコールアミンを介していると考えられる。

II. TRH および cyclo (His-Pro) の褐色脂肪織および肝ミトコンドリアに及ぼす影響

TRH, cyclo (His-Pro), 6OHD を生後 2 週目に 7 日間連日髄腔内投与した結果、生後 3 週齢での肩甲間褐色脂肪織の重量は、6OHD 投与群で有意に低下して

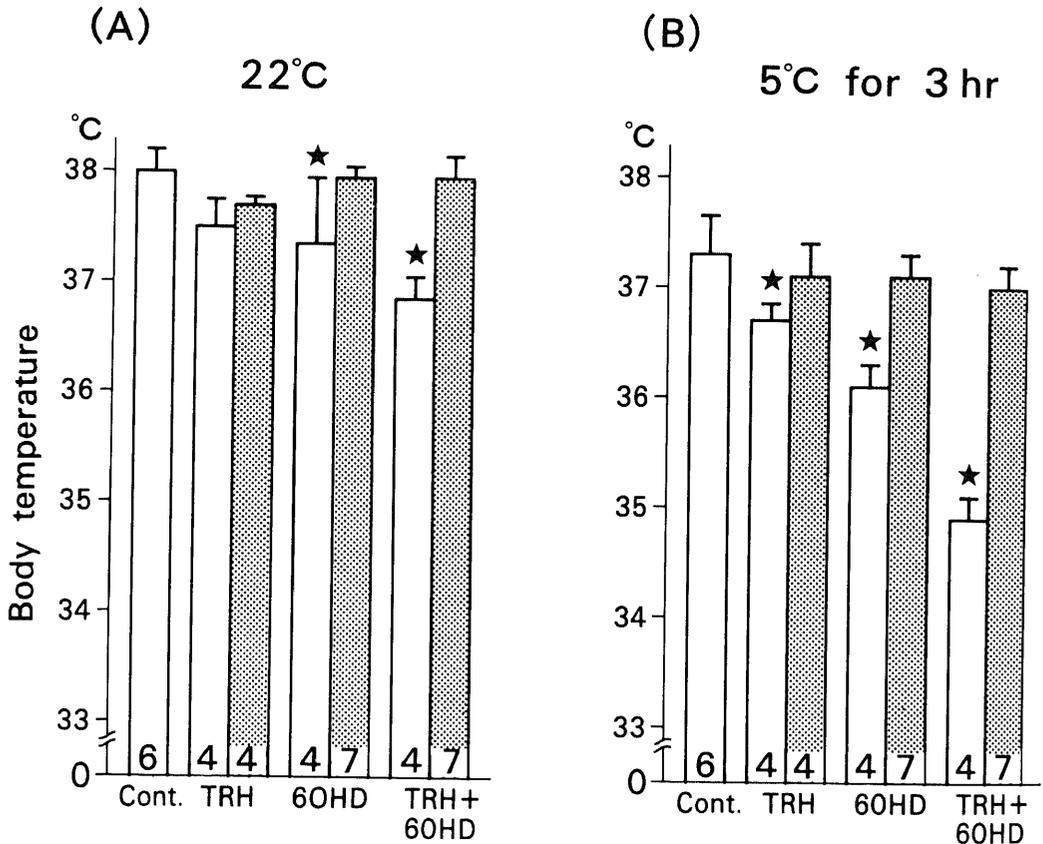


Fig. 2. Comparative effect of intrathecal or intraperitoneal administration of TRH and/or 6-hydroxydopamine on body temperature in young rats.

Neonatal rats were treated intrathecally (cisterna magna) (\square) with 1×10^{-9} moles of TRH and/or $100 \mu\text{g}$ of 6-hydroxydopamine (6OHD), or intraperitoneally (\square) with 1×10^{-7} moles of TRH and/or 2mg of 6OHD for 7 consecutive days during the 2nd week of life. Control group (Cont.) was treated with $10 \mu\text{l}$ saline. Body temperature was measured with an electric thermometer at room temperature (22°C) (A) and after exposure to cold (5°C for 3 hours) (B) at 4 weeks of age.

Number in the bottom of the column, number of rats used. Vertical bar, mean \pm SD.

★ $p < 0.05$ vs control group by one-way ANOVA followed by Duncan's multiple comparisons.

おり, cyclo(His-Pro) 投与群でも低下の傾向がみられた(表1)。しかし, 生後5週齢では対照群と同程度の重量に回復している。褐色脂肪織のミトコンドリアの α GPDH活性は, TRHあるいはcyclo(His-Pro)の髄腔内投与で生後3週齢には低下していたが, 生後5週齢になると逆に対照より上昇傾向にあった(表1)。

また褐色脂肪織のミトコンドリア分画の $[^3\text{H}]$ GDP結合能は, 生後3週齢のTRH投与群で対照群の約40%に低下していたが, 生後5週齢では対照とほぼ同程度の結合能を示した(表1)。

肝臓のミトコンドリア分画におけるCR活性は, 生後3週齢ではいずれの群も対照より低下していたが,

Table 1. Effect of intrathecal administration of TRH, cyclo(His-Pro) and 6-hydroxydopamine on interscapular brown adipose tissue in young rats

Age (weeks)	Experimental group	No.	BAT weight (g)	α GPDH (Δ A/min/mg-protein)	$[^3\text{H}]$ GDP binding (pmol/mg-protein)
3	Control	6	0.16 \pm 0.01	354 \pm 53	51.1
	TRH	6	0.18 \pm 0.03	259 \pm 32 *	21.1
	cyclo(His-Pro)	6	0.14 \pm 0.008	270 \pm 43 *	60.1
	6OHD	6	0.13 \pm 0.01 *	287 \pm 62	61.5
5	Control	5	0.20 \pm 0.03	128 \pm 4	22.2
	TRH	5	0.19 \pm 0.03	142 \pm 12	22.7
	cyclo(His-Pro)	5	0.20 \pm 0.02	140 \pm 8	23.3
	6OHD	5	0.22 \pm 0.01	166 \pm 13 *	27.9

Neonatal rats were treated intrathecally(cisterna magna) with TRH(1×10^{-10} moles), cyclo(His-Pro)(1×10^{-10} moles) or 6-hydroxydopamine(6OHD, 100 μ g) for 7 consecutive days during the 2nd week of life. Control group was treated with 10 μ l saline. Interscapular brown adipose tissue(BAT) weight, and α -glycerophosphate dehydrogenase (α GPDH) activity and $[^3\text{H}]$ GDP binding in BAT mitochondria were measured at 3 and 5 weeks of age. Values are expressed as mean \pm SD except for $[^3\text{H}]$ GDP binding. Mitochondrial $[^3\text{H}]$ GDP binding is the mean of triplicated measurements, because BAT mitochondria was pooled from 5 to 6 rats.

GDP, guanosine diphosphate.

*P<0.05 vs control group by one-way ANOVA followed by Duncan's multiple comparisons.

Table 2. Effect of intrathecal administration of TRH, cyclo(His-Pro) and 6-hydroxydopamine on mitochondrial enzyme activities in rat liver

Age (weeks)	Experimental group	No.	CR	α GPDH
3	Control	6	169 \pm 14	16.9 \pm 1.7
	TRH	6	95 \pm 29 *	15.0 \pm 1.2
	cyclo(His-Pro)	6	99 \pm 27 *	14.5 \pm 2.1
	6OHD	6	61 \pm 12 *	15.4 \pm 1.5
5	Control	5	56 \pm 9	27.3 \pm 0.7
	TRH	5	53 \pm 6	31.3 \pm 1.4
	cyclo(His-Pro)	5	54 \pm 5	33.7 \pm 2.5 *
	6OHD	5	50 \pm 9	32.8 \pm 4.2 *

The treatments were the same as those given in Table 1. Cytochrome c reductase(CR) and α -glycerophosphate dehydrogenase (α GPDH) in liver mitochondria were measured at 3 and 5 weeks of age.

Values are expressed as mean \pm SD in Δ A/min/mg-protein. 6OHD, 6-hydroxydopamine.

*P<0.05 vs control group by one-way ANOVA followed by Duncan's multiple comparisons.

生後5週齢では対照とほぼ同程度であった(表2)。一方、 α GPDH 活性は逆に、生後3週齢では各群とも対照群と差はなかったが、生後5週齢では各群とも対照より上昇する傾向にあった(表2)。

これらの結果は、TRH および cyclo (His-Pro) は長期的にはエネルギー産生系抑制効果を示すこと、かつその効果はラットの成長過程で可逆性であることを示している。

III. TRH および cyclo (His-Pro) の体温および脳内カテコールアミン含量に対する用量反応関係

生後2週目に7日間連日 1×10^{-11} , 10^{-10} , 10^{-9} ,

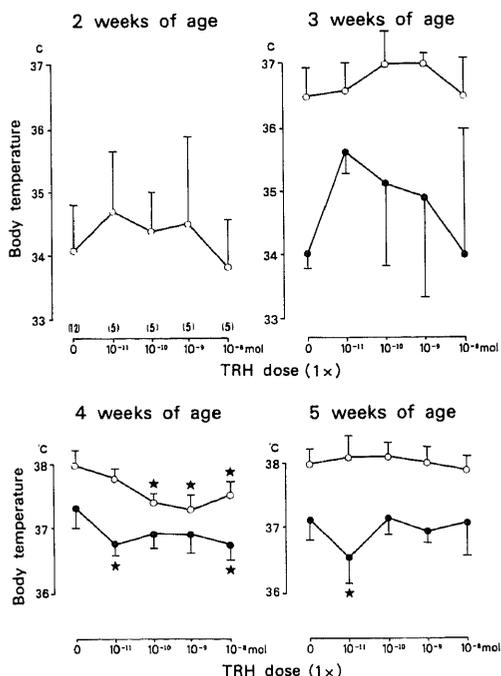


Fig. 3. Effect of intrathecal administration of TRH on body temperature in young rats.

Neonatal rats were treated intrathecally (cisterna magna) with TRH (1×10^{-11} , 10^{-10} , 10^{-9} , 10^{-8} moles) for 7 consecutive days during the 2nd week of life. Control group was treated with $10 \mu\text{l}$ saline (TRH dose, zero). Rats were housed at room temperature (22°C), and body temperature was measured with an electric thermometer at room temperature (22°C , \circ) and after exposure to cold (5°C for 1 to 3 hours, \bullet) at weekly intervals.

Number in parenthesis, number of rats used. Vertical bar, mean \pm SD.

★ $p < 0.05$ vs control group by one-way ANOVA followed by Duncan's multiple comparisons.

10^{-8} moles of TRH を髄腔内投与すると、生後3週齢の 1×10^{-11} moles 投与群で寒冷暴露後の体温上昇傾向がみられたが、より多量の 1×10^{-9} moles 投与群では体温上昇作用は抑制された(図3)。生後4週齢では、TRH 投与のほとんどの群に体温低下傾向がみられ、生後5週齢では逆に 1×10^{-11} moles 投与群以外では対照と差がなく、TRH の体温調節に及ぼす影響が減弱していると考えられた。

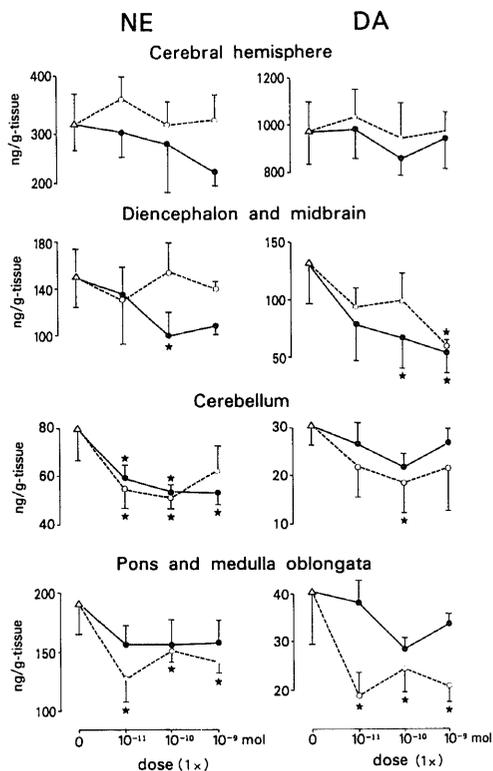


Fig. 4. Effect of intrathecal administration of TRH or cyclo(His-Pro) on catecholamine concentration in rat brain.

Neonatal rats were treated intrathecally (cisterna magna) with TRH (\bullet , $n=4$) or cyclo(His-Pro) (\circ , $n=4$) (1×10^{-11} , 10^{-10} , 10^{-9} moles) for 7 consecutive days during the 2nd week of life. Control group (Δ , $n=12$) was treated with $10 \mu\text{l}$ saline (TRH dose, zero). At 4 weeks of age, rats were sacrificed and brain catecholamine concentration were measured by HPLC. Left panels show norepinephrine (NE) concentration, and right panels dopamine (DA) concentration.

Vertical bar, mean \pm SD.

★ $p < 0.05$ vs control group by one-way ANOVA followed by Duncan's multiple comparisons.

これらの結果から、TRH の体温調節に及ぼす効果は投与量に影響され、成長に伴い二相性であることがわかった。

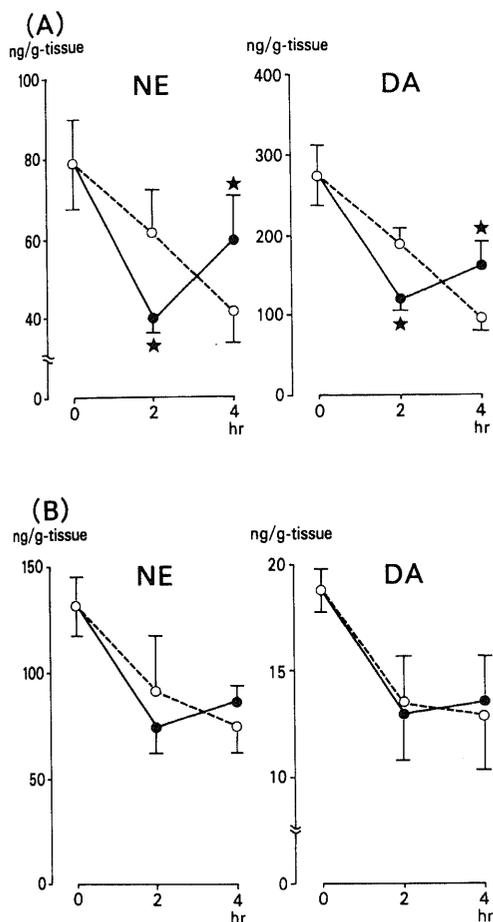


Fig. 5. Effect of intrathecal administration of TRH on catecholamine turnover in rat brain. Three-week-old rats were treated intrathecally (cisterna magna) with 30ng of TRH (●), and simultaneously administered with 3mg of α -methyl-p-tyrosine (α MPT) intraperitoneally. Control group (○) was treated with 10 μ l saline instead of TRH. At 0 time and 2 and 4 hours after administration, rats were sacrificed and brain catecholamine concentrations were measured by HPLC. Upper panel (A) shows catecholamine turnover in cerebral hemisphere, diencephalon and midbrain, and lower panel (B) in cerebellum, pons and medulla oblongata.
NE, norepinephrine; DA, dopamine.
Vertical bar, mean \pm SD of 4 rats.
★ $p < 0.05$ vs control group at the same point of time by Student's t-test.

ついで、TRH と cyclo (His-Pro) の髄腔内投与による脳内カテコールアミン含量への影響を比較検討した (図 4)。TRH 投与群では、間脳および中脳のノルエピネフリンとドーパミン、小脳ではノルエピネフリンの低下が認められた。一方、cyclo (His-Pro) 投与では、小脳、橋および延髄のノルエピネフリンとドーパミン、間脳および中脳のドーパミンの低下傾向が認められた。しかし、投与量と低下の程度に一定の関係は認められなかった。また大脳半球のカテコールアミン濃度に著明な変化はみられなかった。

このことより、TRH および cyclo (His-Pro) は脳内

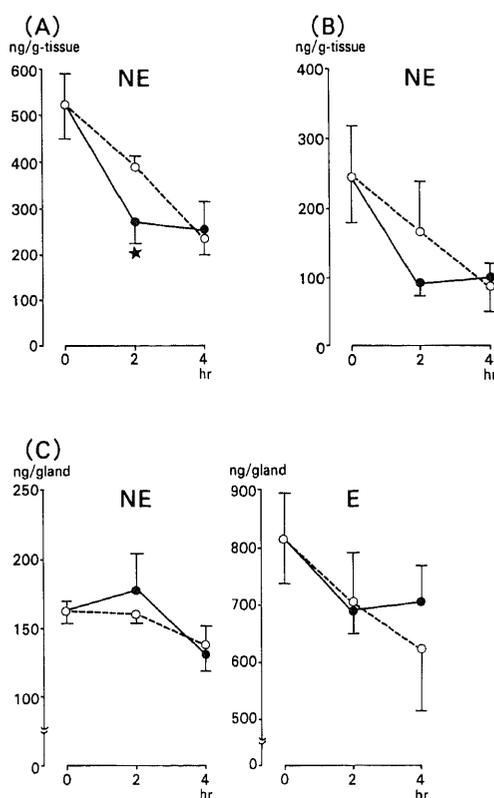


Fig. 6. Effect of intrathecal administration of TRH on catecholamine turnover in peripheral tissues. The treatments were the same as those given in Fig. 5. Panel (A) shows catecholamine turnover in interscapular brown adipose tissue, panel (B) in heart, and panel (C) in adrenal glands.
NE, norepinephrine; E, epinephrine; ○, saline-treated control; ●, TRH-treated rats.
Vertical bar, mean \pm SD of 4 rats.
★ $p < 0.05$ vs control group at the same point of time by Student's t-test.

カテコールアミン濃度に影響を与えるが、脳の部位によりその効果が異なると考えられた。

IV. TRH のカテコールアミン代謝回転に及ぼす影響

α MPT を投与しカテコールアミンの再蓄積を阻害したうえで、TRH を髄腔内投与して脳内のカテコールアミン含量の変化を測定した。大脳半球・間脳・中脳においては、対照群のノルエピネフリンおよびドーパミンの直線的な低下に比べて、TRH 投与群ではノルエピネフリン、ドーパミンともに投与2時間後には急速に含量が低下したが、逆に4時間後には対照群の2時間値程度にまで回復していた(図5)。しかし、小脳・橋・延髄ではノルエピネフリン、ドーパミンともに対照群とTRH 投与群で差がみられなかった。

末梢組織の肩甲間褐色脂肪織および心臓のノルエピネフリンは、TRH 髄腔内投与2時間後に急速な低下がみられ、4時間後ではほぼ同じ値を保って対照群と同程度を示した(図6)。一方副腎のノルエピネフリンやエピネフリンは、TRH 投与群と対照群で有意な差はみられなかった。

カテコールアミンの代謝回転率として単位時間当たりのカテコールアミン減少量を比較すると、大脳半球・間脳・中脳、心臓、褐色脂肪織で、TRH 髄腔内投

与群が対照群の約2倍に亢進していた(表3)。しかし、小脳・橋・延髄のドーパミンや、副腎のノルエピネフリンやエピネフリンの変化は、TRH 投与群と対照群で差がなかった。

V. TRH および cyclo(His-Pro) の体重、摂食量、および血清 T_4 、 T_3 に及ぼす影響

TRH および cyclo(His-Pro) を生後1週目、2週目、3週目と各々連続7日間髄腔内投与すると、生後2日の投与開始直後の体重は各群ともむしろ対照群より重い傾向にあったが、TRH または cyclo(His-Pro) を生後1週目または2週目に投与した群で、生後4週齢での体重増加不良が認められた(図7)。しかし、生後3週目に投与した群では対照と差がなく、TRH または cyclo(His-Pro) が成長に与える影響は生後2週齢までと考えられた。また、TRH と cyclo(His-Pro) を同時投与すると体重増加不良がみられないことより、TRH と cyclo(His-Pro) は体重増加に関しては拮抗的に作用するものと考えられた。

一方、生後4週齢で摂食量、飲水量を測定したが、体重増加不良群に摂食量の著明な低下はみられなかった(図8)。

また、生後5週齢においてラットの直腸温を測定すると、室温では各群に有意な差はみられなかったが、

Table 3. Mean turnover rate of catecholamines

		Turnover rate of catecholamine (ng/g-tissue/hr)		(B)/(A) ratio
		Control group(A)	TRH group(B)	
Cerebral hemisphere, Diencephalon & Midbrain	NE	9.5	19.5	2.0
	DA	35	68	1.9
Cerebellum, Pons & Medulla oblongata	NE	14	28	2.0
	DA	4.5	5.0	1.1
Adrenal glands	NE	6.0	7.5	1.2
	E	48	61	1.2
Heart	NE	45	92	2.0
Brown adipose tissue	NE	62	125	2.0

Turnover rate was calculated from the difference between the mean initial value and that at 2 hours in Fig. 5 and 6. NE, norepinephrine; E, epinephrine; DA, dopamine.

5°C 3時間の寒冷暴露後の直腸温は全群で対照群より低下の傾向にあり、特に TRH を生後1週目または2週目に投与した群で低下が著明であった(図9)。これにより TRH の髄腔内投与は、体温の調節機構に長期的影響を与え、かつその影響は生後2週までに TRH を投与された群に著しいことがわかった。

同実験群の生後6週齢における甲状腺ホルモン T_4 、 T_3 の値は、TRH を生後2週目に投与した群でやや低下している傾向がみられた(表4)。これは、生後2週目に TRH を髄腔内投与することにより、下垂体・甲状腺系の機能に長期的な抑制効果をもたらしたためと考えられる。

VI. TRH および cyclo(His-Pro) の肝ミトコンドリアの各種酵素活性に及ぼす影響

生後6週齢の肝ミトコンドリア分画の呼吸鎖に関連した酵素と、糖新生系の酵素活性を比較した(表5)。CR 活性は TRH 投与群全体と、cyclo(His-Pro) を生後3週目に投与した群、および TRH と cyclo(His-Pro) を同時に生後1週目、2週目に投与した群で低下しており、G6Pase でもほぼ同様の傾向がみられた。しかし ME では cyclo(His-Pro) を生後1週目または2週目に投与した群に低下の傾向がみられた。一方、 α GPDH は全体に上昇の傾向にあったが、CR 活性の低下している群に一層著明であった。G6PD や

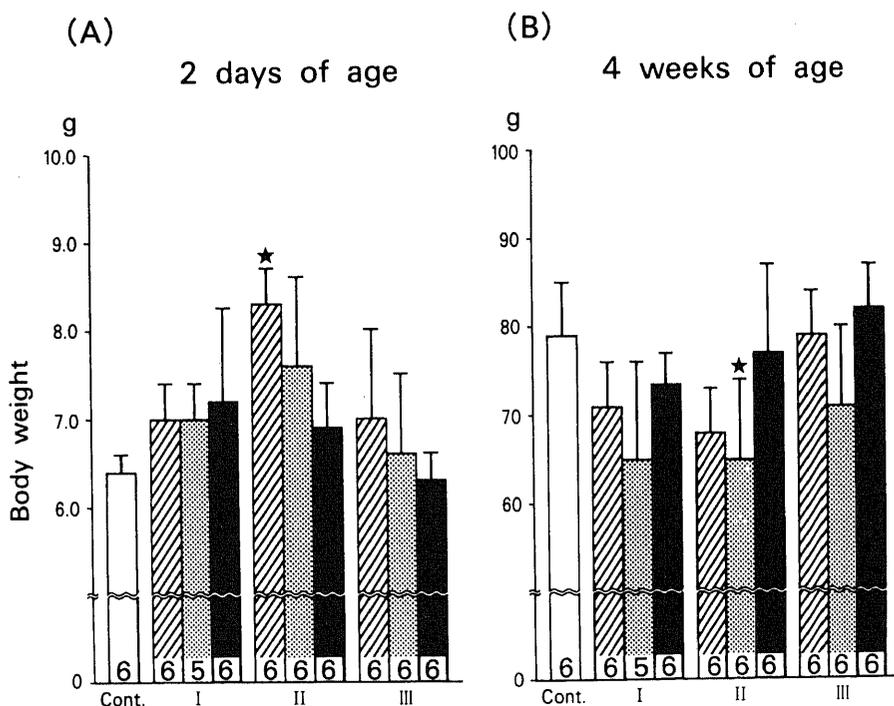


Fig. 7. Effect of intrathecal administration of TRH and/or cyclo(His-Pro) on body weight gain in young rats.

Neonatal rats were treated intrathecally (cisterna magna) with TRH (group I), cyclo(His-Pro) (group II), and an equimolar mixture of a half dose of TRH and cyclo(His-Pro) (group III) in saline for 7 consecutive days at a dose of $3, 6$ and 9×10^{-9} moles during the 1st (▨), 2nd (▩) and 3rd (■) week of life respectively. Control group (□) was treated with 10μ l saline during the 1st week of life. Left panel (A) shows body weight at 2 days of age just at the beginning of treatment, and right panel (B) at 4 weeks of age.

Number in the bottom of the column, number of rats used.

Vertical bar, mean \pm SD.

★ $p < 0.05$ vs control group by one-way ANOVA followed by Duncan's multiple comparisons.

HKには明らかな傾向はみとめられなかった。これらの結果から、TRHは主にCRおよびG6Pase活性に影響を与え、cyclo(His-Pro)は主にME活性に影響を与えたと考えられた。一方、これらの酵素活性の低下に伴って、 α GPDH活性の上昇が観察された。

考 察

今回の成績から、新生児ラットに対するTRH、cyclo(His-Pro)の髄腔内投与は、体温調節機構の成熟過程に慢性的影響を与えることが判明した。Prasadら¹³⁾は、TRHのactive metaboliteであるcyclo(His-Pro)を脳室内投与にすることにより体温降下がおこるが、これはTRHにより拮抗されるとし、Bhargava³⁹⁾もまたTRH、cyclo(His-Pro)が体温調節に重要な役割を演じていると報告している。抗TRH抗体の投与により体温降下がおこることから³⁹⁾、外因性のTRHのみならず内因性TRHも体温調節に関与していると考えられる。一方TRHがカテコールアミンの代謝に関与することは、生化学的¹⁹⁾にも組織化学的¹⁴⁾にも明らかになっている。また、カテコールアミ

ンは、非ふるえ熱産生に決定的な役割を演じていることも明らかである²⁷⁾。そこで今回TRHやcyclo(His-Pro)が体温調節機構の成熟に及ぼす影響を、カテコールアミン代謝および、褐色脂肪織や肝臓のミトコンドリアの熱産生関連酵素の活性から検討した。

まず、TRHの腹腔内投与では体温上昇作用がなく、髄腔内投与によりその効果が現れ、かつカテコールアミンの合成阻害剤である6OHD²⁹⁾の同時投与によりその効果が消失することから、TRHの体温上昇作用の少なくとも一部は、中枢神経系のカテコールアミンを介していると考えられた。

一方、幼若期の非ふるえ熱産生の主要な場である褐色脂肪織³⁰⁾においては、TRH投与の生後3週齢において [³H] GDP 結合能の低下がみられたが、生後5週齢では対照群と同程度であった。 [³H] GDP 結合能は、褐色脂肪細胞にしか存在しないといわれているミトコンドリアのthermogeninと呼ばれるプロトン短絡経路を形成する分子量32KDaの蛋白質質量を反映している²⁷⁾。今回観察された変動の原因として、(1) TRH投与により直接thermogeninの加齢変化が促進

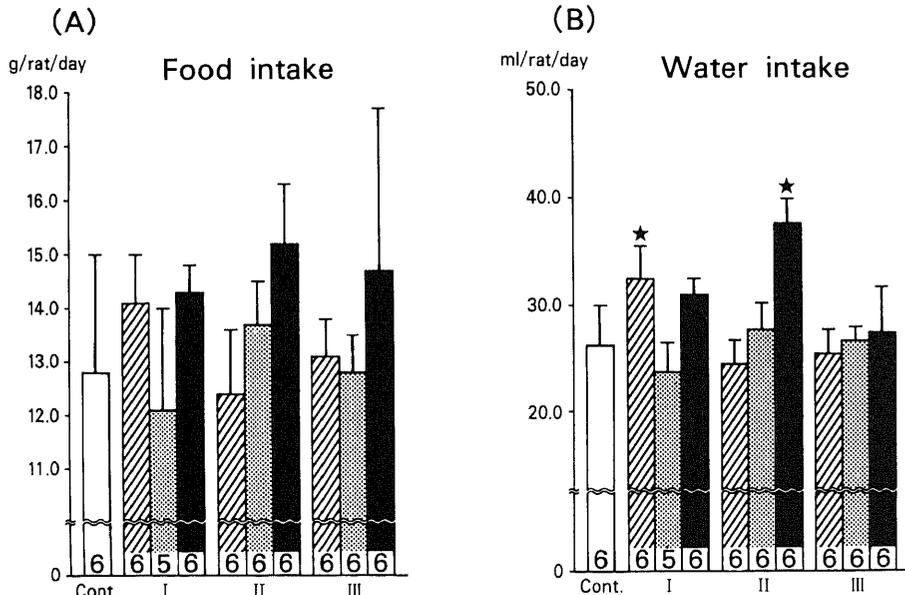


Fig. 8. Effect of intrathecal administration of TRH and/or cyclo(His-Pro) on food and water intake in young rats at 4 weeks age.

The treatments were the same as those given in Fig. 7. Left panel (A) shows food intake, and right panel (B) shows water intake at 4 weeks of age.

Number in the bottom of the column, number of rats used.

Vertical bar, mean \pm SD of 3 days in the each group.

* $p < 0.05$ vs control group by one-way ANOVA followed by Duncan's multiple comparisons.

されたか³⁰⁾, (2)甲状腺ホルモンの過剰分泌がおこり基礎代謝全般が亢進し, 褐色脂肪織における熱産生の需要が低下したか, あるいは(3)TRH 投与がカテコールアミン分泌を介して, 特にノルエピネフリンにより調節されている褐色脂肪織の産熱機構に一時的な変化を及ぼしたかの, いずれかが考えられる。

また, 細胞内の熱産生に重要な α GPDH の活性をみると, cyclo (His-Pro) 投与群も 6OHD 投与群も TRH 群と同じ傾向を示し, いずれも褐色脂肪織や肝臓の熱産生系に何らかの影響を与え, その効果は生後週齢により異なることが示唆された。また, TRH, cyclo (His-Pro), 6OHD に共通して関わっている物質はカテコールアミンと考えられる。

そこで, 新生児期に投与した TRH が体温調節の成熟にどのように影響を与えるかをみてゆくと, 生後3週齢では体温上昇傾向, 生後4週齢では体温低下傾向, 生後5週齢では回復傾向と二相性変化が見られ

た。カテコールアミンの分泌動態を推測すると, TRH の連続髄腔内投与直後の生後3週齢では脳内カテコールアミンの分泌亢進がおこり, 生後4週齢では逆に反跳的な分泌低下がおこっているものと考えられる。また, 生後6週の時点で, 褐色脂肪織や肝臓のミトコンドリアの α GPDH や CR の変化を再度検討すると, CR 活性は低下しており, 体温低下を裏付けていた。 α GPDH 活性は早期に低下するが(表1), 回復期には上昇する傾向がうかがえる。しかし, これらの酵素活性の変化が TRH あるいは cyclo (His-Pro) の直接作用であるのか, 甲状腺ホルモンやカテコールアミンなどの他の伝達物質を介したものであるのか, さらに体温の変化がおこったために結果として生じた二次的な現象なのかは, 以上の結果からは不明である。

一方, TRH の投与量と体温の変化に用量依存性がなかったことは明らかで, かえって大量投与により効果の減弱する傾向が認められた事より, 生理的には脳

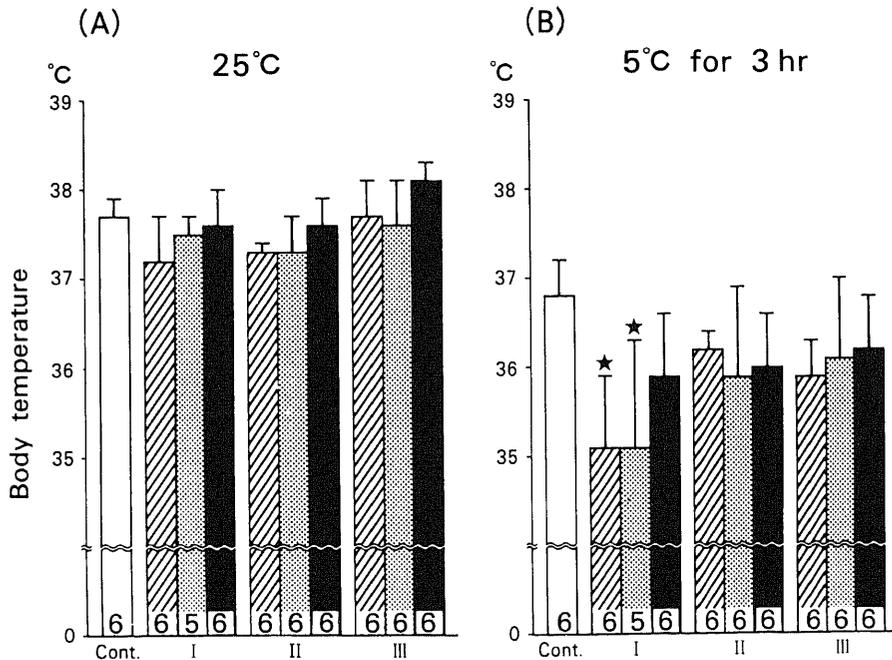


Fig. 9. Effect of intrathecal administration of TRH and/or cyclo(His-Pro) on body temperature in young rats at 5 weeks of age.

The treatments were given in Fig. 7. Body temperature was measured with an electric thermometer at room temperature (A) and after exposure to cold (5°C for 3 hours) (B) at 5 weeks of age.

Number in the bottom of the column, number of rats used.

Vertical bar, mean \pm SD.

* $p < 0.05$ vs control group by one-way ANOVA followed by Duncan's multiple comparisons.

Table 4. Effect of intrathecal administration of TRH and/or cyclo(His-Pro) on serum thyroxine(T_4) and triiodothyronine (T_3) concentrations in young rats at 6 weeks of age

Experimental group	No	T_4 (nM)	T_3 (nM)
Control	6	52.1±15.4	1.14±0.11
I - 1 w	6	59.2±13.5	1.35±0.26
I - 2 w	5	33.5±5.8	0.89±0.08
I - 3 w	6	47.6±15.4	1.17±0.11
II - 1 w	6	59.8±19.3	1.32±0.15
II - 2 w	6	55.3±13.5	1.43±0.31
II - 3 w	6	48.3±16.7	1.03±0.12
III - 1 w	6	63.1±7.1	1.35±0.18
III - 2 w	6	48.3±10.3	1.14±0.22
III - 3 w	6	53.4±7.7	1.15±0.37

Neonatal rats were treated intrathecally(cisterna magna) with TRH(group I), cyclo(His-Pro)(group II), and an equimolar mixture of a half dose of TRH and cyclo(His-Pro)(Group III) in saline for 7 consecutive days at a dose of 3, 6 and 9×10^{-9} moles during the 1st(1w), 2nd(2w) and 3rd(3w) week of life respectively. Control group was treated with 10μ l saline during the 1st week of life. Serum thyroxine(T_4) and triiodothyronine(T_3) were measured by radioimmunoassay kits at 6 weeks of age. Values are expressed as mean±SD.

Table 5. Effect of intrathecal administration of TRH and/or cyclo(His-Pro) on mitochondrial enzyme activities in rat liver at 6 weeks of age

Experimental group	No	CR	α GPDH	ME	G6PD	HK	G6Pase
Control	6	17.0±6.1	5.3±1.2	23.2±3.8	1.4±0.6	17.8±1.3	6.2±2.8
I - 1 w	6	7.6±1.7*	7.8±1.0	19.1±3.1	1.9±0.6	17.2±2.8	3.3±0.9
I - 2 w	5	6.0±1.7*	9.9±2.4*	18.8±4.2	2.1±0.5	16.9±4.1	2.3±1.2*
I - 3 w	6	6.0±1.8*	8.7±1.0*	17.9±2.8	2.9±1.4	14.8±1.7	2.0±2.0*
II - 1 w	6	14.1±4.8	7.1±1.6	11.0±4.7*	2.8±1.0	16.0±4.5	3.9±1.1
II - 2 w	6	12.3±3.4	7.0±1.2	11.8±3.2*	2.1±0.8	15.8±2.0	5.1±1.2
II - 3 w	6	5.4±1.0*	8.7±2.0*	17.2±7.7	2.0±0.8	15.5±5.6	2.1±1.7*
III - 1 w	6	6.9±2.8*	9.2±0.7*	21.9±3.9	1.7±0.8	17.2±2.7	2.3±2.0*
III - 2 w	6	4.5±0.8*	8.5±2.0*	17.0±3.1	2.2±0.8	14.5±2.0	4.0±2.3
III - 3 w	6	13.8±5.5	6.0±1.5	21.5±3.9	2.2±0.5	18.1±3.4	4.5±1.6

The treatments were the same as those described in Table 4. At 6 weeks of age, rat liver was excised, and mitochondrial fraction was prepared for measurement of mitochondrial enzyme activities. CR, cytochrome c reductase; α GPDH, α -glycerophosphate dehydrogenase; ME, malic enzyme; G6PD, glucose-6-phosphate dehydrogenase; HK, hexokinase; G6Pase, glucose-6-phosphatase.

Values are expressed as mean±SD in μ mol/min/mg-protein except for G6Pase in nmol-Pi/min/mg-protein.

* $P < 0.05$ vs control group by one-way ANOVA followed by Duncan's multiple comparisons.

内 TRH のごく軽微な変化が体温調節機構に変化を与えるものと考えられた。

TRH 投与が、中枢神経系のカテコールアミンを介して熱産生に関与することは先にも述べた通り明らかであり、脳内のカテコールアミン含量は大脳半球を除く部位で低下傾向を示した。しかし、この脳内カテコールアミン含量の変化も用量依存性は認められなかった。脳内カテコールアミンの代謝回転は、TRH 投与により 2 倍程度に亢進することが明らかになったが、末梢組織の心臓や褐色脂肪織のカテコールアミンの代謝回転率も同程度に亢進していた。以上より、TRH の髄腔内投与が、カテコールアミンを介して末梢組織すなわち全身の熱産生組織に影響を与えていると考えられた。

そこで、TRH, cyclo(His-Pro) の髄腔内投与を時期をずらして行い、成長時期と末梢の熱産生の関係につき検討した。肝臓のミトコンドリア分画の呼吸鎖や糖新生に関連した酵素のうち、TRH 投与群では CR と G6Pase の活性低下傾向がみられ、cyclo(His-Pro) 投与群では ME の活性低下傾向がみられたが、脂質代謝に重要な α GPDH²⁰ は、それに呼応するように上昇傾向を示した。投与時期による酵素活性の違いは明らかではなかったが、cyclo(His-Pro) 単独または TRH と cyclo(His-Pro) 併用群で生後 1 週目、2 週目に投与された群と生後 3 週目に投与された群に酵素活性に差異があり、末梢の体温調節機構に与える影響の臨界期は生後 2 週以内と考えられた。ラットの熱産生機構は生後 2 週までが非ふるえ熱産生で、それ以降はふるえ熱産生におきかわってゆくとされていることから⁴⁰、ラットにおいては生後 2 週で体温調節機構に重大な変化がおきると考えられる。このとき、カテコールアミンの動態に大きな影響を与える脳内 TRH の微妙な変化が、体温調節機構に半永久的な影響を与える可能性は十分考えられる。

TRH と cyclo(His-Pro) は、いずれも神経伝達物質または神経調節物質としての役割が注目されている²⁰。しかし、TRH はシナプトゾームに多く神経伝達物質の形式をとるが、cyclo(His-Pro) はシナプトゾームに少ないこと、またラット脳全体の cyclo(His-Pro) 含量は TRH の約 3 倍量もあることなどの相違点が知られている⁸⁹。生理的には TRH は体温を上昇させ、cyclo(His-Pro) は低下させるといわれている¹¹。これらより、TRH, cyclo(His-Pro) は各々単独で直接的またはカテコールアミンなどの他の神経伝達物質を介して作用するとも考えられるが、TRH の作用の一部は cyclo(His-Pro) に代謝されてから発現

する、すなわち TRH は cyclo(His-Pro) の pro-hormone ではないかとも考えられている¹¹⁾⁽²⁴⁾。

またラットの視床下部の TRH 含量は出生時に低値であるが、その後急速に増加し、約 2 週で成熟ラットのレベルに達すること⁴²⁾⁽⁴³⁾、ラットにおける血清中の TRH 不活性化能は、生後 2 週齢を境にして高くなるが、逆に脳内の不活性化能は低下すること⁴³⁾⁻⁽⁴⁵⁾、TRH 受容体の密度が生後 2 週齢にかけて減少すること⁴⁶などより、TRH の作用は年齢によりその作用効果が異なると考えられる。また、視床下部の thermo-responsive neuron がやはり生後 2 週齢を境として反応形式に変化がおこることや⁴⁰、生後 3 週齢で恒温性を獲得すること³⁰を考えると、ラットの体温調節機構の臨界期は生後 2 週にあるといえる。

しかし、TRH が髄腔内に投与されても急速に代謝されてしまうことより⁴⁰、TRH 投与後の体温調節異常の残存やミトコンドリア分画の酵素活性の異常が、TRH そのものにより直接的に生じているとは考えにくい。TRH が体温調節中枢の成熟に影響を与えるか、TRH 投与によりカテコールアミンの代謝動態に影響を与えて、これらの異常を半永久的におこしていると考えられる。しかし、肝臓のミトコンドリア分画の酵素活性の変動は、体温調節機構に異常が生じたために結果として TRH の直接作用に続発して生じた可能性もあり、この点は今後の検討課題である。また、最近 TRH はイノシトールリン脂質代謝を介する細胞膜受容体伝達機構に働くことも明らかになり⁵⁰⁾⁽⁵¹⁾、細胞レベルでの熱産生に TRH が関与していることも考えられ、今後さらに研究が必要と思われる。

結 論

甲状腺刺激ホルモン放出ホルモン (TRH) およびその中間代謝産物である cyclo(His-Pro) の幼若ラット体温調節機構の成熟に及ぼす影響を調べ、次の結果を得た。

1. TRH およびその活性中間代謝産物 cyclo(His-Pro) は、体温調節に関して相互に拮抗的に作用し、その作用はカテコールアミンを介して発現するものと考えられる。

2. TRH, cyclo(His-Pro) の連続投与は脳内ノルエピネフリン、ドーパミン含量の低下を来し、前者は間脳・中脳・小脳で、後者は小脳・橋・延髄で顕著である。

3. TRH は脳・心臓・褐色脂肪織のカテコールアミン代謝回転率を 2 倍に促進する。

4. 新生児期における TRH, cyclo(His-Pro) の連

統投与は長期的に熱産生を障害し、この効果は生後2週以前に著しい。また両者の併用はこの障害を緩和する。

5. 両者による長期的熱産生障害は、肝ミトコンドリア分画の酵素活性の変動を伴う。すなわち TRH では CR の低下および α GPDH の上昇がみられ、cyclo(His-Pro) では ME の低下および α GPDH の上昇がみられた。

以上の成績は TRH, cyclo(His-Pro) が生理的体温調節機構の成熟にカテコールアミン分泌の調節を介して調節的役割を果たしていることを示唆する。

謝 辞

稿を終えるに臨み、御指導と御校閲を賜りました恩師谷口昂教授に深く感謝の意を表します。また、御指導と御助言を頂きました佐藤保助教授をはじめ小児科学教室内分泌グループの諸先生方に感謝の意を表します。

更に快く薬品を提供して下さいました北陸大学薬学部生物薬品化学教室橋本忠教授、佐倉直樹助教授に厚く御礼申し上げます。

文 献

- 1) Bøler, J., Enzmann, F., Folkers, K., Bowers, C. Y. & Schally, A. V.: The identity of chemical and hormonal properties of the thyrotropin releasing hormone and pyroglutamyl-histidyl-proline amide. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **37**, 705-710 (1969).
- 2) Prasad, C.: Thyrotropin-releasing hormone. In A. Lajtha (ed.), *Handbook of Neurochemistry*, Vol 8, 2nd ed. p175-200, Plenum Press, New York, 1985.
- 3) Jackson, I. M. D. & Reichlin, S.: Thyrotropin-releasing hormone (TRH): Distribution in hypothalamic and extrahypothalamic brain tissues of mammalian and submammalian chordates. *Endocrinology*, **95**, 854-862 (1974).
- 4) Kubek, M. J., Lorincz, M. A. & Wilber, J. F.: The identification of thyrotropin releasing hormone (TRH) in hypothalamic and extrahypothalamic loci of the human nervous system. *Brain Res.*, **129**, 196-200 (1977).
- 5) Lechan, R. M. & Jackson, I. M. D.: Immunohistochemical localization of thyrotropin-releasing hormone in the rat hypothalamus and pituitary. *Endocrinology*, **111**, 55-65 (1982).
- 6) Morley, J. E., Garvin, T. J., Pekary, A. E. & Hershman, J. M.: Thyrotropin-releasing hormone in the gastrointestinal tract. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **79**, 314-318 (1977).
- 7) Jackson, I. M. D.: Thyrotropin-releasing hormone. *N. Engl. J. Med.*, **306**, 145-155 (1982).
- 8) Peterkofsky, A., Battaini, F., Koch, Y., Takahara, Y. & Dannies, P.: Histidyl-proline diketopiperazine: Its biological role as a regulatory peptide. *Mol. Cell. Biochem.*, **42**, 45-63 (1982).
- 9) Yanagisawa, T., Prasad, C. & Peterkofsky, A.: The subcellular and organ distribution and natural form of histidyl-proline diketopiperazine in rat brain determined by a specific radioimmunoassay. *J. Biol. Chem.*, **255**, 10290-10298 (1980).
- 10) Mori, M., Prasad, C. & Wilber J. F.: Regional dissociation of histidyl-proline diketopiperazine (cyclo(His-Pro)) and thyrotropin-releasing hormone (TRH) in the rat brain. *Brain Res.*, **231**, 451-453 (1982).
- 11) Prasad, C., Matsui, T., Williams, J. & Peterkofsky, A.: Thermoregulation in rats: Opposing effects of thyrotropin releasing hormone and its metabolite histidyl-proline diketopiperazine. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **85**, 1582-1587 (1978).
- 12) Morley, J. E. & Levine, A. S.: Thyrotropin releasing hormone (TRH) suppresses stress induced eating. *Life Sci.*, **27**, 269-274 (1980).
- 13) Keller, H. H., Bartholini, G. & Pletscher, A.: Enhancement of cerebral noradrenaline turnover by thyrotropin-releasing hormone. *Nature*, **248**, 528-529 (1974).
- 14) Constantinidis, J., Geissbühler, F., Gaillard, J. M., Hovaguimian, T. H. & Tissot, R.: Enhancement of cerebral noradrenaline turnover by thyrotropin-releasing hormone: Evidence by fluorescence histochemistry. *Experientia*, **30**, 1182-1183 (1974).
- 15) Marek, K. & Haubrich, D. R.: Thyrotropin-releasing hormone increased catabolism of catecholamines in brains of thyroidectomized rats. *Biochem. Pharmacol.*, **26**, 1817-1818 (1977).
- 16) Kerwin, R. W. & Pycocock, C. J.: Thyrotropin releasing hormone stimulates release of [3 H]-dopamine from slices of rat nucleus accumbens in vitro. *Br. J. Pharmacol.*, **67**, 323-325

(1979).

- 17) **Narumi, S., Nagai, Y. & Nagawa, Y.:** Thyrotropin-releasing hormone (TRH): Action mechanism of an enhanced dopamine release from rat striatal slices. *Folia Pharmacol. Jpn.*, **75**, 239-250 (1979).
- 18) **Restogi, R. B.:** Thyrotropin-releasing hormone influences on behavior: Possible involvement of brain monoaminergic systems. In R. Collu, A. Barbeau, J. R. Ducharme & J. G. Rochefort (eds.), *Central Nervous System Effects of Hypothalamic Hormones and Other Peptides*, p123-140, Raven Press, New York, 1979.
- 19) **Winokur, A. & Beckman, A. L.:** Effects of thyrotropin releasing hormone, norepinephrine and acetylcholine on the activity of neurons in the hypothalamus, septum and cerebral cortex of the rat. *Brain Res.*, **150**, 205-209 (1978).
- 20) **Foster, D. O. & Frydman, M. L.:** Tissue distribution of cold-induced thermogenesis in conscious warm-or cold-acclimated rats reevaluated from changes in tissue blood flow: The dominant role of brown adipose tissue in the replacement of shivering by nonshivering thermogenesis. *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, **57**, 257-270 (1979).
- 21) **Nicholls, D. G. & Locke, R. M.:** Thermogenic mechanisms in brown fat. *Physiol. Rev.*, **64**, 1-64 (1984).
- 22) **Himms-Hagen, J.:** Cellular thermogenesis. *Annu. Rev. Physiol.*, **38**, 315-351 (1976).
- 23) **Clark, D. W. J., Laverty, R. & Phelan, E. L.:** Long-lasting peripheral and central effects of 6-hydroxydopamine in rats. *Br. J. Pharmacol.*, **44**, 233-243 (1972).
- 24) **Yoshida, T., Kemnitz, J. W. & Bray, G. A.:** Lateral hypothalamic lesions and norepinephrine turnover in rats. *J. Clin. Invest.*, **72**, 919-927 (1983).
- 25) **Hogeboom, G. H. Schneider, W. C. & Pallade, G. E.:** Cytochemical studies of mammalian tissues. *J. Biol. Chem.*, **172**, 619-635 (1948).
- 26) **Lee, Y. P. & Lardy, H. A.:** Influence of thyroid hormone on L- α -glycerophosphate dehydrogenases and other dehydrogenases in various organs of the rat. *J. Biol. Chem.*, **240**, 1427-1436

(1965).

- 27) **Nedergaard, J. & Cannon, B.:** [^3H] GDP binding and thermogenin amount in brown adipose tissue mitochondria from cold-exposed rats. *Am. J. Physiol.*, **248**, C365-C371 (1985).
- 28) **Nicholls, D. G.:** Hamster brown-adipose-tissue mitochondria. Purine nucleotide control of the ion conductance of the inner membrane, the nature of the nucleotide binding site. *Eur. J. Biochem.*, **62**, 223-228 (1976).
- 29) **Horecker, B. L.:** Triphosphopyridine nucleotide-cytochrome c reductase in liver. *J. Biol. Chem.*, **183**, 593-605 (1950).
- 30) **Ochoa, S.:** Malic enzyme. In S. P. Colowick & N. O. Kaplan (eds.), *Methods in Enzymology*, Vol 1, p739-753 Academic Press, New York, 1955.
- 31) **Bergmeyer, H. U., Gawehn, K. & Grassl, M.:** Enzymes as biochemical reagents, In H. U. Bergmeyer (ed.), *Methods of Enzymatic Analysis*, Vol 1, 2nd English ed. p425-522, Academic Press, New York, 1974.
- 32) **Baginski, E. S., Foà, P. P. & Zak, B.:** Glucose-6-phosphatase. In H. U. Bergmeyer (ed.), *Methods of Enzymatic Analysis*, Vol 2, 2nd English ed. p876-880, Academic Press, New York, 1974.
- 33) **Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. & Randall, R. J.:** Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**, 265-275 (1951).
- 34) **Duncan, R. C., Knapp, R. G. & Miller, M. C.:** *Introductory Biostatistics for the Health Sciences*, 2nd ed., p137-159, John Wiley & Sons, New York, 1983.
- 35) **Bhargava, H. N.:** The effects of thyrotropin releasing hormone and histidyl-proline diketopiperazine on delta-9-tetrahydrocannabinol-induced hypothermia. *Life Sci.*, **26**, 845-850 (1980).
- 36) **Prasad, C., Jacobs, J. J. & Wilber, J. F.:** Immunological blockade of endogenous thyrotropin-releasing hormone produces hypothermia in rats. *Brain Res.*, **193**, 580-583 (1980).
- 37) 伊藤真次, 土居勝彦: 寒さへの適応 3. カテコールアミン. *北海道医誌*, **45**, 93-104 (1970).
- 38) **Conklin, P. & Heggenes, F. W.:** Maturation of temperature homeostasis in the rat. *Am. J.*

Physiol., 220, 333-336 (1971).

- 39) Sundin, U., Herron, D. & Cannon, B.: Brown fat thermoregulation in developing hamsters (*Mesocricetus auratus*): A GDP-binding study. *Biol. Neonate*, 39, 141-149 (1981).
- 40) Taylor, P. M.: Oxygen consumption in new-born rats. *J. Physiol.*, 154, 153-168 (1960).
- 41) Prasad, C., Matsui, T. & Peterkofsky, A.: Antagonism of ethanol narcosis by histidyl-proline diketopiperazine. *Nature*, 268, 142-144 (1977).
- 42) Shambaugh, G. E. III & Wilber, J. F.: The effect of caloric deprivation upon thyroid function in the neonatal rat. *Endocrinology*, 94, 1145-1149 (1974).
- 43) Jeffcoate, S. L., Linton, E. A., Lira, O. & White, N.: Age-dependent changes in the brain content, enzymic inactivation, and hypophysiotrophic action of TRH in the rat. In E. C. Griffiths & G. W. Bennett (eds.), *Thyrotropin-Releasing Hormone*, p145-155, Raven Press, New York, 1983.
- 44) Oliver, C., Parker, C. R. Jr. & Porter, J. C.: Developmental changes in the degradation of thyrotrophin releasing hormone by the serum and brain tissues of the male rat. *J. Endocrinol.*, 74, 339-340 (1977).
- 45) Neary, J. T., Kieffer, J. D., Nakamura, C., Mover, H., Soodak, M. & Maloof, F.: The

developmental pattern of thyrotropin-releasing hormone-degrading activity in the plasma of rats. *Endocrinology*, 103, 1849-1854 (1978).

- 46) Griffiths, E. C., White, N. & Jeffcoate, S. L.: Age-dependent changes in the inactivation of thyrotrophin-releasing hormone by different areas of rat brain. *Neurosci. Lett.*, 13, 57-62 (1979).
- 47) Banerji, A. & Prasad, C.: The postnatal development of the pituitary thyrotropin-releasing hormone receptor in male and female rats. *Endocrinology*, 110, 663-664 (1982).
- 48) Hori, T. & Shinohara, K.: Hypothalamic thermo-responsive neurones in the new-born rat. *J. Physiol.*, 294, 541-560 (1979).
- 49) Prasad, C. & Jayaraman, A.: Metabolism of thyrotropin-releasing hormone in human cerebrospinal fluid. Isolation and characterization of pyroglutamate aminopeptidase activity. *Brain Res.*, 364, 331-337 (1986).
- 50) Martin, T. F. J.: Thyrotropin-releasing hormone rapidly activates the phosphodiester hydrolysis of polyphosphoinositides in GH₃ pituitary cells. *J. Biol. Chem.*, 258, 14816-14822 (1983).
- 51) Berridge, M. J. & Irvine, R. F.: Inositol trisphosphate, a novel second messenger in cellular signal transduction. *Nature*, 312, 315-321 (1984).

Effects of Thyrotropin-Releasing Hormone and Histidyl-Proline Diketopiperazine on the Maturation of Homeothermia in Neonatal Rats Chiaki Miyamori, Department of Pediatrics, School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920—J. Juzen Med. Soc., 98, 686—703 (1989)

Key words thyrotropin-releasing hormone, histidyl-proline diketopiperazine, thermoregulation, catecholamine, mitochondria

Abstract

The present study was performed to examine the effects of thyrotropin-releasing hormone (TRH) and its active metabolite, histidyl-proline diketopiperazine [cyclo(His-Pro)], on the maturation of thermoregulation in neonatal rats. The daily intrathecal administration of 1×10^{-10} moles of TRH during the 2nd week of age produced a transient hyperthermia followed by a hypothermic period. These effects were probably induced by catecholamine in the central nervous system, since they were abolished by the simultaneous administration of 6-hydroxydopamine, an inhibitor of catecholamine synthesis. The intrathecal administration of $1 \times 10^{-11} \sim 10^{-9}$ moles of TRH or cyclo(His-Pro) for 7 consecutive days produced a significant decrease of norepinephrine and dopamine in the brain. In the TRH-treated rats, this effect was notable on diencephalon, midbrain and cerebellum, whereas in the cyclo(His-Pro)-treated rats on cerebellum, pons and medulla oblongata. The catecholamine metabolism in brain, heart and brown adipose tissue was accelerated two-fold with TRH treatment. To examine the effect on the maturation of homeothermia, TRH or cyclo(His-Pro) was injected intrathecally at a dose of 3, 6 and 9×10^{-9} moles for 7 consecutive days during the 1st, 2nd or 3rd week of age respectively. Hypothermia was induced in the groups treated during the 1st and 2nd week of age. At 6 weeks of age, the enzyme activities in liver mitochondria were measured, including cytochrome c reductase (CR), α -glycerophosphate dehydrogenase (α GPDH), malic enzyme (ME), glucose-6-phosphate dehydrogenase, hexokinase and glucose-6-phosphatase. TRH treatment suppressed CR activity and enhanced α GPDH activity, whereas cyclo(His-Pro) reduced ME and increased α GPDH activities. These effects were conspicuous on the rats treated during the 1st and 2nd week of age, indicating that both TRH and cyclo(His-Pro) affected the homeothermic development in neonatal rats, and its critical period was the 2nd week of age. These results suggest that TRH and cyclo(His-Pro) modulate the maturation of thermoregulation through activation of catecholamine metabolism.