Thyrotropin-releasing hormone（TRH）アナログHUB-94とHUB-95の生物学的活性とカテコールアミン分泌におよぼす影響

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: 岡部, 敬
	メールアドレス:
	所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/8104

金沢大学十全医学会雑誌　第98巻　第2号　351－366（1989）

Thyrotropin-releasing hormone (TRH) アナログ HUB-94 と HUB-95 の生物学的活性とカテコールアミン分泌におよぼす影響

金沢大学医学部小児科学講座（主任：谷口　昂教授）
岡　部　　敬

（平成1年2月17日受付）

Thyrotropin-releasing hormone (TRH) の構造は，ピログルタミルーヒスチジループロリナミドであるが，そのグルタミン基をホモグルタミンに置換したアナログ，ピロホモグルタミルーヒスチジループロリナミド (HUB-94) および，さらにそのヒスチジン基をノルバリンに置換したピロホモグルタミルーノルバリニループロリナミド (HUB-95) を用いて，その生物学的活性およびカテコールアミン (catecholamine, CA) 分泌への影響を TRH と比較検討した．HUB-94 はラット脳シナプトゾーム分画に対し TRH とほぼ同等の結合能を有したが ($IC_{50}=4.0\times10^{-8}$ M vs 1.9×10^{-8} M)，HUB-95 の親和性は著しく低かった (1.8×10^{-5} M)．副腎および視床下部の周辺灌流系において三者はいずれも CA 放出を促進したが，その刺激効果は副腎では HUB-95 が，視床下部では TRH が最も強かった．成熟ラットの髄腔内投与により，HUB-94 は TRH より強い体温，血圧上昇作用を示し，一方 HUB-95 では体温，脈拍，血圧上昇作用および shaking response に対する作用は TRH より弱かった．しかし HUB-95 のみが静脈内投与で脈拍上昇作用を示した．またペントバルビタール麻酔からの覚醒作用は両アナログとも TRH より強かった．次に幼若ラットにおいて 1×10^{-9} moles 髄腔内投与後の血中 CA は，HUB-95 がノルエピネフリン (norepinephrine, NE)，エピネフリン (epinephrine, E) とも上昇し，HUB-94 および TRH は E で上昇傾向を示した．さらに7日間連日幼若ラットの髄腔内に 10^{-10}～10^{-9} moles 投与後の組織 CA 含量とチロジン水酸化酵素 (tyrosine hydroxylase, TH) 活性を測定した．前脳＋中脳および副腎において三者とも NE 含量が低下した．また TH 活性は前脳＋中脳では TRH で，副腎では HUB-94 で増加傾向を示した．以上の結果から TRH アナログ HUB-94 はより中枢性に，HUB-95 はより末梢性に強い TRH 様作用を有すると考えられる．またこれらの作用発現に中枢および末梢での CA の産生や放出の促進が関与することが示唆された．

Key words thyrotropin-releasing hormone, thyrotropin-releasing hormone analogue, catecholamine

Thyrotropin-releasing hormone (TRH) は視床下部に限らず，大脳皮質や小脳など脳内に広く分布している[1)2)]．その作用は hypophysiotropic hormone としての thyrotropin (TSH) 分泌刺激ばかりでなく，神経伝達物質や神経修飾物質として[3)]多岐に及んでいる．TRH の動物における中枢性作用は，自発運動の亢進[4)~7)]，睡眠や麻酔からの覚醒作用[8)9)]，血圧[10)11)]，心拍[12)]および体温[13)~15)]の上昇作用などが知られている．なかでもラットの出血性[16)]，脊髄性ショック時の昇圧作用[17)]，ペントバルビタール麻酔下での覚醒作用[9)]，ま

Abbreviations: Ach, acetylcholine; CA, catecholamine; DHBA, dihydroxybenzylamine; DMSO, dimetylsulfoxide; E, epinephrine; ECD, electrochemical detector; EDTA, ethylene diamine tetra acetic acid; HPLC, high performance liquid chromatography; HUB-94, pyrohomoglutamyl-histidyl-prolinamide; HUB-95, pyrohomoglutamyl-norvalinyl-prolinami-

た人では脊髄小脳変性症[18)19)]や神経精神疾患[20)21)]に対する治療効果が認められ，臨床的にも注目されている．しかし TRH は血中ですみやかに分解され失活するので，近年これらの TRH 様の神経生理学的作用が強く，下垂体刺激作用の少ない TRH アナログの合成が研究されている．

TRH およびそのアナログの中枢神経に対する作用機序として，ホルモン分泌作用と無関係に，ノルエピネフリン (norepinephrine, NE) や，ドーパミン作動性ニューロンにおけるカテコールアミン (catecholamine, CA) の turnover の亢進[4)5)]，アセチルコリン (acetylcholine, Ach)[22)23)]やセロトニン[7)24)]の関与が報告されている．そこで，今回二つの TRH アナログ，ピロホモグルタミル－ヒスチジル－プロリナミド (HUB-94)[25)]，ピロホモグルタミル－ノルバリニル－プロリナミド (HUB-95) について，その生物学的活性を明らかにするために，in vitro および in vivo で TRH と比較検討した．

材料および方法

I．使用薬剤と投与方法

TRH としてはプロチレリン (田辺，大阪) を用いた．TRH アナログの HUB-94，HUB-95 は北陸大学，佐倉博士より供与されたものを用いた (図1)．TRH と HUB-94 は生食で，HUB-95 はジメチルスルホキシド (dimetylsulfoxide, DMSO)，(和光，大阪) で 3×10^{-2} M に溶解後，さらに生食で所定の濃度まで稀釈して用いた．

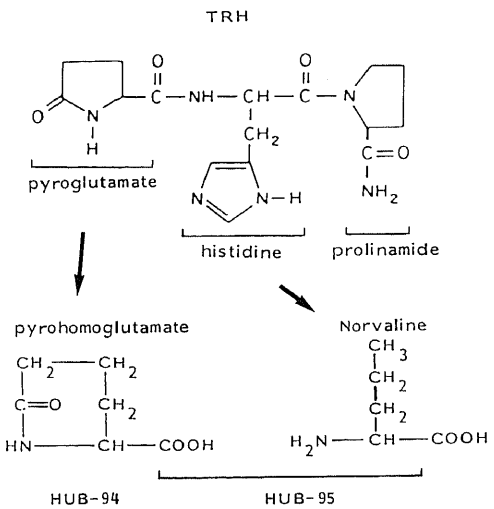

Fig. 1. The structure of TRH and its analogues, HUB-94 and HUB-95. Arrow, substitution of amino acid residues in TRH molecule.

II．実験動物

生後2～3週のウィスター系ラットおよび 200～250g の雄成熟ラットを用いた．

III．TRH アナログの TRH 受容体への親和性の測定

1．シナプトゾーム分画の作成

小川ら[26)]の方法に従いエーテル麻酔下でラットを断頭屠殺後，直ちに脳 (小脳を除く) を10容の氷冷 0.32 M ショ糖溶液中でホモジナイズした後，900×g で10分間遠心し，その上清をさらに 11,500×g で20分間遠心した．その沈渣 (シナプトゾーム分画) を 50mM トリス塩酸緩衝液 (pH 7.6) に懸濁し，再度 11,500×g で20分遠心した．さらにその沈渣を緩衝液で再懸濁し，蛋白濃度を 3mg/ml に調整したものを TRH 受容体標品とした．蛋白は Lowry 法[27)]により定量した．

2．Displacement curve の作成

シナプトゾーム分画 0.5ml，バシトラシン (和光) 50μg/ml 添加トリス緩衝液 (pH 7.6) 0.3ml，非標識 TRH もしくはアナログ 0.1ml (最終濃度 10^{-10}～10^{-4} M)，および ^{3}H 標識 TRH (specific activity 55.6ci/mmol) (New England Nuclear，米国) 0.1ml (最終濃度6.5×10^{-9} M) を混じて氷水中で3時間インキュベートした．受容体結合型トレーサーと遊離型トレーサーの分離には Whatman GF/C (Whatman, Maidstone，英国) による吸引濾過法を用いた．測定は triplicate で，アロカ液体シンチレーションカウンター LSC-700 (アロカ，東京) を用いた．^{3}H 標識 TRH と受容体との結合は，非標識 TRH もしくは TRH アナログを加えない対照に対する放射活性の百分率で算出した．

IV．組織周辺灌流系による CA 放出量の定量

1．副腎周辺灌流法 (図2)

山田[28)]の方法に従い，ラットをエーテル麻酔下で開腹し，副腎を摘出，被膜を除去後細切した．その10～20mg を37°C温浴中のインキュベーションチャンバー (0.25ml) に入れ，95% O_2，5%CO_2 で飽和したソルビトール加乳酸リンゲル液 (大塚，東京) 0.25ml/分

de ; IC_{50}, concentration causing 50% inhibition ; NE, norepinephrine ; P.S., intraperitoneal injection of 25mg/kg pentobarbital sodium ; TH, tyrosine hydroxylase ; TRH, thyrotropin-releasing hormone ; TSH, thyrotropin ; 髄注，髄腔内注入 ; 生食，生理食塩水

の流速で灌流した．灌流液はあらかじめ 20μl の 6N 過塩素酸を加えた試験管に 5 分毎に経時的に採取し，そのまま電気化学的検出器 Coulochem 5100A (ESA，米国) 付き高速液体クロマトグラフィー (high performance liquid chromatography, HPLC) LC-5A (島津，京都) に注入し CA 含量を測定した．標準として等量の塩酸ノルエピネフリン (和光)，重酒石酸エピネフリン (Sigma，米国)，塩酸ドーパミン (Sigma)，ジヒドロキシベンジラミン (dihydroxybenzylamine, DHBA, Sigma) を各々 1ng/μl の濃度に 0.1N 過塩素酸で溶解し，そのうち 10μl を HPLC に注入した．標準試料の測定内変動は 5 %以内であった．

2．灌流副腎髄質からの CA 放出量の測定

灌流開始時より灌流液に含まれる CA 含量を測定し，CA 放出がほぼ一定となる 2 時間後より，各量の TRH，アナログ ($2.5\sim5.0\times10^{-7}$ moles) を含む灌流液で 5 分間刺激した．CA 含量の変化を負荷直前の CA 値に対する百分率で算出した．

3．視床下部周辺灌流法

ラットをエーテル麻酔下で断頭屠殺し，直ちに脳を取り出し，Glowinski ら[29]の方法により視床下部を切離した．そして厚さ 2mm 以下の 4 切片に分割し，37 ℃の温浴中のインキュベーションチャンバー (0.75 ml) に入れ，95% O_2, 5% CO_2 で飽和した Krebs-Ringer-bicarbonate 液 (118.5mM NaCl, 4.7mM KCl, 1.2mM KH_2PO_4, 1.2mM $MgSO_4\cdot7H_2O$, 2.5mM $CaCl_2$, 25mM $NaHCO_3$, pH7.4) で流速0.25ml/分で灌流した[30]．灌流液は 3 分毎にあらかじめ 10μl の 6N 過塩素酸を加えた試験管に採取した．灌流液中の CA 含量の定量は前述と同様に行った．

4．灌流視床下部からの CA 放出量の定量

灌流開始時より灌流液中の CA 含量を測定し，CA 放出量が一定となる30分後より，各量の TRH，アナログ ($1.5\sim7.5\times10^{-7}$ moles) を含む灌流液で 1 分間刺激した．CA 含量の変化を負荷直前の CA 値に対する百分率で算出した．

IV．TRH およびそのアナログの髄腔内投与による幼若および成熟ラットの体温の変化の測定

1．幼若ラットの場合

生後 3 週のウィスター系ラットの髄腔内に生食のみ，10^{-10} および 10^{-9} moles の TRH, HUB-94 もしくは HUB-95 を 20μl の生食に溶かしたものを，ストッパー付き26ゲージ注射針を用いて投与した．体温は腋窩で電子体温計 (オムロン，京都) を用いて，投与前，投与後30分および60分に測定し，各群の平均値で示した．

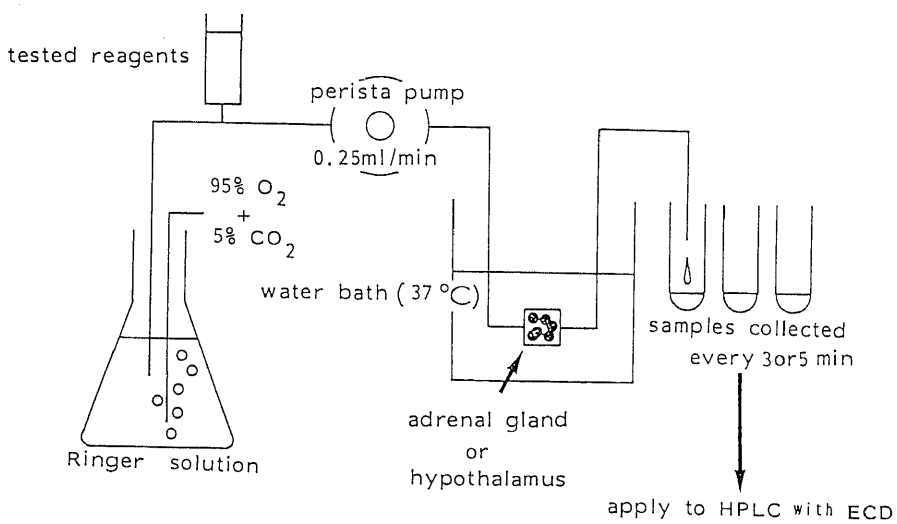

Fig. 2. Schematic diagram of tissue perifusion system. Ten to twenty mg of adrenal glands or hypothalamus are placed in a chamber containing 0.25ml lactate-Ringer solution (pH 6.8) or Krebs Ringer-bicarbonate solution (pH 7.4) respectively. Flow rate is controled at 0.25ml/min by perista pump and perfusate is fractionated in a test tube every 3 or 5 minutes intervals and analyzed by HPLC. HPLC, high performance liquid chromatography; ECD, electrochemical detector.

2．成熟ラットの場合

ウィスター系雄ラット (200～250g) をペントバルビタール麻酔下で頭皮を切開し，左頭頂骨中央部にハンドエンジン C-33 (ローヤル製作所，東京) を用いて硬膜まで達する直径 3mm の穴を開け，その後頭皮を縫合した．術後3日以上経過したラット (術後ラット) にペントバルビタール 25mg/kg を腹腔内投与し眠らせ，10分後に生食，3×10^{-8} moles の TRH, HUB-94 もしくは HUB-95 を前述の方法で頭頂骨の穴より投与した．電子体温計を肛門より 5cm 挿入し，ペントバルビタール投与時から5分毎にラット直腸温を測定した．

V．成熟ラットの脈拍，血圧の変動の測定

1．髄腔内投与の場合

術後ラットに前述の方法で，生食，3×10^{-8} moles の TRH, HUB-94 もしくは HUB-95 を髄注し，脈拍と血圧を測定した．脈拍と血圧はラット尾動脈血圧心拍数記録装置 PS-100 (理研開発，横浜) を用い，37°C に加温した保定器内拘束下で tail cuff 法により測定した．脈拍および血圧は5回の測定の平均をとり，その変化を投与直前のそれぞれの値に対する百分率で示した．

2．静脈内投与の場合

成熟ラットの尾静脈より生食，1×10^{-7} moles の TRH, HUB-94 もしくは HUB-95 を投与し，前述の方法により脈拍および血圧を測定した．

VI．Shaking response の測定

術後ラットに前述の方法で，生食，3×10^{-8} moles の TRH, HUB-94 もしくは HUB-95 を髄注し，投与後10分間の shaking response の回数を測定した．shaking response は Wei ら[31]の定義に従いラットの頭部，肩から体幹にかけての急速な反復性の回転運動とした．

VII．ペントバルビタール麻酔下での sleeping time の測定

術後ラットにペントバルビタール 40mg/kg を腹腔内投与し，立ち直り反射が消失後，直ちに生食，3×10^{-8} moles の TRH, HUB-94 もしくは HUB-95 を髄注した．立ち直り反射が消失してから再び出現するまでの時間を sleeping time とした．

VIII．TRH およびそのアナログによる幼若ラットの血漿カテコールアミン変動の測定

1．薬剤投与および検体採取

無拘束，無麻酔の幼若ラットに，前述の方法で生食，3×10^{-9} moles の TRH, HUB-94 もしくは HUB-95 を髄注した．15分後に断頭屠殺しエチレンジアミン四酢酸 (ethylene diamine tetra acetic acid, EDTA) (和光) 入りのマイクロチューブに血液を採取し，遠心分離し上清を定量に用いた．

2．血漿カテコールアミン定量

血漿0.3ml に 1M トリス塩酸緩衝液 (pH 8.7) 1ml，活性アルミナ (和光) 10mg，内部標準として DHBA 300pg を加え，30分間ゆっくり振盪混和した．アルミナ沈降後上清を吸引除去し，沈殿のアルミナを 3ml の蒸留水で3回洗浄したのち，アルミナに吸着された CA を 0.1N 過塩素酸 50μl で溶出，うち 30 μl を HPLC に注入しその分離パターンにより CA を定量した．既知量の CA の回収率は 42±10% であった．

IX．7日間連日髄注による組織 CA 含量，血中 T_4 およびチロジン水酸化酵素活性の測定

1．薬剤投与および検体採取

生後2週の幼若ラットの髄腔内に生食，10^{-10}, 10^{-9} moles の TRH, HUB-94 もしくは HUB-95 を7日間連日投与した．8日目にエーテル麻酔下で断頭屠殺し前脳＋中脳，小脳＋脳幹，心，腎，副腎および褐色脂肪を摘出した．その各半量を 0.1N 過塩素酸 1～2ml でホモジナイズし，遠心後上清を CA 測定用検体とした．血中 T_4 の測定[32]は，まず血液を濾紙に吸着させ，乾燥後直径 3mm のペーパーパンチで打ち抜き血中 T_4 測定用検体とした．残り半量の脳および副腎を0.25 M 蔗糖液でホモジナイズし，遠心後脳，副腎の上清のチロジン水酸化酵素 (tyrosine hydroxylase, TH) 活性を以下に述べる方法で測定した．

2．組織 CA 含量の測定

血漿 CA 含量とほぼ同様に CA 測定用検体中に含まれる CA を活性アルミナに吸着させ，その後0.1N 過塩素酸で溶出し HPLC に注入し，その分離パターンより CA を定量した．

3．血中 T_4 測定

二抗体法によるクレチン T_4 ラジオイムノアッセイキット (栄研，東京) を用いた．放射活性の測定は，アロカオートウエルガンマーカウンター ARC-500 (アロカ) を用いた．

4．脳および副腎 TH 活性の測定

Nagatsu ら[33]の方法により検体 200μl と 1M 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 6.0) 100μl, 1mM L-チロジン (和光) 150μl, 10mM 硫酸第一鉄アンモニウム (和光) 10μl, 1M 2メルカプトエタノール (和光) に溶解した 10mM 6-メチル-5,6,7,8-テトラハイドロプテリン (Sigma) 50μl を加え，37°Cで20分間インキュベートした．その後氷冷0.5M過塩素酸 3.0ml を加え，10分

後に氷冷 1M 炭酸カリウム (和光) 1.8ml を加え遠心した．上清を二重カラム (上部，アンバーライト CG-50 pH 6.1，0.5ml；下部，活性アルミナ0.5g) にかけ 5ml の蒸留水で 5 回洗浄した．活性アルミナに吸着した L-ドーパを0.5M酢酸 1.0ml に溶出し，それを Johnson ら[34]の方法により測定した．TH 活性は産生された L-ドーパ量 (nmol/hr/mg protein) で示した．

X．統計学的処理

得られた数値はすべて平均値±標準誤差 (mean±S.E.M.) で示した．多群間の平均値の差の検定には一元配置分散分析後 Scheffé または Dunnett の多重比較法を用いた．$p<0.05$の場合を有意差ありと判定した．

成　　績

I．TRH, HUB-94 および HUB-95 の TRH 受容体への親和性 (図 3)

TRH 受容体への TRH アナログの親和性をみるために，ラット脳より調整したシナプトゾームを用いて TRH およびアナログ HUB-94 と HUB-95 の ^{3}H 標識 TRH (^{3}H-TRH) に対する displacement curve を作成した．TRH および HUB-94 は濃度依存性に ^{3}H-TRH と TRH 受容体との結合を阻害し，10^{-4} M における非特異的結合は両者とも対照の41%であった．それに対して HUB-95 では 10^{-8} M では対照の115%の最大結合を示し，以後濃度依存性に結合を阻害した．10^{-4} M での結合は対照の57%であった．^{3}H-TRH と TRH 受容体の結合を50%阻害する濃度である IC_{50} はそれぞれ TRH，1.9×10^{-8} M, HUB-94，4.0×10^{-8} Mで HUB-95 では1.8×10^{-5} M であった．

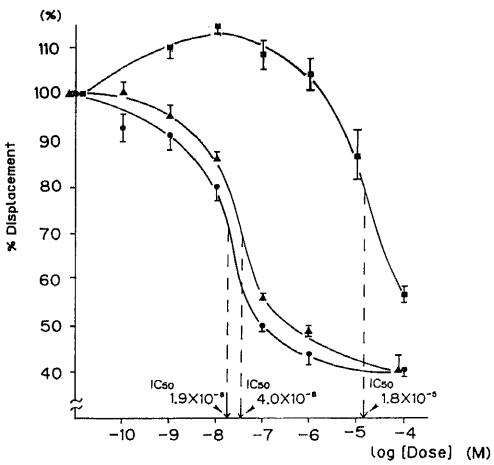

Fig. 3. Displacement curve of ^{3}H-TRH bound to synaptosomal fraction of rat brain by synthetic TRH or TRH-analogues, HUB-94 and HUB-95. Each point represents mean±S.E.M. of three independent triplicate determinations. IC_{50}, concentration of TRH or analogues required for 50% displacement of bound ^{3}H-TRH；●, TRH；▲, HUB-94；■, HUB-95.

II．周辺灌流系における TRH HUB-94 および HUB-95 の CA 放出能

1．灌流副腎髄質における CA 放出能 (図4A)

副腎 20mg の灌流では，灌流開始直後の灌流液中の NE は 30±2ng/ml (n=3), E は 137±19ng/ml と高値を呈したが，漸次減少し 3 時間後には NE は 11±1ng/ml, E は 36±3ng/ml となった．以後 1 時間はほぼ一定の CA 含量を呈したため，実験は灌流開始

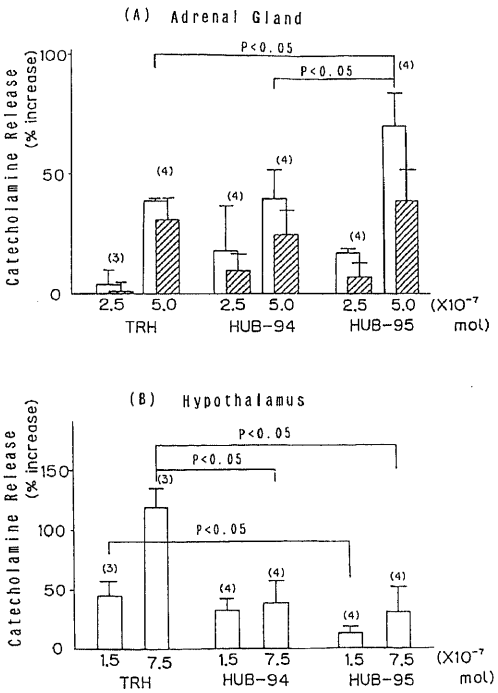

Fig. 4. Catecholamine release from perifused rat adrenal gland (A) and hypothalamus (B) by the addition of TRH, HUB-94 or HUB-95. TRH, HUB-94 and HUB-95 were used at the concentration of 2.5 or 5.0×10^{-7}moles in (A) and 1.5 or 7.5×10^{-7}moles in (B). Vertical bars mean deviations (±S.E.M.) within experiments and numbers in parenthesis show numbers of experiments. Statistical significances are shown as follows；$p<0.05$ by ANOVA followed by Scheffé's multiple comparison procedure. □, norepinephrine；▨, epinephrine.

後3時間から4時間のあいだに行った．TRH, HUB-94 もしくは HUB-95 をそれぞれ2.5と5.0×10^{-7} moles 負荷すると用量依存性に NE もしくは E の放出が増加した．また HUB-95 では5.0×10^{-7} moles 負荷で NE の放出は TRH および HUB-94 より有意に (共に $p<0.05$) 増大した．

2．灌流視床下部における CA 放出能 (図4B)

視床下部 300mg の灌流では，灌流直後の灌流液中の NE は3.2±0.1ng/ml (n=3) であったが，20分後には1.8±0.1ng/ml にまで減少し，その後30分間はほぼ一定の CA 含量を呈したため，実験は30分から50分の間に行った．TRH もしくはアナログ1.5と7.5×10^{-7} moles の負荷に対する CA の増加率は，TRH, HUB-94 および HUB-95 でも用量依存性に増加した．また TRH は7.5×10^{-7} moles の負荷で HUB-94 および HUB-95 より有意に ($p<0.05$)，1.5×10^{-7} moles の負荷で HUB-95 より有意に ($p<0.05$) NE 放出が増大した．

Ⅲ．TRH, HUB-94 および HUB-95 のラット体温への影響

1．幼若ラットの体温変化 (図**5A**)

幼若ラットに HUB-94 および HUB-95 10^{-10} moles 投与しても，30分および60分後に有意な体温の変化を認めなかった．それに対して TRH 10^{-10} moles, HUB-94 10^{-9} moles 投与では，投与前より投与30分後の体温は有意に上昇［各々前，36.6±0.1°C；30分後，36.9±0.1°C ($p<0.05$)：前，36.3±0.2°C；30分後，37.0±0.1°C ($p<0.05$)］した．HUB-95 10^{-9} moles 投与では，投与前より投与後30分，60分の両方で体温は有意に上昇［前，36.6±0.1°C；30分，37.4±0.1°C ($p<0.05$)：60分，37.0±0.1°C ($p<0.05$)］した．

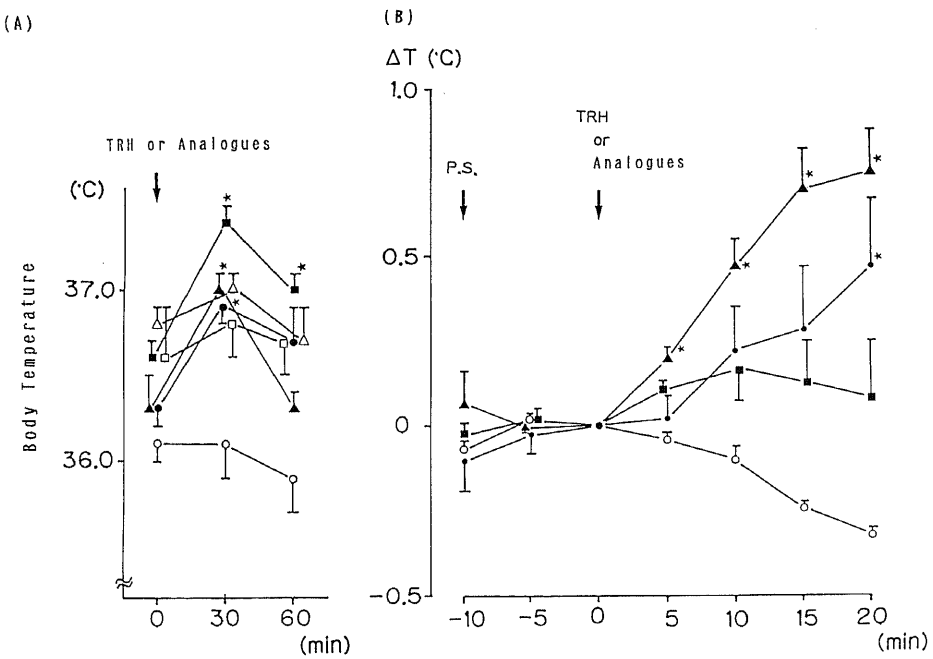

Fig. 5. Effects of intrathecal administration of TRH, HUB-94 or HUB-95 on the body temperature in young (A) and adult rats (B). (A) ●, 10^{-10} moles TRH (n=5); △, 10^{-10} moles HUB-94 (n=4); ▲, 10^{-9} moles HUB-94 (n=6); □, 10^{-10} moles HUB-95 (n=4); ■, 10^{-9} moles HUB-95 (n=6); ○, control (n=5). Vertical bar, mean±S.E.M.; ★, $p<0.05$ vs temperature at 0 minutes by ANOVA followed by Dunnett's multiple comparison procedure. (B) ●, 3×10^{-8} moles TRH (n=7); ▲, 3×10^{-8} moles HUB-94 (n=7); ■, 3×10^{-8} moles HUB-95 (n=5); ○, control (n=5). P.S., Intraperitoneal injection of 25mg/kg pentobarbital sodium 10 minutes before the treatment. Vertical bar, mean±S.E.M; ★, $p<0.05$ vs control by ANOVA followed by Scheffé's multiple comparison procedure.

2．成熟ラットの体温変化への影響 (図5B)

対照群では生食投与時より20分後まで体温変化 (ΔT) は常に負の値をとり，漸次低下した．実験群ではΔT は常に正で，TRH, HUB-94 の両群では漸増した．20分後のΔT は対照群－0.32±0.02°Cに比してTRH および HUB-94 で有意に高値 [TRH, 0.47±0.20 ($p<0.05$); HUB-94, 0.75±0.13 ($p<0.05$)] を示した．また HUB-95 (0.08±0.17) も増加傾向を示した．

Ⅳ．TRH およびアナログのラットの脈拍，血圧への影響

1．髄腔内投与による影響

脈拍 (図6A) は対照群に比べ TRH および HUB-94 投与では．10分後より有意に増加し，それは20分後も持続した．また HUB-95 では15分後より増加傾向を示した．血圧 (図6B) は HUB-94 のみ投与10分後より対照群に比べ有意に上昇し20分後も持続した．TRH は5分後より上昇傾向を示したが，HUB-95 投与では変化しなかった．

2．静脈内投与による影響

脈拍 (図7A) は HUB-95 のみ10分後より対照群に比べ有意に上昇し20分後も持続した．TRH HUB-94 では不変であった．血圧 (図7B) は実験群のいずれも対照群と有意な変化を示さなかった．

Ⅴ．Shaking response に対する影響 (図8)

TRH またはそのアナログ投与後10分間の shaking response の回数は，対照群0.8±0.7回に対して，TRH, HUB-94 で有意に増加 (各々50.7±9.6回，$p<0.05$；47.5±8.7回，$p<0.05$) した．HUB-95 は2.8±2.5回で対照群と有意差がなかった．

Ⅵ．ペントバルビタール麻酔下での TRH およびそのアナログの sleeping time への影響 (図9)

ペントバルビタールを用い 40mg/kg 腹腔内投与5分以内にすべての群で立ち直り反射が消失した．Sleeping time は対照群60.9±4.4分に対し，HUB-94 および HUB-95 で有意に短縮 (各々36.5±5.1分，$p<0.05$；42.3±4.7分，$p<0.05$)した．TRH では54.2±3.8分で対照群との有意差を認めなかった．

Ⅶ．血漿 CA に対する影響 (図10)

血漿 NE は対照群6.8±0.6ng/ml に対し，

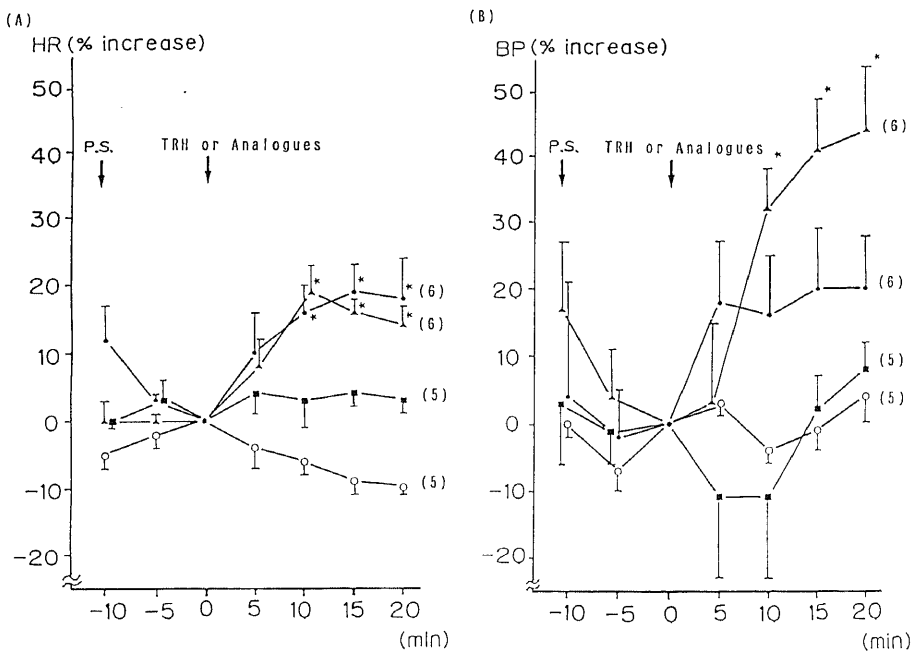

Fig. 6. Effects of intrathecal administration of TRH, HUB-94 or HUB-95 on heart rate (A) and blood pressure (B) in adult rats. P.S., pentobarbital sodium injection as same as that in Fig. 5; ●, TRH; ▲, HUB-94; ■, HUB-95; ○, control; HR, heart rate; BP, blood pressure. Other symbols and concentration of the drugs are the same with Fig. 5 (B). Numbers in parenthesis show numbers of rats.

HUB-95 で有意に上昇 (12.5±0.7ng/ml, $p<0.05$) したが TRH HUB-94 では変化しなかった．血漿 E は対照群5.9±1.4ng/ml に対し，HUB-95 で最も上昇 (14.8±3.1ng/ml) し，また HUB-94 および TRH でも上昇傾向 (各々12.2±1.7ng/ml, 11.4±4.0ng/ml) を示した．血漿 DA は対照群3.3±0.9ng/ml に対して HUB-95 で上昇傾向 (7.2±2.6ng/ml) を認めた．

Ⅷ．TRH およびそのアナログの7日間連日髄注による組織 CA 含量，血中T_4，TH 活性におよぼす影響

1．脳内 CA 含量 (表1)

前脳＋中脳の NE 含量は対照群に比べ HUB-95 (10^{-9} moles) で有意に低下 ($p<0.05$) し，TRH (10^{-10} moles), HUB-94 (10^{-9} moles) でも低下傾向を認めた．DA 含量は TRH(10^{-10} moles) および HUB-95 (10^{-10} moles) で上昇傾向を認めた．小脳＋脳幹で NE 含量は HUB-94 (10^{-10} moles) で上昇傾向，DA 含量は HUB-94 (10^{-9} moles) HUB-95 (10^{-10} moles) で低下傾向を示した．

2．副腎，心，褐色脂肪および腎の CA 含量 (表2)

副腎 NE 含量では TRH (10^{-10} moles), HUB-94 (10^{-10} moles) および HUB-95 (10^{-9} moles) で対照群に比べ低下傾向を示した．E 含量は HUB-94 (10^{-9}, 10^{-10} moles) および HUB-95 (10^{-9} moles) で低下傾向を示した．心の NE 含量は HUB-94 (10^{-10} moles), HUB-95 (10^{-9}, 10^{-10} moles) で低下傾向を示した．褐色脂肪ではすべてのアナログ投与群で NE 含量の上昇傾向を示した．腎では NE 含量が HUB-94 (10^{-10} moles), HUB-95 (10^{-9}, 10^{-10} moles) で有意に低下 (三群とも $p<0.05$) し，HUB-94 (10^{-9} moles) でも低下傾向を示した．

3．血中 T_4 (表3)

TRH およびアナログの甲状腺ホルモンに対する作用をみるために血中 T_4 を測定した．対照群に対していずれの実験群も有意差を認めなかった．

4．脳および副腎 TH 活性 (表4)

TRH およびアナログが CA 合成におよぼす影響をみるために，CA 合成系の律速段階酵素である TH 活性を測定した．前脳＋中脳では TRH (10^{-9} moles) 投与で対照群に対して TH 活性の増加傾向を認めた．副腎では HUB-94 (10^{-9} moles) 投与で TH 活性の増加

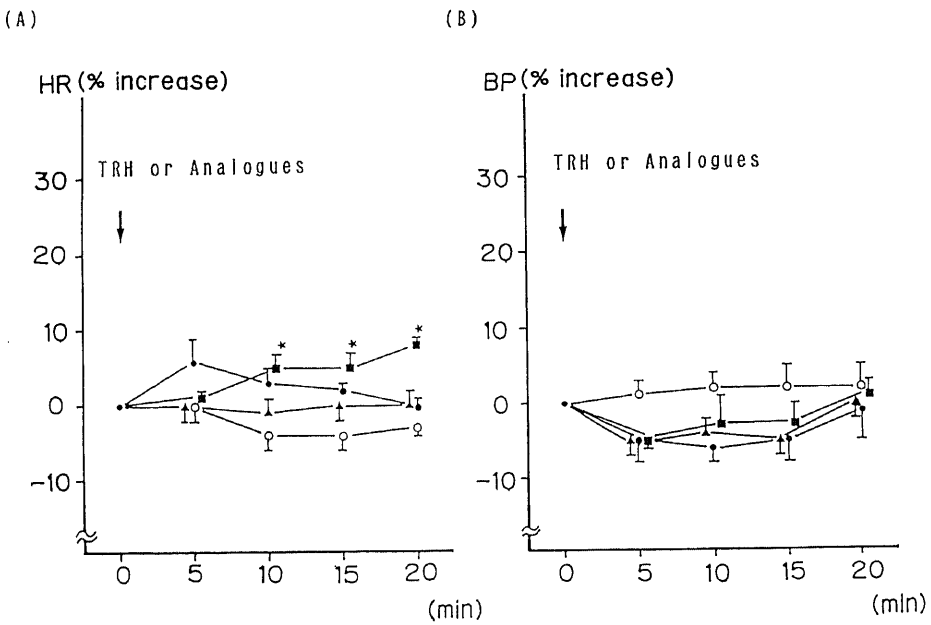

Fig. 7. Effects of intravenous injection of 1×10^{-7} moles TRH, HUB-94 or HUB-95 on heart rate (A) and blood pressure (B) in adult rats. ●, TRH (n=5); ▲, HUB-94 (n=5); ■, HUB-95 (n=5); ○, control (n=5). Statistical significances are shown as follows; ★, $p<0.05$ vs control by ANOVA followed by Dunnett's multiple comparison procedure. Other symbols are the same with Fig. 6.

傾向を認めた．

考　　察

TRH アナログの研究により，一般に TRH の1位のピログルタミン酸と3位のプロリナミドは中枢神経作用の発現に[35]，2位のヒスチジン基は下垂体 TRH 受容体への結合に働き TSH 分泌に関与すると考えられている[35)36]．今回著者はまず TRH アナログの構造の差が TRH 受容体への親和性や，中枢神経作用にいかに影響するかを二種類の TRH アナログ，HUB-94 と HUB-95 を用いて検討した．HUB-94 は1位のピログルタミン酸をピロホモグルタミン酸に置換することにより，ホルモン作用は TRH と同程度で，中枢神経作用としてレゼルピン処理ラットにおいてメタゾラミドの抗痙攣効果を TRH の4倍強く回復させると報告されている[25]．また HUB-95 は HUB-94 の2位のヒスチジン基をノルバリンに置換したもので，これと類似する TRH のヒスチジン基をノルバリンに置換したアナログ pyroglutamyl-norvalinyl-prolinamide はホルモン作用をまったく持たず，中枢神経作用としてハロペリドールの cataleptic effect を TRH の11倍強く抑制すると報告されている[35]．従って HUB-95 はホルモン作用を持たず，HUB-94 よりさらに強力な中枢神経作用を有することが期待される．

アナログとラット脳シナプトゾーム分画の TRH 受容体との相対的親和性は IC_{50} で表すと，HUB-94, HUB-95はそれぞれ TRH のほぼ50%と0.1%であった．受容体親和性と TSH 分泌作用がほぼ比例することより[37]，HUB-94 は TRH に近いホルモン作用を持ち，HUB-95 は非常に弱いホルモン作用しか持たない事が推察され，先の知見を支持している．

本研究では，この様なアナログを用いて体温，脈拍，血圧，shaking response およびペントバルビタール麻酔下の sleeping time 等の生物学的活性を比較検

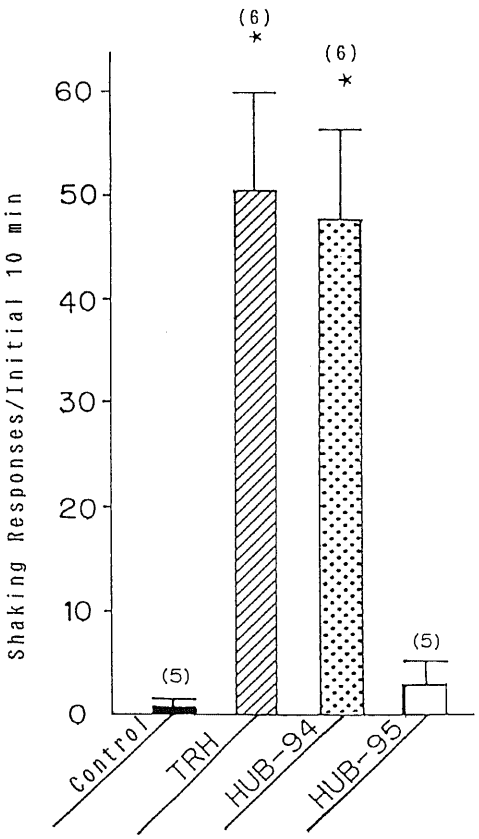

Fig. 8. Effects of intrathecal administration of 3×10^{-8} moles TRH, HUB-94 or HUB-95 on head-shaking response in adult rats. Head-shaking response was measured the number of the frequencies for ten minutes. Number in parenthesis, number of rats. ★, $p<0.05$ vs control by ANOVA followed by Scheffé's multiple comparison procedure.

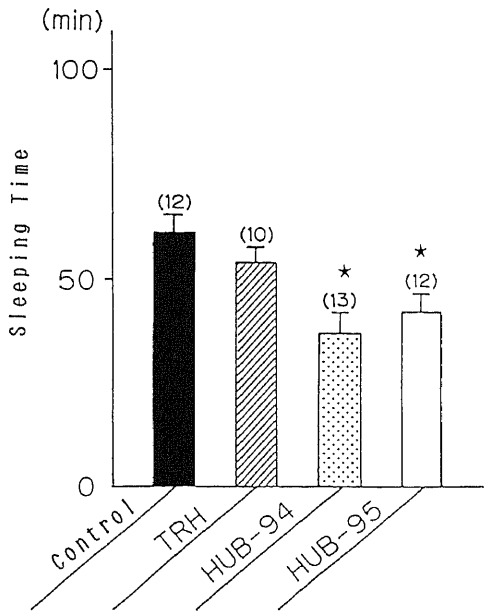

Fig. 9. Effects of intrathecal administration of 3×10^{-8} moles TRH, HUB-94 or HUB-95 on pentobarbital-induced sleeping time in adult rats. Forty mg of pentobarbital/kg body weight was used. Number in parenthesis, number of rats. ★, $p<0.05$ vs control by ANOVA followed by Scheffé's multiple comparison procedure.

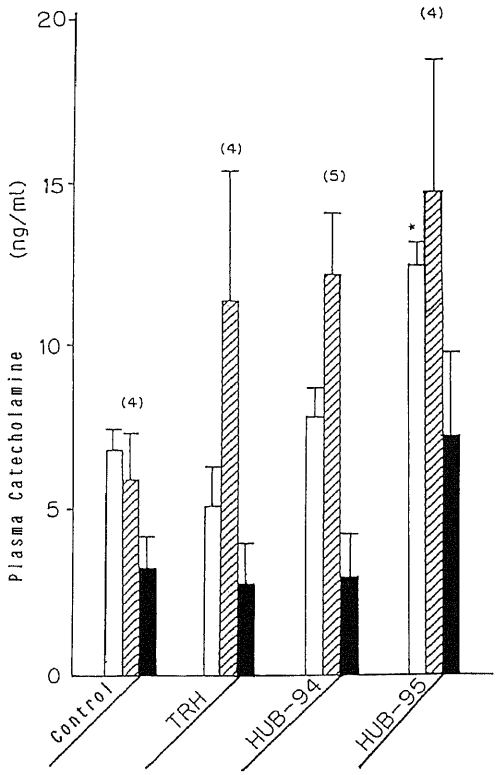

Fig. 10. Effects of intrathecal administration of 1×10^{-9} moles TRH, HUB-94 or HUB-95 on plasma catecholamine levels in young rats. Plasme CA were determined 15 minutes after admnistration of the drugs. □, norepinephrine; ▨, epinephrine; ■, dopamine; Vertical bar, ±S.E.M.; Number in parenthesis, number of rats. ★, $p<0.05$ vs control by ANOVA followed by Scheffé's multiple comparison procedure.

討した．TRH による体温上昇作用は視床下部，交感神経，副腎および褐色脂肪における NE, E の turnover の亢進[13)~15)]，すなわち non-shivering thermogenesis によるとされている[38)]．著者の成績では TRH, HUB-94 および HUB-95 のいずれにおいても成熟および幼若ラットで体温上昇作用を認めたが，幼若ラットでは TRH が，成熟ラットでは HUB-94 が最も強い作用を示した．この理由としてペントバルビタール麻酔の有無や，TRH およびアナログの使用量の違いなどの条件の差も考えられるが，むしろ幼若ラットと成熟ラットの体温調節における本質的な違いによるものが大きいと考えられる．すなわち幼若ラットの体温調節には褐色脂肪による non-shivering thermogenesis が重要である[38)]のに対して，成熟ラットでは shaking response と関係があるとされる shivering thermogenesis[31)]がより関与していると思われる．それは shaking response の中枢である視床下部後核が shivering thermogenesis の中枢である脚間核と近接しており，脚間核からの神経繊維により調節を受けているからである[39)]．実際，成熟ラットでは明らかに認められた shaking response は幼若ラットではほとんど認められなかった．

人，動物で TRH を静脈内もしくは髄腔内投与した時，脈拍は上昇[12)16)]または不変[40)]，血圧は上昇する[41)42)]などと報告されている．これらの変化に血中 CA の上昇をともなうとするもの[41)42)]と不変であったとするもの[40)]など様々である．脈拍，血圧上昇の機序として，血中 CA 上昇を認めるものでもその程度が血圧上昇を起こす程では無いことや[42)]，α，β，ブロッカーやレゼルピンでも昇圧が完全にブロックされないことより[10)]，交感神経系の関与はむしろ少なく，中枢を介した直接的な心血管系への作用が考えられている．著者

Table 1. Brain catecholamine contents after intrathecal administration of TRH, HUB-94 or HUB-95 for 1 week in young rats

Group		n	Fore brain+Mid brain NE (ng/g-tissue)	Fore brain+Mid brain DA (ng/g-tissue)	Cerebellum+Brainstem NE (ng/g-tissue)	Cerebellum+Brainstem DA (ng/g-tissue)
Control		5	109±5	315± 9	143± 3	54±14
TRH	10^{-10} a)	5	91±3	388±23	147± 4	53±14
HUB-94	10^{-9}	6	91±4	352±22	161±11	21± 3
	10^{-10}	4	100±4	360±27	163± 9	29± 9
HUB-95	10^{-9}	6	74±2*	294±12	146± 5	26± 6
	10^{-10}	4	94±7	406±48	125±12	11± 1

Values are mean±S.E.M. * $p<0.05$ vs control by ANOVA followed by Scheffé's multiple comparison. a), daily dose in moles; n, number of rats tested.

Table 2. Catecholamine contents in the adrenal glands, heart, brown adipose tissue (BAT) and kidney after intrathecal administration of TRH, HUB-94 or HUB-95 for 1 week in young rats

Group		n	Adrenal gland NE	Adrenal gland E	Heart NE	BAT NE	Kidney NE
			(μg/g-tissue)		(ng/g-tissue)		(ng/g-tissue)
Control		5	92±11	214±17	304±32	832± 42	211±18
TRH	10^{-10} a)	5	61± 7	151±29	284±27	860±140	178±15
HUB-94	10^{-9}	6	73± 5	155±13	262± 9	762± 97	134±19
	10^{-10}	4	58± 7	123±17	193±26	1,050±148	108±12*
HUB-95	10^{-9}	6	66± 2	141± 4	225±21	973± 33	92± 4*
	10^{-10}	4	71±14	151±36	193±23	915± 94	90±22*

Values are mean±S.E.M. *$p<0.05$ vs control by ANOVA followed by Scheffé's multiple comparison. a), daily dose in moles; n, number of rats tested

Table 3. Serum thyroxine (T_4) levels after intrathecal administration of TRH, HUB-94 or HUB-95 for 1 week in young rats

Group	Dose (moles/day)	(n)	Serum T_4 (μg/dl)
Control		5	1.8±0.2
TRH	10^{-10}	5	1.6±0.2
HUB-94	10^{-9}	6	1.6±0.2
	10^{-10}	4	1.4±0.1
HUB-95	10^{-9}	6	1.9±0.1
	10^{-10}	4	1.8±0.3

Values are mean±S.E.M. (n), number of rats tested.

の成績では，脈拍は TRH, HUB-94 の静脈内投与で対照群に比べ有意に変化しなかったが，髄腔内投与で有意に上昇した．また血圧も静脈内投与では実験群のいずれも対照群に比べ有意な変化を認めなかったのに対し，髄腔内投与では HUB-94 で有意に上昇，TRH で増加傾向を示した．これらの成績はいずれも TRH およびそのアナログの脈拍，血圧に対する作用が中枢神経を介することを支持している．ところが HUB-95 投与後の脈拍の変化では，この群のみ静脈内投与で対照群に比べ，有意にしかも髄腔内投与より早期に上昇した．これは HUB-95 の作用部位が交感神経や副腎などの末梢にも存在する可能性を示唆している．

shaking response の発現は TRH もしくはアナログの TSH 分泌作用と相関すると言われ[43]，しかもこの反応が TSH や甲状腺ホルモンの投与によって誘発されないことより，その機序として TRH 受容体を介する何らかの神経物質の関与が考えられている．著者の成績も TRH 受容体への親和性が高い TRH, HUB-94 において対照群よりも有意に反応が増大し，親和性の低い HUB-95 では有意差が無かったことは先の知見を支持している．また成熟ラットで TRH, HUB-94 の体温上昇作用が HUB-95 より高度でしかも長時間持続したことは，shaking response と shivering thermogenesis との関連を支持する．

TRH はペントバルビタール麻酔下での sleeping time を短縮するが，Breese[44]はこれがアトロピンの髄腔内投与によりブロックされると報告し，また Yarbrough[45]はアセチルコリンの iontophoresis により大脳皮質の興奮性が増大すると報告した．さらに Schmidt[46]はペントバルビタールによって抑制された海馬のコリン活性が TRH により回復することを示した．これらの結果から TRH の睡眠短縮作用は，TRH による中隔－海馬系のアセチルコリン作動性ニューロンの興奮性の増大によるとされている[22]．著者の成績では HUB-94, HUB-95 の両アナログ共に対照群に比べ有意な sleeping time の短縮を認めた．また両アナログが共に sleeping time の短縮において TRH より強い作用を示したことは，体温，脈拍，血圧および shaking response における TRH とアナログの相対的強度とは明らかに異なっており，この作用の発現にこれまでと異なる神経物質が関与していることを示唆している．

この様な TRH の生物学的活性の発現には NE[13)~15)47)], DA[4)~6)], セロトニン[7)24)] やアセチルコリン[22)23)] などの神経伝達物質が関与しており，なかでも NE や DA などのモノアミン系が最も重要な役割を担っている．in vitro で Bennett ら[48]は視床下部，中隔，側坐核のスライスの灌流により TRH が NE と

DA の放出を濃度依存性に増大させることを報告した．in vivo での TRH の急性投与は，α-メチルパラタイロシン (α-methyl-p-tyrosine) で前処置したラットの脳内の CA 含量を対照に比べて 2 時間から 3 時間後に有意に低下させることより[49)~51)]，CA 放出を促進させ turnover を亢進するとされている．また Brown[47)]はラット側脳室に TRH 10μg を投与し，10 分後に血中 NE, E の上昇，それに伴う血糖の上昇を認め，さらに副腎摘除ラットでは血糖の上昇が認められないことより E は中枢を介して副腎髄質より放出されるとした．TRH の慢性投与による作用は大脳皮質の CA 含量において，DA は上昇[49)52)53)]，NE は不変[49)52)53)]，それらの代謝産物である homovalinic acid (HVA), 3-methoxy-4-hydroxyphenylethylene glycol (MOPEG) はともに上昇[52)]，TH 活性は脳幹で上昇し[52)53)]，^{3}H標識 NE のuptake は不変であることより[49)52)]，CAの放出および代謝を促進するとされている．

著者は視床下部および副腎の周辺灌流系を用いて TRH とアナログの CA 放出能を in vitro で検討した．その結果 TRH および両アナログとも視床下部，副腎で容量依存性に CA 放出を促進し，視床下部では TRH が，副腎では HUB-95 がそれぞれ最も強い作用を有した．さらに著者は in vivo で TRH およびアナログの急性投与によるラット血中 CA の変化を検討した．HUB-95 は NE, E とも対照群に比べ最も上昇し，HUB-94 および TRH は E の上昇傾向を認めた．この上昇した血中 E は副腎髄質由来と考えられ，副腎灌流実験の成績と良く一致する．

次に慢性投与による影響を検討するために幼若ラットに 7 日間 TRH およびアナログを髄腔内投与し，脳および末梢組織での CA 含量，TH 活性を測定した．脳では前脳＋中脳で TH 活性の増加傾向を認めた TRH において DA 含量が増加傾向を示し，NE 含量は 10^{-9} moles の HUB-95 で有意に低下し，10^{-10} moles の TRH および10^{-9} moles の HUB-94 で低下傾向を示した．これより TRH 前脳＋中脳において両アナログに比べ強い CA 産生能を有し，また NE 含量の低下は NE の産生に比べ放出がより促進されたためと考えられる．この成績は先の知見と多少異なるが，それは投与期間の違いによると思われる．Agarwal ら[53)]がラットに TRH 4mg/kg を 1 日 2 回ずつ腹腔内に連日投与し，TH 活性と CA 含量を調べた報告では，5 日目では TH 活性の増加を認めず10日目で有意に増加している．また NE 含量も 5 日目では前値より低下傾向を示すが10日目には回復している．これは TRH の慢性投与で CA の放出は早期より促進されるが，合成系の促進はそれより遅れることを意味している．著者の 7 日間の投与期間は中間であったため TH 活性の増加がいまだ充分でなかったと考えられる．小脳＋脳幹では DA 含量は両アナログで TRH に比べ低下傾向を示しており，NE 含量がむしろ増加していることにより，アナログではドーパミン-β-ハイドロキシラーゼ活性の亢進もしくは NE より DA の放出を促進しているのかもしれない．

副腎，腎，心，および褐色脂肪などの末梢組織の CA 含量に対する TRH アナログの効果では，褐色脂肪を除いてすべての実験群で NE または E 含量が有意に低下もしくは低下傾向を示した．また副腎の TH 活性は HUB-94 で増加傾向を示した．この機序として TRH が直接働くとは投与量より考え難い．TRH 投与による甲状腺ホルモン上昇の影響は考え得るが，同時に測定した血中 T_4 は各群で有意差を認めなかった．この作用が中枢より各臓器に分布する交感神経を介するものか否かは，さらに検討を必要とする．ただ褐色脂肪でのみ両アナログで NE 含量が増加傾向を示したことは幼若ラットの non-shivering therm-

Table 4. Tissue tyrosine hydroxylase activity after intrathecal administration of TRH, HUB-94 or HUB-95 for 1 week in young rats

Group	Dose (moles/day)	(n)	TH activity (n mol dopa/hr/mg prot.) Fore brain＋Mid brain	Adrenal gland
Control		9	1.4±0.1	21.2±1.4
TRH	10^{-9}	8	1.7±0.1	23.8±2.7
HUB-94	10^{-9}	9	1.4±0.2	31.1±3.7
HUB-95	10^{-9}	8	1.8±0.2	26.4±3.3

Values are mean±S.E.M. (n), number of rats tested.

ogenesis との関係から興味深い知見であり，両者の体温上昇作用が交感神経 NE 分泌を介していることを支持する．

異なる受容体結合能を持つ TRH アナログ HUB-94と HUB-95 は，共に TRH 様の中枢作用を持つが，TRH と比べ HUB-94 は体温，血圧上昇作用が強く，逆に HUB-95 は shaking response を初め，体温，脈拍，血圧いずれの上昇作用も弱かった．しかし HUB-95 は静脈内投与による脈拍上昇や in vitro で副腎からの CA 放出作用が強かった．以上の結果から考えて TRH アナログ HUB-94 はより中枢性に，HUB-95 はより末梢性に強い TRH 様作用を有することが分かった．そして TRH およびアナログは中枢および末梢での CA の産生や放出を促進することにより，これらの作用の発現に関与していることが示唆された．しかしその作用機序はさらに複雑で，その他の神経伝達物質も関与していると思われる．この様な TRH アナログは TRH の作用機序解明のための基礎的研究への利用はもとより，将来意識障害やショックの治療などへの臨床応用も期待される．

結　　論

1．TRH アナログ HUB-94 は TRH に類似した TRH 受容体への親和性を示したが，HUB-95 の親和性はそれより著しく低かった．従ってこの TRH 受容体への結合には，ヒスチジン残基が重要であると考えられた．

2．HUB-94 は髄腔内投与で TRH より強い体温，血圧上昇作用を有した．Shaking response に対する作用や脈拍上昇作用は同等であった．

3．HUB-95 は髄腔内投与で TRH より弱い体温，脈拍，血圧上昇作用および Shaking response に対する作用を有した．それに対し静脈内投与では TRH より強い脈拍上昇作用を有した．

4．HUB-94 HUB-95 の両アナログともペントバルビタール麻酔下の sleeping time 短縮作用は TRH より強かった．

5．TRH および HUB-94, HUB-95 は，in vitro で脳および副腎からの CA 放出を促進し，その作用は脳では TRH が，副腎では HUB-95 が最も強かった．

6．髄腔内投与後の血漿 CA は，HUB-95 で NE, E とも最も上昇，HUB-94 および TRH では E の上昇傾向を認めた．

7．TRH および HUB-94 HUB-95 の慢性投与は，in vivo で脳および副腎の NE 含量を低下させ,CA 産生は脳では TRH で，副腎では HUB-94 で最も亢進した．

以上の結果から，TRH アナログ HUB-94 はより中枢性に，HUB-95 はより末梢性に強い TRH 様作用を有することが分かった．また，この作用の発現には中枢もしくは末梢での CA turnover の亢進が関与していることが示唆された．

謝　　辞

稿を終えるにあたり，御指導と御校閲を賜りました谷口昂教授に深謝致します．また終始直接御指導，御鞭撻頂いた佐藤保助教授はじめ，研究に御協力頂きました小児科内分泌グループならびに教室員の皆様に感謝致します．最後に本研究のために貴重な薬剤を提供して頂きました北陸大学橋本教授ならびに佐倉助教授に心から御礼申し上げます．

なお，本論文の要旨は 8th International Congress of Endocrinology (Kyoto, 1988) において発表した．

文　　献

1） **Winokur, A. & Utiger, R. D.:** Thyrotropin--releasing hormone: Regional distribution in rat brain. Science, **185,** 265-267 (1974).

2） **Brownstein, M. J., Palkovits, M., Saavedra, J. M., Bassiri, R. M. & Utiger, R. D.:** Thyrotropin-releasing hormone in specific nuclei of rat brain. Science, **185,** 267-269 (1974).

3） **Jackson, I. M. D.:** Thyrotropin-releasing hormone. N. Engl. J. Med., **306,** 145-155 (1982).

4） **Plotnikoff, N. P., Prange, A. J., Breese, G. R., Anderson, M. S. & Wilson, I. C.:** Thyrotropin-releasing hormone: Enhancement of dopa activity by a hypothalamic hormone. Science, **178,** 417-418 (1972).

5） **Heal, D. J. & Green, A. R.:** Administration of thyrotropin-releasing hormone (TRH) to rats releases dopamine in N. accumbens but not N. caudatus. Neuropharmacology, **18,** 23-31 (1979).

6） **Narumi, S. & Nagawa, Y.:** Modification of dopaminergic transmission by thyrotropin-releasing hormone. Segawa, T (eds.), Molecular Pharmacology of Neurotransmitter Receptors, 1st ed. p185-197, Raven Press, New York, 1983.

7） **Agarwal, R. A., Rastogi, R. B. & Singhal, R. L.:** Enhacement of locomotor activity and catecholamine and 5-hydroxytryptamine metabolism by thyrotropin-releasing hormone. Neuroendocrinology, **23,** 236-247 (1977).

8） **Porter, C. C., Lotti, V. J. & De Felice, M.**

J.: The effect of TRH and a related tripeptide, L-N-(2-oxopiperidin-6-YL-carbonyl)-L-histidyl-L-thiazolidine-4-carboxamide (MK-771, OHT), on the depressant action of barbiturates and alcohol in mice and rats. Life Sci., **21,** 811-820 (1977).

9) Prange, A. R., Breese, G. R. & Cott, J. M.: Thyrotropin-releasing hormone: Antagonism of pentobarbital in rodents. Life Sci., **14,** 447-455 (1974).

10) Horita, A. & Carino, M. A.: Centrally administered TRH produces a vasopressor response in rabbits. Proc. West. Pharmacol. Soc., **20,** 303-304 (1977).

11) Tasy, B. & Lin, M. T.: Effects of intracerebroventricular administration of thyrotropin-releasing hormone on cardiovascular function in the rats. Neuroendocrinology, **35,** 173-177 (1982).

12) Tonoue, T.: Effect of thyrotropin releasing hormone on heart rate and visual evoked potentials in rats. Endocrinol. Japon, **24,** 271-276 (1977).

13) Desiles, M., Puech, A. J. & Rips, R.: Involvement of a central α-adrenoceptor system in antidepressant potentiation of hyperthermia induced by thyrotropin-releasing hormone. Br. J. Pharmac., **69,** 163-166 (1980).

14) Desiles, M. & Rips, R.: Noradrenergic involvement in hyperthermia induced by thyrotropin releasing hormone. Thermoregulatory mechanisms and their therapeutic implications. 4th int. symp. on the pharmacology of thermoregulation, Oxford 1979, p47-50, Karger, Basel, 1980.

15) Boschi, G., Nomoto, T. & Rips, R.: Thyrotropin releasing hormone-induced hyperthermia in mice: possible involvement of adrenal and pituitary glands. Br. J. Pharmac., **80,** 229-233 (1983).

16) Holaday, J. W., D' Amato, R. J. & Faden, A. I.: Thyrotropin-releasing hormone improves cardiovascular function in experimental endotoxic and hemorrhagic shock. Science, **213,** 216-218 (1981).

17) Faden, A. I., Jacobs, T. P. & Holaday, J. W.: Thyrotropin-releasing hormone improves neurologic recovery after spinal trauma in cats. N. Engl. J. Med., **305,** 1063-1067 (1981).

18) 藤本浩史, 川井尚臣: TRH およびその類似体 (DN-1417) の脊髄小脳変性症に対する臨床効果と内分泌機能への影響. 四国医誌, **41,** 310-326 (1985).

19) Sobue, I., Yamamoto, H. & Konagaya, M.: Effect of thyrotropin-releasing hormone on ataxia of spinocerebellar degeneration. Lancet, **1,** 418-419 (1980).

20) Kastin, A. J., Ehrensing, R. H. & Schalch, D. S.: Improvement in mental deression with decreased thyrotropin response after administration of thyrotropin-releasing hormone. Lancet, **2,** 740-742 (1972).

21) Parange, A. J., Wilson, I. C. & Lara, P. P.: Effect of thyrotropin-releasing hormone in depression. Lancet, **2,** 999-1002 (1972).

22) Kalivas, P. W. & Horita, A.: Thyrotropin--releasing hormone: Neurogenesis of actions in the pentobarbital narcotized rat. J. Pharmacol. Exp. Ther., **212,** 203-210 (1980).

23) Smith, J. R., LaHann, T. R., Chesnut, R. M., Carion, M. A. & Horita, A.: Thyrotropin-releasing hormone: Stimulation of colonic activity following intracerebroventricular administration. Science, **196,** 660-662 (1977).

24) Green, A. R., & Grahame-Smith, D. G.: TRH potentiates behavioural changes following increased brain 5-hydroxytryptamine accumulation in rats. Nature, **251,** 524-526 (1974).

25) Nutt, R. F., Holly, F. W., Homnick, C., Hirschmann, R. & Veber, D. F.: Synthesis of thyrotropin-releasing hormone analogues with selective central nervous system effects. J. Med. Chem., **24,** 692-698 (1981).

26) 小川紀雄, 山脇泰秀, 大藤 眞: 中枢神経における TRH の生化学的ならびに薬理学的性状. 神経精神薬理, **1,** 357-364 (1979).

27) Lowry, O. H., Rousenbrough, N. J. Farr, A. L. & Randall, R. J.: Protein measurement with Folin phenol reagent. J. Biol. Chem., **193,** 256-267 (1961).

28) 山田律爾, 中井利昭: 周辺灌流システムを用いての副腎髄質よりのカテコラミン放出に対する α-Receptor Blocker (phentolamine, レジチン) の影響. 日内分泌会誌, **53,** 250-258 (1977).

29) Glowinski, J. & Iversen, L. I.: Regional studies of catecholamines in the rats brain— I. J. Neurochem. **13,** 655-669 (1966).

30) 前田 潔：視床下部 in vitro 実験法．内分泌動物実験法（井村裕夫，加藤 譲編）．第1版，242-252頁，講談社，東京，1982.

31) **Wei., E., Sigel, S., Lou, H. & Way, E. L.:** Thyrotropin-releasing hormone and shaking behavior in rat. Nature, **253,** 739-740 (1975).

32) 黒田光保，入江 実：サイロキシン（T_4）"栄研"キットによる血中サイロキシン測定法の検討．ホルモンと臨床，**25,** 423-427 (1977).

33) **Nagatsu, T., Oka, K., Numata, Y. & Kato, T.:** A simple and sensitive fluorescence assay for tyrosine hydroxylase activity. Analy. Biochem. **93,** 82-87 (1979).

34) **Johnson, J. C., Gold, G. J. & Clouet, D. G.:** An improved method for the assay of dopa. Anal. Biochem., **54,** 129-136 (1973).

35) **Szirtes, T., Kisfaludy, L., Palosi, E. & Szporny, L.:** Synthesis of thyrotropin-releasing hormone analogues. 1. Complete disociation of central nervous system effects from thyrotropin-releasing activity. J. Med. Chem., **27,** 741-745 (1984).

36) 小川紀雄：TRH レセプター．脳のレセプター（小川紀雄編），第1版，240-253頁，世界保険通信社，大阪，1986.

37) **Grant, G., Vale, W. & Guillemin, R.:** Characteristics of the pituitary binding sites for thyrotropin-releasing factor. Endocrinology, **92,** 1629-1633 (1973).

38) **Landsberg, L., Saville, M. E. & Young, J. B.:** Sympathoadrenal system and regulation of thermogenesis. Am. J. Physiol., **247,** E181-E189 (1984).

39) **Kalivas, P. W. & Horita, A.:** Neuroanatomical dissociation of thyrotropin-releasing hormone induced shaking behavior and thermogenic mechanisms. Regul. Pept., **1,** 335-345 (1981).

40) **Zaloga, G. P., Chernow, B., Zajtchuk, R., Chin, R., Rainey, T. G. & Lake, R.:** Diagnostic dosages of protirelin (TRH) elevate BP by noncatecholamine mechanisms. Arch. Intern. Med., **144,** 1149-1152 (1984).

41) **Kennedy, B., Strassman, R. J., Ziegler, M. G., Janowsky, D. S., Risch, S. C., Huey, L. Y. & Gillin, J. C.:** Cardiovascular, catecholamine and psychological responses to TRH in four types of affective disorder patients. Horm. metbol. Res., **19,** 164-167 (1987).

42) **Morley, J. E., Tuck, M. L., Mayes, D. M., Rosenblatt, S. & Hershman, J. M.:** Thyrotropin-releasing hormone increases plasma norepinephrine in man. Hormone Res., **14,** 18-23 (1981).

43) **Wei, E., Loh, H. & Way, E. L.:** Potency of the N^{3m}-methyl analog of TRH in the induction of shaking movements in the rat. Eurp. J. Pharmacol., **36,** 227-229 (1976).

44) **Breese, G. R., Cott, J. M., Cooper, B. R., Prange, A. J., Lipton, M. A. & Plotnikoff, N. I.:** Effects of thyrotropin-releasing hormone (TRH) on the actions of pentobarbital and other centrally acting drugs. J. Pharmacol. Exp. Ther., **193,** 11-22 (1975).

45) **Yarbrough, G. G.:** Studies on the neurophamacology of thyrotropin-releasing hormone (TRH) and a new TRH analog. Eurp. J. Pharmacol., **48,** 19-27 (1978).

46) **Schmidt, D. E.:** Effects of thyrotropin-releasing hormone (TRH) on pentobarbital-induced decrease in cholinergic neuronal activity. Commun. Psychopharmacol., **1,** 469-473 (1977).

47) **Brown, M. R.:** Thyrotropin-releasing factor: a putative CNS regulator of the autonomic nervous system. Life Sci., **28,** 1789-1795 (1981).

48) **Bennett, G. W., Sharp, T., Brazell, M. & Marsden, C. A.:** TRH and catecholamine neurotransmitter release in the central nervous system. Griffiths, E. C. & Bennett, G. W. (eds.), Thyrotropin-Releasing Hormone, 1st ed. p253-269, Raven Press, New York, 1983.

49) **Horst, W. D. & Spirt, N.:** A possible mechanism for antidepressant activity of thyrotropin-releasing hormone. Life Sci., **15,** 1073-1082 (1974).

50) **Marek, K. & Haubrich, D. R.:** Thyrotropin-releasing hormone increased catabolism of catecholamines in brains of thyroidectomized rats. Biochem. Pharmacol., **26,** 1817-1818 (1977).

51) **Constantinidis, J., Geissbuhler, F., Gaillardo, J. M., Hovaguiman, T. & Tissot, R.:** Enhancement of cerebral noradrenaline turnover by thyrotropin-releasing hormone: Evidence by fluorescence histochemistry. Experimentia, **15,**

1182-1183 (1974).

52) **Rastogi, R. B., Singhal, R. L. & Lapierre, Y. D.:** Thyrotropin-releasing hormone: Neurochemical evidence for the potentiation of imipramine effects on the metabolism and uptake of brain catecholamines. Psychopharmacol., **72,** 85-91 (1980).

53) **Agarwal, R. A., Rastogi, R. B. & Singhal, R. L.:** Changes in brain catecholamines and spontaneous locomotor activity in responses to thyrotropin-releasing hormone. Res. Commun. Chem. Pathol. pharmacol., **15,** 743-752 (1976).

Biological Functions and Catecholamine(CA)-Releasing Activities of Thyrotropin-Releasing Hormone (TRH) Analogues

Takashi Okabe, Department of Pediatrics, School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920—J. Juzen Med. Soc., 98, 351—366 (1989)

Key words thyrotropin-releasing hormone, thyrotropin-releasing hormone analogue, catecholamine

Abstract

To potentiate the neurotropic actions of thyrotropin-releasing hormone (TRH, pyroglutamyl-histidyl-prolinamide), two analogues of TRH, pyrohomoglutamyl-histidyl-prolinamide (HUB-94) and pyrohomoglutamyl-norvalinyl-prolinamide (HUB-95) were synthesized and their biological functions and catecholamine (CA)-releasing activities were examined in comparison with those of TRH. In TRH-binding assay system using synaptosomal fraction from rat brain, HUB-94 showed an approximately similar displacing activity of ^{3}H-TRH ($IC_{50}=4.0\times10^{-8}$ M) to unlabelled TRH(1.9×10^{-8} M), whereas HUB-95 lost the displacing activity to a level of 1/1000 of TRH (1.8×10^{-5} M). In perifusion system of adrenal gland and hypothalamus, both analogues and TRH stimulated CA release; HUB-95 was the most potent in the adrenal gland, while TRH was in the hypothalamus. Intrathecal administration of 3×10^{-8} moles of HUB-94 produced a higher elevation of body temperature and blood pressure than those by TRH, whereas HUB-95 showed smaller effects on body temperature, pulse rate, blood pressure and head shaking response than those of TRH. Increases of plasma norepinephrine (NE) and epinephrine (E) by intrathecal injection of 1×10^{-9} moles of HUB-95 into young rats were significantly higher than the others. Only HUB-95 produced an elevation of pulse rate by intravenous administration. Chronic administration of $10^{-10}\sim10^{-9}$ moles of TRH or the analogues intrathecally for 1 week in young rats reduced tissue NE content in the brain and adrenal gland. In contrast, tyrosine hydroxylase (TH) activity in the adrenal gland showed a tendency to increase by HUB-94 and that in the brain by TRH. From these results, it is suggested that TRH-induced biological activities are potentiated centrally by HUB-94 and peripherally by HUB-95, and these enhanced biological activities are mediated in part by the stimulation of CA synthesis and release in the central nervous and sympatho-adrenal systems.