

脳機能障害に対する thyrotropin releasing hormone (TRH) および持続型  
新規TRH誘導体azetirelineの薬効評価に関する薬理学的研究

1991年

山本 実

## 目 次

緒言	6
第1章 TRHおよびazetirelineの正常動物における中枢薬理作用	10
1. 実験方法	10
1-1. 自発運動量	
1-2. 自発脳波	
1-3. ドパミン様行動	
2. 実験成績	12
2-1. 自発運動量に対するTRHおよびazetirelineの作用	
2-2. 自発脳波に対するTRHおよびazetirelineの作用	
2-3. TRHおよびazetirelineによるドパミン様行動	
3. 考察	17
4. 小括	22
第2章 TRHおよびazetirelineの既知の脳機能障害モデルにおける 中枢薬理作用	22
第1節 意識障害改善作用	23
1. 実験方法	23
1-1. pentobarbital睡眠	
1-2. pentobarbitalおよびethanol低体温	
1-3. 脳震盪マウス	
1-4. 視床下部破壊ネコ	
2. 実験成績	25
2-1. pentobarbital睡眠に対するTRHおよび azetirelineの作用	
2-2. pentobarbitalおよびethanol低体温に対する TRHおよびazetirelineの作用	
2-3. 脳震盪マウスの行動障害に対するTRHおよび azetirelineの作用	

2-4.	視床下部破壊ネコの行動および脳波障害に対するTRHおよびazetirelineの作用	
3.	考察	31
4.	小括	36
第2節	学習行動障害改善作用	37
1.	実験方法	37
1-1.	scopolamineラット	
1-2.	cycloheximideマウス	
1-3.	低酸素ラット	
1-4.	脳虚血スナネズミ	
1-5.	脳虚血ラット	
1-6.	老化促進マウス	
2.	実験成績	39
2-1.	scopolamineラット学習行動障害に対するTRHおよびazetirelineの作用	
2-2.	cycloheximideマウス学習行動障害に対するTRHおよびazetirelineの作用	
2-3.	低酸素ラット学習行動障害に対するTRHおよびazetirelineの作用	
2-4.	脳虚血スナネズミ学習行動障害に対するTRHおよびazetirelineの作用	
2-5.	脳虚血ラット学習行動障害に対するTRHおよびazetirelineの作用	
2-6.	老化促進マウス学習行動障害に対するTRHおよびazetirelineの作用	
3.	考察	43
4.	小括	51
第3節	運動失調改善作用	51
1.	実験方法	52

2.	実験成績	52
3.	考察	52
4.	小括	52
第4節	抗うつ作用	54
1.	実験方法	54
1-1.	体温低下	
1-2.	けいれん閾値低下	
1-3.	ponto-genicullo-occipital (PGO)波	
2.	実験成績	55
1-1.	reserpine低体温に対するTRHおよびazetirelineの作用	
1-2.	reserpineけいれん閾値低下に対するTRHおよびazetirelineの作用	
1-3.	reserpinePGO波に対するTRHおよびazetirelineの作用	
3.	考察	55
4.	小括	60
第3章	慢性脳虚血モデルにおける神経症状に対するTRHおよびazetirelineの薬効評価に関する薬理的検討	61
第1節	既知の脳血腫ラットにおける神経症状に対するTRHおよびazetirelineに薬効評価	62
1.	実験方法	62
2.	実験成績	62
3.	考察	62
4.	小括	67
第2節	中大脳動脈閉塞ラットを用いた新規慢性脳虚血モデルの作成	67

1.	実験方法	68
2.	実験成績	68
3.	考察	68
4.	小括	72
第3節	中大脳動脈閉塞ラットにおける神経症状に対するTRHおよびazetirelineの薬効評価	72
1.	実験方法	72
2.	実験成績	73
3.	考察	73
4.	小括	77
第4章	新規錐体運動路障害モデルの作成とTRHおよびazetirelineの神経症状評価に関する薬理的検討	77
第1節	錐体路障害ラット	78
1.	実験方法	78
2.	実験成績	84
3.	考察	84
4.	小括	85
第2節	錐体路障害運動負荷ラット	85
1.	実験方法	86
2.	実験成績	86
3.	考察	86
4.	小括	90

総括	91
謝辞	95
投稿雑誌目録	96
文献	99

## 緒言

Thyrotropin releasing hormone(TRH)は1966年Schallyらによりブタ視床下部から抽出されたが(1)、その化学構造はL-pyroglutamyl-L-histidyl-L-prolinamideのトリペプチドであることが明らかになった(2)。本ペプチドは視床下部以外の部位すなわち下垂体、視床、扁桃体、中脳、海馬等にも存在し(3,4)、さらにTRH含有神経終末の存在も証明されていることから(5)、中枢神経内の神経伝達物質または調整物質として作用し、哺乳動物の行動になんらかの影響を及ぼしていることが推定された。TRHは下垂体前葉からthyroid stimulating hormone(TSH)およびprolactinを遊離する視床下部ホルモンとして知られており(6,7)、これらのホルモン作用に加え、TRHはpentobarbital やethanolによる睡眠や低体温に拮抗する等中枢賦活作用を有することが報告されている(8-10)。

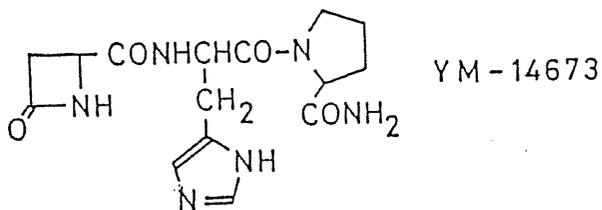
TRH自身はTSHおよびprolactin を遊離することから当初甲状腺機能障害の診断に用いられている。さらにTRHは中枢賦活作用を有することから頭部外傷や脳血管障害患者の意識障害治療剤として(11)、また運動失調モデルで改善作用を有する(12)ことから脊髄小脳変性症患者の運動失調治療剤として臨床に応用されている(13)。そのほか、TRHは鬱病(14)、精神分裂症(15)、自閉症多動児(16)、脊髄損傷(17)、パーキンソン氏病(18)、難治性てんかん(19)、多発硬化症(20)等多くの領域で臨床治験が行われているが、その成績はまちまちであり、これらの臨床効果の不明確さは一部にTRHの半減期が短く、薬理作用の持続が短いことによる可能性が考えられる。それ故、TRHより半減期が長く、強力で持続性の中枢賦活作用を有するTRH誘導体を創製することは有意義であると考えられ、すでに、RX-77368(21),MK-771(22),CG-3509,CG-3703(23),DN-1417(24)等の

TRH誘導体が研究され、多くの領域で臨床治験が行われている。

著者は田村ら(25)により合成された多数のTRH誘導体の中枢薬理作用を検討し、この中から半減期が長く、強力な中枢賦活作用を有する azetireline (YM-14673, <sup>4</sup>N-[[[(S)-4-oxo-2-azetidiny]carbonyl]-L-histidyl-L-prolinamide dihydrate]図1: 以後本文中にはazetirelineと、図表中には投稿論文の関係でYM-14673と記載した)を見いだした。Azetirelineは現在脳血管障害後遺症の領域で臨床治験を行っている。本研究においては、まずTRHに既知の薬理作用に関してTRHおよび azetirelineを比較検討した。すなわち、正常動物を用いて自発運動、自発脳波およびドパミン様行動を観察した。さらに、既知の脳機能障害モデルすなわち、pentobarbitalおよび ethanol処置により意識を低下させたマウス、脳しんとうや視床下部破壊意識障害、学習行動障害、運動失調およびreserpine誘発うつ等の各モデルを用いて、TRHおよびazetirelineの中枢作用を検討した。

TRHは脊髄損傷モデルにおける神経症状を改善すると報告されているが(26)、脳虚血モデルにおける神経症状を改善したという報告はない。脊髄損傷と脳虚血においては比較的共通した病態変化が考えられており、TRHが脳虚血モデルにおける神経症状を改善しなかったのはTRHの半減期が短いこと、又薬効評価に適切な慢性脳虚血モデルがないことによるかもしれない。特にTRHは強力な中枢賦活作用を有する為、酸素供給の低下した脳血管障害急性期よりも慢性期に使用することが考えられる。そこで、本研究においてはまず臨床により即した中大脳動脈閉塞ラットを用いて慢性期の脳機能変化を定量化できる新規慢性脳虚血モデルを作成し、持続型TRH誘導体のazetirelineおよびTRHの単回および頻回投与による神経症状に対する影響を観察した。さらに、既知の慢性脳血腫モデルも用いてTRHおよびazetirelineの作用を検討した。

ところで、神経症状惹起の一部に錐体路障害が関与している可能性が考えられており、TRHおよびazetirelineによる神経症状改善作用の機序の一部を検討するため、錐体路障害モデルすなわち錐体路の一部位である内包を破壊したラットを新規に確立し、同モデルの神経症状等を評価項目として錐体路に対する持続型TRH誘導体azetirelineおよび、単回



☒ 1 Chemical structure of YM-14673 and TRH.

および頻回投与によるTRHの作用を検討した。最近、脳血管障害後においてリハビリテーションを行うことは重要とされている為、より臨床に近いモデルの確立を目的として、運動障害モデルにも運動負荷（リハビリテーション）を行ったモデルを新規に作成し、運動負荷効果（リハビリテーション効果）を加味した薬効評価系を確立した。

## 第1章 TRHおよびazetirelineの正常動物における中枢薬理作用

TRHは下垂体からTSH, prolactinを遊離するホルモン作用(6, 7)の他に中枢作用を有することが知られている(8-10)。すなわち、PlotnikoffらはTRHがpargyline処置下垂体摘出マウスでL-DOPAの中枢興奮作用を増強すると報告した(27)。その後、TRHが正常動物で自発運動量増加(28)、脳波賦活(29)およびドパミン様行動惹起作用を示す(30)ことが報告された。

TRHは中枢神経のmodulatorとして内因性に存在しているが、本章においては正常動物を用い外因性にTRHおよびazetirelineを投与した場合のTRHおよびazetirelineのラット自発運動量、自発脳波およびマウスドパミン様行動惹起について比較検討した。

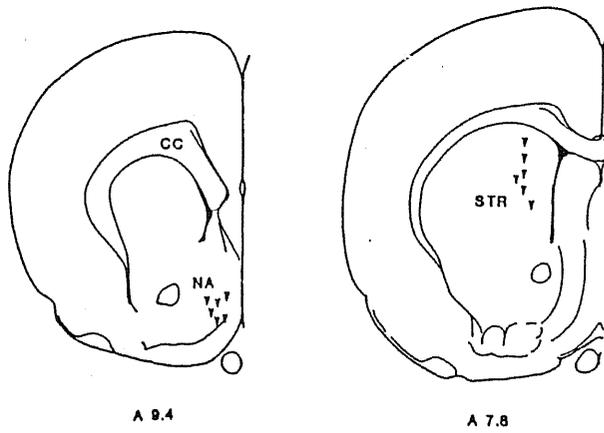
### 1. 実験方法

#### 1-1. 自発運動量

雄Wistarラット(体重約300g)を用い、自発運動量を薬物投与後120分間10分毎にアニメックス装置を使用して測定した。ラットは新しい環境に慣れさせるため、薬物投与前90分間測定ケージに入れた。別の実験で被験薬物をKönig and Klippelの脳図譜(31)に従い線条体(A:7.8-8.4, L:1.0-1.5, V:2.0-2.5)および側坐核(A:9.0-9.4, L:0.8-1.4, V:-0.5 - -1.5)へガイドカニューレを介して脳内投与した(図2)。TRHおよびazetirelineの自発運動量増加の作用機序を調べるため、atropine(1 mg/kg)およびhaloperidol(0.2 mg/kg)を薬物投与15分前に腹腔内投与、aminooxy acetic acid(AOAA)(50 mg/kg)およびalpha methyl para tyrosine(alpha MT)(250 mg/kg)をそれぞれ薬物投与90分、4時間前に腹腔内投与した。

#### 1-2. 自発脳波

雄Wistarラット(体重約300g)を用いた。Pentobarbital麻酔下で、大脳皮質へ脳波記録用電極を植え込み、そのラットを一週間後から実験に供した。自発脳波をデータ解析装置により10分毎に周波数解析し、薬



☒ 2

Diagrams representing the location of the cannula tips for injection into the nucleus accumbens (left) and the striatum (right) according to the König and Klippel Atlas. CC: corpus callosum, NA: nucleus accumbens, STR: striatum.

効評価は薬物投与10分前および投与後各時間のtheta波(4-7.75Hz)出現率を比較して行った。

### 1-3. ドパミン様行動

雄ICRマウス(体重約30g)を用いた。被験薬物腹腔内投与後10-60分の間10分毎に1分間climbing行動を観察した。6回の観察で3回以上climbing行動を示した場合、positiveであると評価し、50%のマウスがclimbing行動を引き起こす用量ED50%を用量作用曲線から求めた。また、sniffing, licking およびbiting行動も被験薬物腹腔内投与後5, 15, 30, 60, 90分において5分間観察し、50%のマウスがsniffing行動を引き起こす用量ED50%値を用量作用曲線から求めた。TRHおよびazetirelineのドパミン様行動を引き起こす機序の一部をみる為、haloperidol (0.5 mg/kg ip)およびalpha MT(250 mg/kg)をそれぞれ薬物投与と同時におよび4時間後に腹腔内投与した。

## 2. 実験成績

### 2-1. 自発運動量に対するTRHおよびazetirelineの作用

TRH(20mg/kg ip)およびazetireline(1 mg/kg ip, 10 mg/kg po)は自発運動量を増加したが、azetirelineの効力はTRHの約20倍であった(表1)。TRHおよびazetirelineの自発運動量増加はドパミン受容体遮断薬haloperidol, tyrosine hydroxylase活性抑制薬alpha-MT, GABA transaminase inhibitor AOAAにより拮抗されたが、atropineには影響されなかった(表2)。TRHおよびazetirelineの側坐核投与による自発運動量増加は線条体投与によるものより約100倍強かった(表3、4、図3)。

### 2-2. 自発脳波に対するTRHおよびazetirelineの作用

TRH(1 mg/kg ip, 10 mg/kg po)およびazetireline(0.1 mg/kg ip, 1 mg/kg po)(図4)はラット大脳皮質自発脳波のtheta波出現率を増加させたことから、これらの薬物は脳波賦活作用を有することがわかった。Azetirelineの持続時間はTRHの約10倍以上であった(図4)。

表 1

*Effects of peripheral administration of YM-14673 and TRH on spontaneous motor activity in rats*

Drug	Dose (mg/kg)	Route	Spontaneous motor activity	
			Counts/60 min	Counts/120 min
Control		i.p.	510 ± 125	654 ± 138
YM-14673	0.01	i.p.	507 ± 65	674 ± 101
	0.1	i.p.	710 ± 118	1020 ± 88
	1	i.p.	1986 ± 139**	3498 ± 299**
Control		i.p.	438 ± 82	638 ± 81
TRH	1	i.p.	546 ± 101	680 ± 110
	3	i.p.	371 ± 64	529 ± 41
	10	i.p.	572 ± 178	742 ± 159
	20	i.p.	1189 ± 109*	1434 ± 122
Control		p.o.	229 ± 49	566 ± 80
YM-14673	1	p.o.	358 ± 73	583 ± 105
	10	p.o.	955 ± 78**	2031 ± 99*
TRH	10	p.o.	375 ± 70	599 ± 87
	100	p.o.	447 ± 73	614 ± 86

Each value represents the mean ± S.E.M. from 6 rats.

Significant differences from control were tested by the Wilcoxon-Multiple-Comparison test when the Kruskal-Wallis H-test was significant ( $P < 0.05$ ).

Significantly different from the control group: \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ .

表 2

*Effects of haloperidol,  $\alpha$ -MT, AOAA and atropine on the YM-14673- and TRH-induced spontaneous motor activity increases in rats*

Treatment	Spontaneous motor activity	
	Counts/60 min	Counts/120 min
Saline	438 ± 82	638 ± 81
Haloperidol	391 ± 77	515 ± 90
$\alpha$ -MT	371 ± 102	632 ± 156
AOAA	509 ± 81	648 ± 79
Atropine	443 ± 108	633 ± 133
YM-14673	1986 ± 139 (*)	3498 ± 299 (*)
YM-14673 + Haloperidol	811 ± 287*	1430 ± 488*
+ $\alpha$ -MT	776 ± 142**	1321 ± 251**
+ AOAA	677 ± 115**	894 ± 143**
+ Atropine	1911 ± 85	3520 ± 115
TRH	1189 ± 109 (*)	1434 ± 122 (*)
TRH + Haloperidol	548 ± 206*	734 ± 241*
+ $\alpha$ -MT	394 ± 64**	548 ± 80**
+ AOAA	578 ± 108**	697 ± 124**
+ Atropine	948 ± 107	1236 ± 119

Each value represents the mean ± S.E.M. from 5-7 rats.

YM-14673 (1 mg/kg) and TRH (20 mg/kg) were administered i.p. to rats 15 min after giving either haloperidol (0.2 mg/kg i.p.) or atropine (1 mg/kg i.p.), 90 min after giving AOAA (50 mg/kg i.p.) and 4 hr after giving  $\alpha$ -MT (250 mg/kg i.p.).

Significant differences from each group were tested by the Wilcoxon-Multiple-Comparison test when the Kruskal-Wallis H-test was significant ( $P < 0.05$ ).

Significantly different from the YM-14673 or TRH alone treated group: \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ .

Significantly different from the saline control group: (\*)  $P < 0.01$ .

表 3

*Effects of unilateral administration of YM-14673 or TRH into the nucleus accumbens upon spontaneous motor activity in rats*

Drug	Dose ( $\mu\text{g}/2 \mu\text{l}$ )	Spontaneous motor activity	
		Counts/60 min	Counts/120 min
Saline (*)		339 $\pm$ 64	457 $\pm$ 81
YM-14673	0.001	469 $\pm$ 73	861 $\pm$ 121*
	0.01	1288 $\pm$ 174*	1924 $\pm$ 348*
	0.1	1510 $\pm$ 129*	2672 $\pm$ 185*
	1	1912 $\pm$ 198*	3779 $\pm$ 389*
TRH	0.1	508 $\pm$ 93	677 $\pm$ 98
	1	898 $\pm$ 161*	1156 $\pm$ 202*
	10	710 $\pm$ 66*	975 $\pm$ 70*
	100	1298 $\pm$ 174*	1788 $\pm$ 264*

Each value represents the mean  $\pm$  S.E.M. from 6 rats.

(\*) The injection volume was 2  $\mu\text{l}$  on unilateral side.

All data were submitted to the Wilcoxon matched-pairs test since each animal was used as its own control.

Significantly different from the saline control group: \*  $P < 0.05$ .

表 4

*Effects of unilateral administration of YM-14673 or TRH into the dorsal striatum on spontaneous motor activity in rats*

Drug	Dose ( $\mu\text{g}/2 \mu\text{l}$ )	Spontaneous motor activity	
		Counts/60 min	Counts/120 min
Saline (*)		321 $\pm$ 48	465 $\pm$ 69
YM-14673	0.1	375 $\pm$ 83	738 $\pm$ 199
	1	1543 $\pm$ 81*	2823 $\pm$ 122*
TRH	1	501 $\pm$ 99	761 $\pm$ 187
	10	464 $\pm$ 87	640 $\pm$ 95
	100	1274 $\pm$ 186*	1738 $\pm$ 281*

Each value represents the mean  $\pm$  S.E.M. from 6 rats.

(\*) The injection volume was 2  $\mu\text{l}$  on unilateral side.

All data were submitted to the Wilcoxon matched-pairs test since each animal was used as its own control.

Significantly different from the saline control group: \*  $P < 0.05$ .

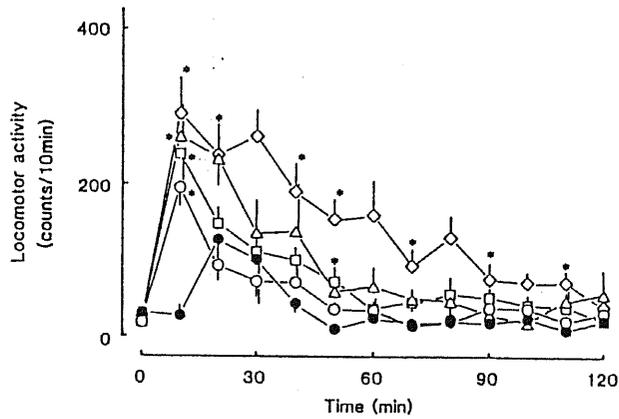
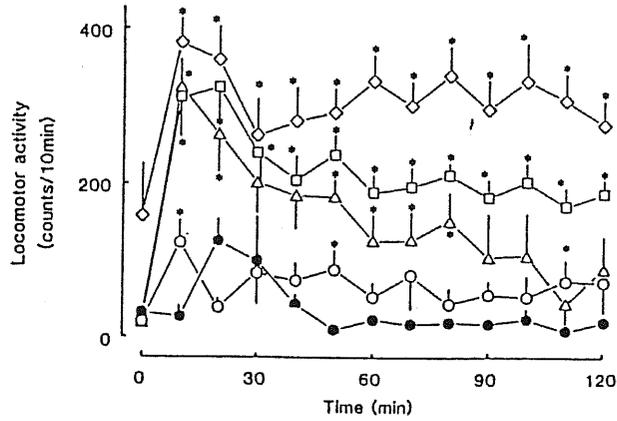


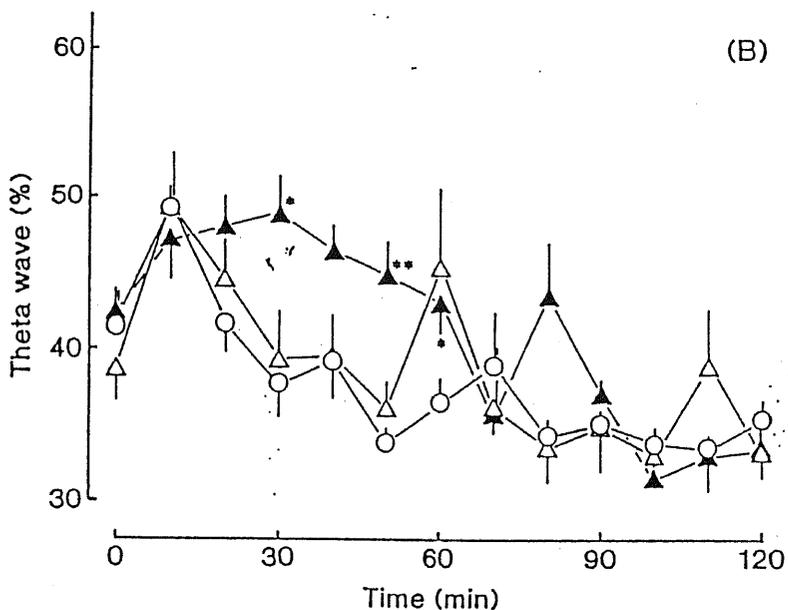
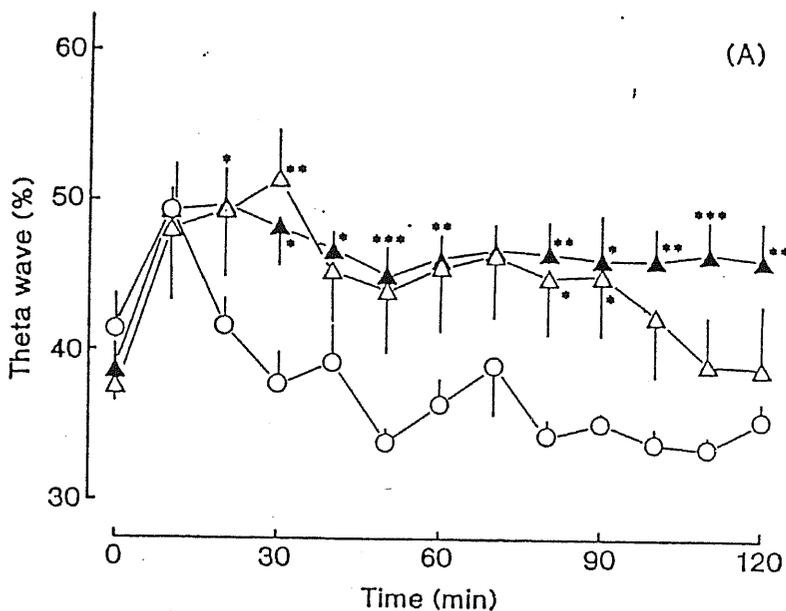
图 3

The effects of YM-14673 (upper panel) and TRH (lower panel) into the nucleus accumbens upon spontaneous motor activity in rats. Each point represents the mean  $\pm$  S.E.M. from 6 rats. All data were submitted to the Wilcoxon matched-pairs test since each animal was used as its own control.

Significantly different from the saline-injected group: \*  $P < 0.05$  (Wilcoxon matched-pairs test).

Upper panel:  $\bullet$ —: saline;  $\circ$ —: YM-14673 (0.001  $\mu\text{g}$ );  $\triangle$ —: YM-14673 (0.01  $\mu\text{g}$ );  $\square$ —: YM-14673 (0.1  $\mu\text{g}$ );  $\diamond$ —: YM-14673 (1  $\mu\text{g}$ ).

Lower panel:  $\bullet$ —: saline;  $\circ$ —: TRH (0.1  $\mu\text{g}$ );  $\triangle$ —: TRH (1  $\mu\text{g}$ );  $\square$ —: TRH (10  $\mu\text{g}$ );  $\diamond$ —: TRH (100  $\mu\text{g}$ ).



4. Effects of YM-14673 (A) and TRH (B) on the appearance rate of the theta-wave component in rats. Each point represents the mean  $\pm$  S.E.M. from 4 - 5 rats. (A): ○ - ○ ; saline (i.p.), △ - △ ; YM-14673 (0.1 mg/kg i.p.), ▲ - ▲ ; YM-14673 (1 mg/kg i.p.). (B): ○ - ○ ; saline (i.p.), △ - △ ; TRH (1 mg/kg i.p.), ▲ - ▲ ; TRH (10 mg/kg i.p.). Significantly different from the value for saline-treated group: \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$  (Student's  $t$  test).

### 2-3. TRHおよびazetirelineによるドーパミン様行動

TRH(30 mg/kg ip), azetireline (1-10 mg/kg ip), methamphetamine (3 mg/kg ip)およびapomorphine (1 mg/kg sc)はclimbing 行動を惹起したが(表5)、ED値はそれぞれ30, 2, 3, 0.6 mg/kgであった。また、TRH(30-100 mg/kg ip), azetireline (1-100 mg/kg ip)およびmethamphetamine (1-10 mg/kg ip)は sniffing 行動も惹起したが(表7)、それぞれのED値は10.5, 2.4, 0.8 mg/kg であった。これらclimbingおよびsniffing 行動はhaloperidolおよびalpha-MTにより減弱した(表6、8)。一方、apomorphine (0.6 mg/kg sc)のclimbing 行動惹起作用はhaloperidolにより拮抗されたが、alpha-MTによって は影響されなかった。TRHおよびazetirelineは100mg/kgまでの腹腔内投与で lickingおよびbiting 行動は観察されなかった(表9)。一方、methamphetamine(10 mg/kg ip)はlickingおよびbiting行動を惹起した(表9)。

### 3. 考察

TRHおよびazetirelineはラット自発脳波のtheta波出現率および自発運動量を増大させる等、正常ラットにおいて中枢賦活作用を示した。TRHおよびazetirelineによる自発運動量増加はhaloperidolにより拮抗され、線条体ドーパミン神経系の起始核のある線条体よりも中脳辺縁ドーパミン神経系の起始核のある側坐核へのTRHおよびazetireline局所投与によって強く自発運動量が増加された。又、TRHおよびazetirelineをマウスに投与すると、中脳辺縁ドーパミン神経系に関連あるsniffingおよびclimbing 行動が惹起されたが、これらの作用はhaloperidolにより拮抗された。又、methamphetamineとは異なり、線条体ドーパミン神経系に関連するbitingやlicking行動はTRHおよびazetirelineの投与により惹起しなかった。Alpha MT処置によりカテコールアミン合成能が低下したマウス、また、haloperidolによりドーパミン受容体を遮断したマウスにおいてもTRHおよびazetireline投与によりsniffing行動は観察されなかった。これらの成績から、主にシナプス後部に作用するapomorphineと異なり、TRHお

表 5

Effects of YM-14673, TRH, methamphetamine and apomorphine on climbing behavior in mice. <sup>a</sup> Number of mice climbing/number of mice used. Climbing behavior was observed for 1 min at intervals of 10 min between 10 min and 60 min after drug administration. Mice which climbed the mesh cage over 3 times during six observation periods were taken as positive. YM-14673, TRH and methamphetamine were administered i.p. and apomorphine was administered s.c. Significantly different from the value for the saline control group: <sup>b</sup> P < 0.05, <sup>c</sup> P < 0.001 (Fisher exact probability test).

Drug	Dose (mg/kg)	Incidence of climbing behavior <sup>a</sup>
Saline	-	0/8
YM-14673	0.1	1/8
	0.3	0/8
	1	4/8 <sup>b</sup>
	3	4/8 <sup>b</sup>
	10	5/8 <sup>b</sup>
TRH	0.3	0/8
	1	1/8
	3	0/8
	10	2/8
	30	5/8 <sup>b</sup>
Methamphetamine	0.1	1/8
	0.3	2/8
	1	3/8
	3	4/8 <sup>b</sup>
Apomorphine	0.1	0/8
	0.3	1/8
	1	7/8 <sup>c</sup>
	3	8/8 <sup>c</sup>

表 6

Effects of haloperidol and  $\alpha$ -MT on climbing behavior induced by YM-14673, TRH, methamphetamine and apomorphine in mice. <sup>a</sup> YM-14673, TRH, methamphetamine and apomorphine were administered at their ED<sub>50</sub>. <sup>b</sup> Number of mice climbing/number of mice used. <sup>c</sup> Haloperidol (0.5 mg/kg i.p.) and the drug to be tested were administered at the same time. <sup>d</sup>  $\alpha$ -MT (250 mg/kg i.p.) was administered 4 h before the drugs to be tested. Significantly different from the value for the no pretreatment group: \* P < 0.05 (Fisher exact probability test).

Drug	Dose <sup>a</sup> (mg/kg)	Route	Incidence of climbing behavior <sup>b</sup>		
			Alone	Pretreatment	
				Haloperidol <sup>c</sup>	$\alpha$ -MT <sup>d</sup>
YM-14673	2	i.p.	4/8	0/8 *	0/8 *
TRH	30	i.p.	5/8	0/8 *	0/8 *
Methamphetamine	3	i.p.	4/8	0/8 *	0/8 *
Apomorphine	0.6	s.c.	4/8	0/8 *	3/8

表 7

Incidence of sniffing behavior induced by YM-14673, TRH and methamphetamine in mice. <sup>a</sup> Number of mice sniffing/number of mice used. The drugs were administered i.p. Significantly different from the value for the saline control group: <sup>b</sup> P < 0.05, <sup>c</sup> P < 0.01, <sup>d</sup> P < 0.001 (Fisher exact probability test).

Drug	Dose (mg/kg)	Incidence of sniffing behavior <sup>a</sup>
Saline	-	0/8
YM-14673	0.1	0/8
	1	3/8 <sup>b</sup>
	10	6/8 <sup>c</sup>
	30	7/8 <sup>d</sup>
	100	8/8 <sup>d</sup>
TRH	1	0/8
	3	1/8
	10	4/8
	30	7/8 <sup>d</sup>
	100	8/8 <sup>d</sup>
Methamphetamine	0.1	0/8
	0.3	0/8
	1	6/8 <sup>c</sup>
	3	8/8 <sup>d</sup>
	10	8/8 <sup>d</sup>

表 8

Effects of haloperidol and  $\alpha$ -MT on sniffing behavior induced by YM-14673, TRH and methamphetamine in mice. <sup>a</sup> YM-14673, TRH and methamphetamine were administered i.p. at their ED<sub>50</sub> for inducing sniffing. <sup>b</sup> Number of mice sniffing/number of mice used. <sup>c</sup> Haloperidol (0.5 mg/kg i.p.) and the drugs to be tested were administered at the same time. <sup>d</sup>  $\alpha$ -MT (250 mg/kg i.p.) was administered 4 h before the drugs to be tested. Significantly different from the value for the no pretreatment group: <sup>e</sup> P < 0.05 (Fisher exact probability test).

Drug	Dose <sup>a</sup> (mg/kg)	Incidence of sniffing behavior <sup>b</sup>		
		Alone	Pretreatment	
			Haloperidol <sup>c</sup>	$\alpha$ -MT <sup>d</sup>
YM-14673	2.4	4/8	0/8 <sup>e</sup>	0/8 <sup>e</sup>
TRH	10.5	4/8	0/8 <sup>e</sup>	0/8 <sup>e</sup>
Methamphetamine	0.8	4/8	0/8 <sup>e</sup>	0/8 <sup>e</sup>

表 9 Incidence of stereotyped licking and biting behaviors by YM-14673, TRH and methamphetamine in mice

Drug	Dose (mg/kg ip)	N	Incidence of licking and biting behaviors <sup>1</sup>				
			5	15	30	60	90 (min) <sup>2)</sup>
Saline	-	8	0	0	0	0	0
YM-14673	0.1	8	0	0	0	0	0
	1	8	0	0	0	0	0
	10	8	0	0	0	0	0
	30	8	2	0	0	0	0
	100	8	2	1	0	0	0
TRH	1	8	0	0	0	0	0
	3	8	0	0	0	0	0
	10	8	1	0	0	0	0
	30	8	1	0	0	0	0
	100	8	2	0	0	0	0
Methamphetamine	0.1	8	0	0	0	0	0
	0.3	8	0	0	0	0	0
	1	8	0	0	1	1	0
	3	8	0	0	0	1	1
	10	8	1	2	6 **	8 ***	8 ***

1) Number of mice showing licking and biting behaviors.

2) Time : After drug administration .

Significantly different from the value for saline control group :

\*\* p<0.01, \*\*\* p<0.001 (Fisher exact probability test).

よびazetirelineはシナプス前部からドパミン遊離を促進すると考えられた。生化学的にもTRHおよびazetirelineをラットに投与するとドパミン遊離が増大されることが報告されている(32)。

#### 4. 小括

1. TRHおよびazetirelineはラット自発運動量増加、自発脳波賦活作用およびマウスドパミン様行動惹起作用を惹起するが、azetirelineの効力はTRHの約10-20倍強力で、azetirelineの自発運動量増加および自発脳波賦活作用はTRHより約9倍持続性であった。
2. TRHおよびazetirelineは中脳辺縁ドパミン神経系に作用して自発運動量増加、climbing等の行動を惹起するものと考えられた。一方、methamphetamineは中脳辺縁および線条体両ドパミン神経系とそれぞれ関連あるclimbingおよびbitingの行動を惹起し、この点でTRHおよびazetirelineはmethamphetamineと異なっていた。
3. 以上の成績から正常動物を用いた薬理実験でTRHおよびazetirelineが中枢賦活作用を有することまた、azetirelineは持続型のTRH誘導体であることがわかった。

## 第2章 TRHおよびazetirelineの既知の脳機能障害モデルにおける中枢薬理作用

第1章においてTRHおよびazetirelineに中枢賦活作用を有することがわかった。このようにTRHは強力な中枢賦活作用を有することから、種々の脳機能障害モデルでの薬効評価がなされてきた。すなわち、頭部外傷(33,34)、運動失調(12,35)、うつ病(8-10)および学習行動障害(36-39)等の各モデルでTRHが改善効果を示すことがわかっており、臨床の場でも多くの治験がなされてきた。現時点では日本において頭部外傷、くも膜下出血に伴う意識障害や脊髄小脳変性症の運動失調治療剤として頻用されている。本章においては既知の意識障害、学習行動障害、運動失調およ

びうつ病の各モデルを用いて脳機能障害に対するTRHおよびazetirelineの薬理作用を検討した。

## 第1節 意識障害改善作用

Pentobarbital, ethanol処置で意識低下状態となったマウスにおいて睡眠、低体温拮抗作用(8-10)および機械的意識障害モデルにおいて行動障害改善(33) 脳波改善作用(34)等を示すことが報告された。また、pentobarbital拮抗作用に脳内アセチルコリン神経系(40)および脳エネルギー代謝賦活作用の関与(41)が考えられている。以上の実験成績を踏まえ、TRHの臨床治験が行われたが、二重盲験試験において頭部外傷、くも膜下出血患者の意識障害に対しTRHが改善作用を有することがわかり(11), 現在TRHはこの領域で頻用されている。

本節においてはpentobarbitalおよびethanolにより意識を低下させたマウスおよび脳震盪マウス、視床下部破壊意識障害ネコを用いてTRHおよびazetirelineの意識賦活作用を比較検討した。

### 1. 実験方法

#### 1-1. Pentobarbital睡眠

雄ICRマウス(体重約25g)を用い、pentobarbital 55mg/kgを腹腔内投与した。TRHおよびazetirelineをpentobarbital投与10分後に静脈内、経口および脳内投与し、正向反射消失の時間を指標に睡眠時間を測定した。Pentobarbital睡眠時間を50%短縮するED50値を用量作用曲線から求めた。薬理作用の持続時間をみる実験でTRHおよびazetirelineのED50量をpentobarbital投与前種々の時間に静脈内投与した。また、TRHおよびazetirelineを5および14日間連続静脈内投与して、単回投与時の薬理作用と比較した。被験薬物によるpentobarbital拮抗作用が中枢賦活作用によるかホルモン作用によるかを調べるため、下垂体摘出マウスを用いて正常マウスでの薬理作用と比較した。さらに、TRHおよびazetireline(0.1 mg/kg iv)のpentobarbital睡眠拮抗作用の作用機序の一部を調べるためpentobarbital投与10分後に、phentolamine(0.3  $\mu$ g)お

よびatropine(3  $\mu$ g)を脳内投与し、baclofen(5 mg/kg)およびhaloperidol(0.3 mg/kg)を腹腔内投与した。

#### 1-2. Pentobarbitalおよびethanol低体温

雄ICRマウス(体重約30g)を用い、pentobarbital(55mg/kg)およびethanol(25%, 23ml/kg)を腹腔内投与した。これらの前処置10分後にTRHおよびazetirelineを静脈内投与した。直腸温は被験薬物投与直前および30分後に測定し、pentobarbitalおよびethanol投与による体温下降を1.5°C上昇させる投与量ED1.5°Cを用量作用曲線から求めた。

#### 1-3. 脳震盪マウス

間中らの方法に従い(31)、無麻酔雄ICRマウス(体重約20g)の耳を固定し、頭部に分銅(20.5g, 直径、厚み19mm)を約18cmの高さから落下した。マウスは強直性けいれんおよび意識障害を引き起こし、しばらく静止した状態を保つが、その後正向反射を回復し、自発運動を始める。薬効評価はショックから自発運動を開始するまでの時間(DT)を測定して行った。薬物はテスト10分前に静脈内投与し、DT時間を50%短縮するED50%値を用量作用曲線から求めた。

#### 1-4. 視床下部破壊ネコ

雌雄別なくネコ(体重約3kg)を用いた。土居らの方法に従い(34)、pentobarbital麻酔下で大脳皮質に脳波記録用電極を植え込み、視床下部後部(A: 11, L:1.5, V:-4.0 - -6; A: 9.0, L:1.5, V:-4 - -6, Snider and Niemerの脳図譜(42)による)を電気(1mA, 30sec, 5分間隔で2回)破壊した。術後3日目に行動および脳波変化に対する薬物の影響を観察した。行動変化は薬物投与10分後に0-3(3:自発的に動き回る、鳴く; 2:外界刺激により耳が動く、1:外界刺激により目が開く、0:外界刺激により反応なし)にスコア化して評価した。自発脳波に対する薬効評価は、delta波(2-3.75Hz)の出現率をデータ解析装置により解析し、薬物投与前10分間の出現率と投与後1時間毎10分間の出現率と比較して行った。

## 2. 実験成績

### 2-1. Pentobarbital 睡眠に対するTRHおよびazetirelineの作用

TRH(1-10mg/kg iv, 1  $\mu$ g ic)およびazetireline (0.1-1 mg/kg iv, 1-10 mg/kg po, 1  $\mu$ g ic)はマウスpentobarbital睡眠時間を短縮した(表10, 11)。静脈内投与したTRHおよびazetirelineのED50値はそれぞれ1および0.1mg/kgであり、azetirelineの効力はTRHの約10倍であった。TRH(1 mg/kg iv=ED50)の持続時間は15分、azetireline(0.1mg/kg iv=ED50)の持続時間は120分であることから、azetirelineの持続はTRHより約8倍長かった(表12)。

TRHおよびazetirelineは5および14日間毎日1回静脈内投与しても単回投与時と同様な中枢賦活作用を示した(データ省略)。従って、連続投与により薬物の作用が減弱することはないと考えられた。下垂体摘出マウスを用いた実験でTRHおよびazetirelineは正常マウスと同様の著明なpentobarbital拮抗作用を示し、これら薬物の作用は下垂体ホルモン系を介した作用ではないことが考えられた(データ省略)。TRHおよびazetirelineによるpentobarbital睡眠時間短縮はそれ自身影響を示さない用量の(表13)抗コリン薬atropineおよびGABA agonist baclofenにより減弱され(表14)、ドパミンantagonist haloperidol, alpha-blocker phentolamineによって影響されなかった。

### 2-2. Pentobarbitalおよびethanol低体温に対するTRHおよびazetirelineの作用

TRH(0.3-1mg/kg iv)およびazetireline (0.01-0.1mg/kg iv)はpentobarbital低体温を減弱したが(表15)、ED1.5 $^{\circ}$ C値はそれぞれ0.1および0.01mg/kgであった。Ethanol低体温はTRH(3-10 mg/kg iv)およびazetireline (0.03-1 mg/kg iv)により減弱され、ED1.5 $^{\circ}$ C値はそれぞれ4および0.1 mg/kgであった。従って、azetirelineの効力はTRHの約10-40倍であった。

表 1 0 Effects of YM-14673 and TRH on pentobarbital-induced sleep in mice

Treatment	Dose (mg/kg)		Sleeping time (min)	Shortening (%)
Control	—	(i.v.)	47.9 ± 5.6	—
YM-14673	0.01		39.4 ± 5.7	17.7
	0.1		25.8 ± 4.0	46.1**
	1		20.5 ± 2.4	57.2**
Control	—	(i.v.)	51.5 ± 6.4	—
TRH	0.1		35.0 ± 4.7	32.3
	1		27.4 ± 2.5	46.8*
	10		18.3 ± 6.8	64.4**
Control	—	(p.o.)	69.0 ± 10.7	—
YM-14673	0.1		60.2 ± 6.9	12.8
	1		44.5 ± 3.9	35.5*
	10		25.0 ± 2.2	63.7**
Control	—	(p.o.)	68.6 ± 8.4	—
TRH	3		69.9 ± 8.4	-1.9
	10		60.5 ± 7.9	12.0
	30		44.4 ± 6.3	35.3
Control	—	(i.c.)	45.3 ± 6.5	—
YM-14673	0.001	μg	30.6 ± 4.2	32.5
	0.01		25.5 ± 3.4	43.7*
	0.1		21.6 ± 4.4	52.3**
Control	—	(i.c.)	52.0 ± 4.4	—
TRH	0.01	μg	38.9 ± 5.9	25.2
	0.1		33.5 ± 6.4	35.6
	1		28.5 ± 5.2	45.2*

Each value represents the mean ± SE from 6-9 mice. The YM-14673 and TRH were administered to mice 10 min after the intraperitoneal injection of pentobarbital (55 mg/kg). Significant differences from control were tested by Dunnett's Multiple Range test when the analysis of variance was significant ( $P < 0.05$ ). \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ .

表 1. 1. Effects of YM-14673 and TRH on pentobarbital-induced sleeping in mice

Treatment	Dose (mg/kg i.v.)	n	Sleeping time (min)	Shortening (%)
Saline		9	47.9 ± 5.6	—
YM-14673	0.01	8	39.4 ± 5.7	17.7
	0.03	8	35.3 ± 3.7	26.3
	0.1	9	25.8 ± 4.0	46.1**
	0.3	8	22.0 ± 2.7	54.0**
	1	9	20.5 ± 2.4	57.2***
Saline		9	51.5 ± 6.4	—
TRH	0.1	9	35.0 ± 4.7	32.3
	0.3	8	33.8 ± 5.2	34.5
	1	8	27.4 ± 2.5	46.8**
	3	8	24.3 ± 3.3	53.0**
	10	8	18.3 ± 6.8	64.4**

Each value represents the mean ± SE  
 YM-14673 and TRH were administered intravenously to mice  
 10 min after intraperitoneal pentobarbital (55 mg/kg)  
 Significantly different from the value for respective saline group  
 \*\*  $P < 0.01$ ; \*\*\*  $P < 0.001$  (Student's *t*-test)

表 1. 2. Duration of actions of YM-14673 and TRH in antagonizing the pentobarbital-induced sleep in mice

Treatment	Time before pentobarbital (min)	Sleeping time (min)		Shortening (%)
		Saline	Drug	
YM-14673	15	56.0 ± 7.7	28.4 ± 3.0	49.3**
	30	55.5 ± 4.3	26.4 ± 3.1	52.3***
	45	63.0 ± 6.5	36.9 ± 4.7	41.4**
	60	61.9 ± 5.0	33.2 ± 1.1	46.4***
	90	52.0 ± 4.0	35.4 ± 3.1	31.9**
	120	56.6 ± 5.8	34.4 ± 4.8	39.2**
	150	56.0 ± 4.6	48.3 ± 4.4	13.8
TRH	15	50.4 ± 5.6	29.7 ± 4.3	41.0*
	30	57.8 ± 6.9	53.2 ± 5.7	7.8

Each value represents the mean ± SE from 8–11 mice  
 YM-14673 (0.1 mg/kg) and TRH (1 mg/kg) were administered intravenously at various times before giving pentobarbital (55 mg/kg) intraperitoneally. Significantly different from the value for respective saline group  
 \*  $P < 0.05$ ; \*\*  $P < 0.01$ ; \*\*\*  $P < 0.001$  (Student's *t*-test)

表 1 3. Effects of atropine, baclofen, haloperidol and phentolamine on pentobarbital-induced sleep in rats

Treatment	Dose	Sleeping time (min)	Shortening (%)
Control	—	56.7 ± 2.4	—
Atropine	3 μg (i.c.)	53.5 ± 2.6	5.6
	10	54.9 ± 2.9	3.2
	30	63.8 ± 6.6	-12.5
Control	—	57.5 ± 6.0	—
Baclofen	2.5 mg/kg (i.p.)	79.4 ± 7.9	-38.1
	5	70.9 ± 8.3	-23.3
	10	105.5 ± 5.9	-83.5**
Control	—	57.3 ± 7.1	—
Haloperidol	0.1 mg/kg (i.p.)	51.6 ± 6.3	9.9
	0.3	47.5 ± 7.9	17.1
	1	72.4 ± 7.1	-26.4
Control	—	43.4 ± 7.1	—
Phentolamine	1 μg (i.c.)	47.3 ± 4.9	-9.0
	5	57.5 ± 4.4	-32.5
	25	45.2 ± 3.2	-4.1

Each value represents the mean ± SE from 6-9 mice. The drugs were administered to mice 10 min after the intraperitoneal injection of pentobarbital (55 mg/kg). Significant differences from control were tested by the Dunnett's Multiple Range test when the analysis of variance was significant ( $P < 0.05$ ). \*\* $P < 0.01$ .

表 1 4 Effects of atropine and baclofen on the actions of YM-14673 and TRH to reduce pentobarbital-induced sleep in mice

Treatment	Sleeping time (min)
Control	46.1 ± 3.3
YM-14673	24.2 ± 2.3*
YM-14673 + Atropine	44.8 ± 6.4**
Control	52.8 ± 2.7
TRH	24.3 ± 1.5*
TRH + Atropine	50.0 ± 2.1**
Control	50.1 ± 4.0
YM-14673	29.0 ± 5.7 <sup>b</sup>
YM-14673 + Baclofen	49.4 ± 4.9*
Control	57.7 ± 10.9
TRH	29.1 ± 2.0*
TRH + Baclofen	58.4 ± 5.1**

Each value represents the mean ± SE from 7-10 mice. Both YM-14673 (0.1 mg/kg) and TRH (1 mg/kg) were administered intravenously to mice 10 min after the intraperitoneal injection of pentobarbital (55 mg/kg). Atropine (3 μg) and baclofen (3 mg/kg) were injected intracerebrally and intraperitoneally 10 min after pentobarbital, respectively. Significant differences from control were tested by the Dunnett's Multiple Range test when the analysis of variance was significant ( $P < 0.05$ ). Significantly different from the value for YM-14673 or TRH-treated group: \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ . Significantly different from the value of control group: <sup>b</sup> $P < 0.01$ ; <sup>c</sup> $P < 0.05$ .

表 1 5 Effects of YM-14673 and TRH on pentobarbital- and ethanol-induced hypothermia in mice

Treatment	Dose (mg/kg i.v.)	With pentobarbital		With ethanol	
		Temp. (°C)	Delta (°C)*	Temp. (°C)	Delta (°C)*
Saline		33.1 ± 0.5	—	33.3 ± 0.2	—
YM-14673	0.001	32.5 ± 0.5	-0.6		
	0.003	33.5 ± 0.7	0.4		
	0.01	34.4 ± 0.4	1.3*	33.2 ± 0.4	-0.1
	0.03	35.4 ± 0.4	2.3**	34.2 ± 0.2	0.9*
	0.1	36.5 ± 0.3	3.4***	34.6 ± 0.3	1.3**
	0.3			35.5 ± 0.2	2.2***
	1			36.3 ± 0.2	3.0***
Saline		33.0 ± 0.4	—	33.3 ± 0.3	—
TRH	0.01	33.3 ± 0.4	0.3		
	0.03	33.4 ± 0.7	0.4		
	0.1	34.6 ± 0.7	1.6	33.0 ± 0.3	-0.3
	0.3	35.1 ± 0.6	2.1*	33.3 ± 0.2	0
	1	36.1 ± 0.2	3.1***	33.7 ± 0.4	0.4
	3			34.6 ± 0.2	1.3**
	10			35.6 ± 0.3	2.3***

Each value represents the mean ± SE from 7-9 mice

Rectal temperature (°C) in normal mice was 37.7 ± 0.2 (n = 7)

YM-14673 and TRH were administered intravenously to mice 10 min after intraperitoneal pentobarbital (55 mg/kg) and ethanol (25%, 23 ml/kg) and 30 min after the test drug administration rectal temperature was measured

\* Delta: Difference between mean temperature of the group with the test drug and of saline. Significantly different from the value for respective saline group

\* P < 0.05; \*\* P < 0.01; \*\*\* P < 0.001 (Student's t-test)

### 2-3. 脳震盪マウスの行動障害に対するTRHおよびazetirelineの作用

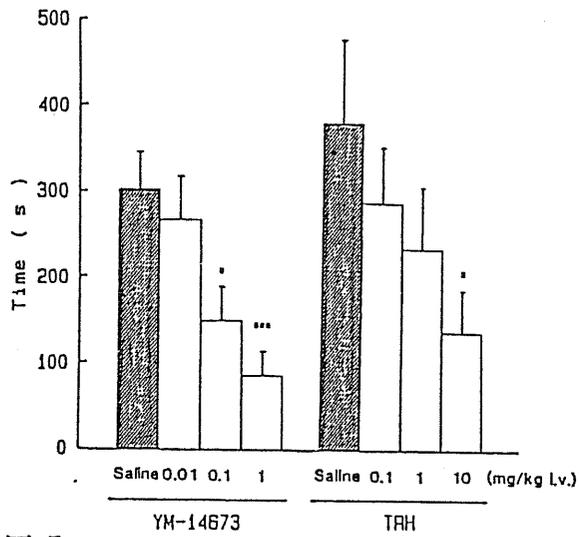
TRH(10mg/kg iv)およびazetireline(0.1-1 mg/kg iv)はDT時間を短縮した(図5)。ED50%はそれぞれ2.5および0.1mg/kgであり、azetirelineの効力はTRHの約25倍であった。

### 2-4. 視床下部破壊ネコの行動および脳波障害に対するTRHおよびazetirelineの作用

TRH(1,10 mg/kg iv)およびazetireline (0.01-1 mg/kg iv)は視床下部破壊により低下した行動スコアを著明に増大し(表16)、行動障害を改善した。また、これらの薬物は視床下部破壊により増大したdelta波出現率を有意に減少させ、自発脳波を賦活化させた(図6,7,8)。Azetirelineの効力はTRHより約100倍強く、脳波賦活に関しazetirelineはTRHより36倍持続的であった(図7,8)。

## 3. 考察

TRHおよびazetirelineはpentobarbital睡眠、低体温およびethanol低体温に対して拮抗作用を示した。また、意識障害モデルすなわち、脳震盪マウスおよび視床下部破壊ネコを用いた実験でTRHおよびazetirelineは行動障害や徐波脳波を改善した。以上の成績からこれら薬剤は低下した意識水準を高める等、中枢賦活作用を有することが示唆された。Azetirelineの効力はTRHの約10-100倍であり、azetirelineの持続はTRHより約8-36倍長かった。頭部外傷や視床下部障害は人間においてしばしば傾眠状態、意識障害、脳波徐波化を示す(11,43)。従って、機械的頭部外傷や視床下部電気破壊モデルは意識障害の病態研究や意識障害に対する薬効評価にしばしば使われる(33,34)。TRHは脳振盪マウスの意識障害(33)および視床下部破壊ネコの徐波脳波を改善した(34)と報告されており、実際TRHはくも膜下出血や頭部外傷に伴う意識障害に対する治療薬として広く使用されている。本実験において、TRHおよびazetirelineはこれらのモデルで改善効果を示し、前述したごとく、pentobarbitalおよび



5 Effects of YM-14673 and TRH on the disturbance of consciousness induced by concussive head injury in mice. Each value represents the mean  $\pm$  SE from 9–12 mice. YM-14673 and TRH were administered intravenously to mice 10 min prior to the head injury. Time: Time from treatment of head injury to the onset of spontaneous movement (DT time). Significantly different from the value for respective saline group: \*  $P < 0.05$ , \*\*\*  $P < 0.001$  (Student's  $t$ -test)

表 1 6. Effects of YM-14673 and TRH on behavioral rating scores in hypothalamic lesioned cats

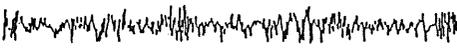
Treatment	Dose (mg/kg i. v.)	n	Behavioral rating score <sup>a</sup>	
			pre-drug	post-drug
Saline		3	0 ± 0	0 ± 0
YM-14673	0.001	4	0 ± 0	0 ± 0
	0.01	4	0 ± 0	1.8 ± 0.3*
	0.1	4	0.3 ± 0.3	2 ± 0*
	1	4	0.3 ± 0.3	3 ± 0*
TRH	0.1	4	0 ± 0	0 ± 0
	1	4	0.3 ± 0.3	2 ± 0*
	10	4	0 ± 0	2.8 ± 0.3*

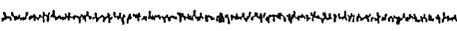
Each value represents the mean ± SE

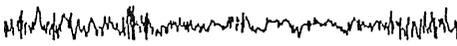
Behavioral changes were evaluated at 10 min after giving YM-14673 or TRH intravenously

<sup>a</sup> Behavioral rating was made from spontaneous behavior, and responsiveness to external stimulation with examiner's fingers and hand-clapping as follows. Score 0: No response spontaneously and to external stimulation; 1: eyes opening to external stimulation; 2: ear moving to external ear stimulation, head lifting up or gazing at observer; 3: moving around spontaneously, miaowing or raging.

Significantly different from the value for respective pre-drug group  
\*  $P < 0.05$  (Mann-Whitney *U*-test)

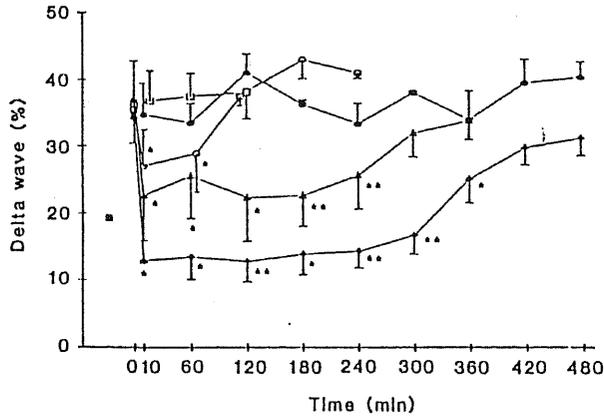
A 

B 

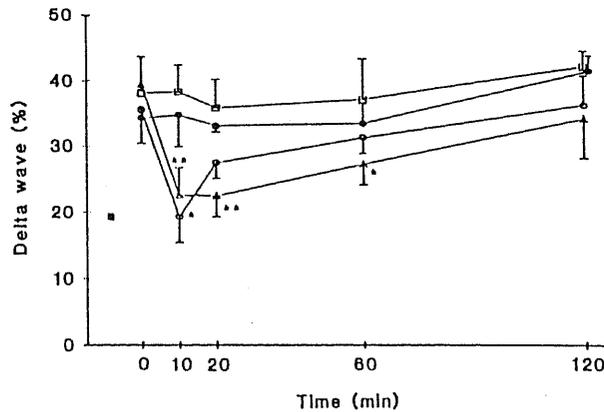
C 

┌ 100  $\mu$ V  
└ 1 s

☒ 6 Effects of YM-14673 (1 mg/kg i.v.) on the spontaneous EEG disturbed by electrolytic lesion of the hypothalamus in a cat. Spontaneous EEG was recorded from the left posterior sigmoid gyrus. *A*: Before drug administration, *B*: 30 min after YM-14673, *C*: 360 min after YM-14673. Voltage and time calibrations: 100  $\mu$ V and 1 s



⊠ 7 Effects of YM-14673 on appearance rate of the delta wave component in hypothalamic lesioned cats. Each point represents the mean  $\pm$  SE from 3-4 cats. ●—●: Saline, □—□: YM-14673 (0.001 mg/kg i.v.), ○—○: YM-14673 (0.01 mg/kg i.v.), △—△: YM-14673 (0.1 mg/kg i.v.), ◇—◇: YM-14673 (1 mg/kg i.v.). ■ shows percent ( $19.2 \pm 0.8$ ,  $n = 3$ ) of delta wave component in sham-operated cats. Percent of delta wave component in hypothalamic lesioned cats was  $36.6 \pm 1.3$  ( $n = 31$ ) before the drug injection. Significantly different from the value for respective pre-drug group: \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$  (Paired  $t$ -test)



⊠ 8 Effects of TRH on appearance rate of the delta wave component in hypothalamic lesioned cats. Each point represents the mean  $\pm$  SE from 3-4 cats. ●—●: Saline, □—□: TRH (0.1 mg/kg i.v.), ○—○: TRH (1 mg/kg i.v.), △—△: TRH (10 mg/kg i.v.). ■ shows percent ( $19.2 \pm 0.8$ ,  $n = 3$ ) of delta wave component in sham-operated cats. Percent of delta wave component in hypothalamic lesioned cats was  $36.6 \pm 1.3$  ( $n = 31$ ) before the drug injection. Significantly different from the value for respective pre-drug group: \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$  (Paired  $t$ -test)

ethanol睡眠や低体温に拮抗する等中枢賦活作用を有することから、これら二剤は意識障害患者の治療薬として期待される。

TRHおよびazetirelineによるpentobarbital睡眠拮抗作用はhaloperidolおよびphentolamineによって影響されず、atropineやbaclofenにより拮抗されたことから、TRHおよびazetirelineのpentobarbital拮抗作用に脳内アセチルコリンおよびGABA神経系の関与が考えられる。尚、本実験のTRHの成績は他家のTRHの成績とほぼ一致していた(41,44)。また、本実験で使用した意識障害モデルでの生化学的変動を観察した報告はないが、別の頭部外傷モデルで脳内エネルギー代謝およびノルアドレナリン、ドパミン、セロトニン等の脳内モノアミン神経活性が低下しているという報告はある(45)。第1章および第2章第4節の薬理実験で示したようにTRHおよびazetirelineが脳内モノアミン神経系を賦活すること、生化学実験においてTRHおよびazetirelineはラット大脳皮質アセチルコリン遊離および脳内モノアミン代謝産物(DOPAC=3,4-dihydroxyphenyl acetic acid, HVA=homovanillic acid, 5HIAA=5-hydroxyindole acetic acid)を著明に増加することが観察されている(岡田、未発表)。このほか、寺井らはpentobarbitalラットの低下した局所脳グルコース利用率(LCGU=local cerebral glucose utilization)がazetirelineにより改善したことを観察している。以上本節および他家の成績からTRHおよびazetirelineの意識賦活作用に脳内モノアミン、アセチルコリン神経系ばかりでなく、脳内エネルギー代謝賦活作用も関与する可能性が考えられる。

#### 4. 小括

1. TRHおよびazetirelineはpentobarbitalおよびethanolの投与により意識レベルを低下させたマウスにおける睡眠および低体温に対し拮抗作用を示した。Azetirelineの作用はTRHより約10-40倍強く、約8-36倍持続的であった。
2. TRHおよびazetirelineのpentobarbital睡眠拮抗作用は下垂体系を介することなく、一部に脳内アセチルコリン神経やGABA神経系を介

した作用と考えられる。これら二剤を14日間連続投与しても一回投与時と同様なpentobarbital睡眠拮抗作用を示した。

3. 脳震盪マウスおよび視床下部破壊ネコの行動障害および徐波脳波に対し、TRHおよびazetirelineは改善作用を示した。Azetirelineの効力はTRHの約25-100倍であり、azetirelineの視床下部破壊ネコでの脳波改善作用はTRHの約36倍持続的であった。
4. 以上の実験成績から、TRHおよびazetirelineは意識障害改善作用を有すること、azetirelineは持続型のTRH誘導体であることがわかり、意識障害の領域で有効性が期待された。

## 第2節 学習行動障害改善作用

TRHおよびTRH誘導体は学習行動障害改善作用等の脳機能賦活作用を有する(36-39)ことから、老年性痴呆において臨床治験が行われている(46)。ところで、老年痴呆の適切なモデルはないのが現状だが、種々の学習行動障害モデルが薬効評価に使用されている。そのうち、抗コリン薬scopolamine、蛋白合成阻害薬cycloheximide等の投与、低酸素負荷や脳虚血モデルおよび老化促進モデルは頻用されている。なお、既知の学習行動障害モデルでの薬効評価は障害を惹起させる為の処置を行う前または同時に被験薬物を投与する等、臨床との対応という点で満足いくモデルとは言い難たい。本節では、TRHおよびazetirelineの脳機能に対する作用を調べる目的でまず既知のモデルを用いて受動回避学習行動障害に対する作用を検討した。さらに、臨床とより対応した中大脳動脈閉塞[middle cerebral artery occluded(MCA)]ラットを用い慢性脳虚血モデルを新規に確立し、同モデルでの受動回避学習行動障害に対するTRHおよびazetirelineの作用を観察した。

### 2. 実験方法

雄ICRマウス(体重約25g)、雄Wistarラット(体重約300g)、雄スナネズミ(体重約70g)、6カ月令雄老化促進マウス(senescence

accelerated mouse=SAM-P、体重約35g)およびcontrolとして亜系の senescence accelerated mouse R系= SAM-R、体重約35g)(47)を使用した。学習行動は受動回避反応を用いて行った。装置は明暗2室からなる明暗箱を用い、訓練はラット、マウスまたはスナネズミを明室に入れ、それらの動物が暗室に入った途端に床から電気ショックを受けるようにした。訓練24時間後に再び動物を明室に入れ、その動物が暗室に入るまでの移動時間を測定することにより薬効評価を行った。

#### 1-1. Scopolamineラット

Scopolamine 1 mg/kg およびazetirelineを学習訓練30分前にラットへ腹腔内投与し、TRHを訓練15分前に腹腔内投与した。

#### 1-2. Cycloheximideマウス

Cycloheximide 150 mg/kg をマウスへ学習訓練30分前に皮下投与した。尚、TRHを訓練15分前にazetirelineを訓練30分前に、経口投与した。

#### 1-3. 低酸素ラット

学習訓練直後、けいれんを惹起するまで100%窒素ガス吸入によりラットへ低酸素負荷した。尚、被験薬物を低酸素負荷直後に腹腔内または経口投与した。

#### 1-4. 脳虚血スナネズミ

2%halothane麻酔下にスナネズミの両側総頸動脈を5分間結紮し、3日目にTRHおよびazetireline を学習訓練15分前に腹腔内投与した。

#### 1-5. 脳虚血ラット

2%halothane麻酔下にラット左側中大脳動脈(MCA)を閉塞した。薬理実験を行うに先立ち、MCA閉塞3日目に学習訓練し、閉塞4日、2,4,8,16週間後にテストを行った。薬理実験においては、閉塞3日目に学習訓練し、閉塞1,2および3週間目にテストを行った。Azetirelineを閉塞

直後から3週間腹腔内および経口投与し、学習訓練日には訓練30分前に投与した。また、TRHおよびazetirelineが脳虚血慢性期から投与されることから、別の実験で閉塞1週間後からこれら二剤を2週間腹腔内投与し、学習訓練日には訓練30分前に投与した。この実験では閉塞1週間後に学習訓練し、2および3週間後にテストを行った。

## 1-6. 老化促進マウス

6カ月令雄老化促進マウス(senescence accelerated mouse=SAM-P, 体重約35g)およびcontrolとして亜系のsenescence accelerated mouse R系=SAM-R, 体重約35g)を用いた(47)。薬物を20日間経口投与し、20日目のTRHおよびazetireline投与それぞれ15および30分後に訓練を行い、学習訓練24時間後にテスト試行を行った。

## 2. 実験成績

### 2-1. Scopolamineラット学習行動障害に対するTRHおよびazetirelineの作用

TRH(0.1 mg/kg ip, 1 mg/kg po)およびazetireline(0.01, 0.1 mg/kg ip, 0.1, 1 mg/kg po)はscopolamineによるラットの暗室への移動時間短縮を改善した(表17)。

### 2-2. Cycloheximide マウス学習行動障害に対するTRHおよびazetirelineの作用

TRH(10, 30 mg/kg po)およびazetireline(1, 10 mg/kg po)はcycloheximideによるマウスの暗室への移動時間短縮を改善した(表18)。

### 2-3. 低酸素ラット学習行動障害に対するTRHおよびazetirelineの作用

TRH(1, 10 mg/kg ip, 10 mg/kg po)およびazetireline(0.1, 1 mg/kg ip, 1, 10 mg/kg po)は低酸素によるラットの暗室への移動時間短縮を改善した(表19)。

表 1.7 Effects of YM-14673, TRH, CDP-choline and physostigmine on step-through passive avoidance response in scopolamine-treated rats

Treatment	Dose (mg/kg)	Latency of step-through (s)
Control	—	48 ± 10
YM-14673	0.001 i.p.	58 ± 30
	0.01	158 ± 36**
	0.1	141 ± 36*
	1	48 ± 25
Control	—	51 ± 16
TRH	0.01 i.p.	61 ± 31
	0.1	202 ± 48*
	1	52 ± 28
Control	—	58 ± 20
CDP-choline	100 i.p.	54 ± 22
	300	87 ± 44
	1 000	53 ± 8
Control	—	53 ± 31
Physostigmine	0.05 i.p.	89 ± 34
	0.1	190 ± 32**
	0.2	130 ± 45
	0.4	80 ± 33
Control	—	50 ± 14
YM-14673	0.01 p.o.	88 ± 23
	0.1	105 ± 15*
	1	139 ± 24*
	10	63 ± 12
Control	—	50 ± 14
TRH	0.1 p.o.	80 ± 13
	1	139 ± 25**
	10	86 ± 33

Each value represents the mean ± SE from 8–9 rats. Latency of step-through in normal rats was 236 ± 84 s ( $N=8$ , mean ± SE). YM-14673 and TRH were administered intraperitoneally and orally, 30 and 15 min before training of passive avoidance task, respectively. CDP-choline and physostigmine were administered intraperitoneally 30 min before training. Significantly different from the value for control group: \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$  (Mann-Whitney  $U$ -test)

表 1 8. Effects of YM-14673, TRH and CDP-choline on step-through passive avoidance response in cycloheximide-treated mice

Treatment	Dose (mg/kg)	Latency of step-through (s)
Control	—	69 ± 15
YM-14673	0.1 p.o.	129 ± 39
	1	213 ± 33**
	10	227 ± 31**
Control	—	69 ± 15
TRH	3 p.o.	82 ± 28
	10	262 ± 20**
	30	141 ± 27*
Control	—	56 ± 10
CDP-choline	30 i.p.	43 ± 11
	100	60 ± 13
	300	61 ± 13

Each value represents the mean ± SE from 10 rats. Latency of step-through in normal mice was 236 ± 31 s ( $N = 9$ , mean ± SE). YM-14673 and TRH were administered orally 30 and 15 min before training of passive avoidance task, respectively. CDP-choline was administered intraperitoneally 30 min before training. Significantly different from the value for control group: \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$  (Mann-Whitney  $U$ -test)

表 1 9 Effects of YM-14673, TRH and CDP-choline on step-through passive avoidance response in anoxic rats

Treatment	Dose (mg/kg)	Latency of step-through (s)
Control	—	53 ± 2
YM-14673	0.01 i.p.	74 ± 15
	0.1	125 ± 29**
	1	176 ± 29**
Control	—	80 ± 23
TRH	0.1 i.p.	81 ± 22
	1	215 ± 40*
	10	215 ± 33*
Control	—	80 ± 24
CDP-choline	100 i.p.	125 ± 37
	300	103 ± 32
	1 000	43 ± 8
Control	—	77 ± 33
YM-14673	0.1 p.o.	151 ± 45
	1	241 ± 31**
	10	199 ± 40**
Control	—	77 ± 33
TRH	3 p.o.	130 ± 37
	10	220 ± 41**
	30	180 ± 40

Each value represents the mean ± SE from 8 rats. Latency of step-through in normal rats was 241 ± 49 s ( $N = 8$ , mean ± SE). Drugs were administered intraperitoneally and orally immediately after anoxic treatment. Significantly different from the value for control group: \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$  (Mann-Whitney  $U$ -test)

#### 2-4. 脳虚血スナネズミ学習行動障害に対するTRHおよびazetirelineの作用

TRH(1 mg/kg ip)およびazetireline(0.1, 1 mg/kg ip)は脳虚血によるスナネズミの暗室への移動時間短縮を改善した(表20)。

#### 2-5. 脳虚血ラット学習行動障害に対するTRHおよびazetirelineの作用

図9, 10に示すように、MCA閉塞16週間後まで学習行動障害が観察された。Azetireline(0.1, 0.3 mg/kg ip, 1 mg/kg po)をMCA閉塞直後から3週間投与した場合、図11に示すようにラットの脳虚血による暗室への移動時間短縮が改善された。また、MCA閉塞1週間後から2週間azetireline(0.1 mg/kg ip)(表21)およびTRH(1, 10 mg/kg ip)(表22)を投与すると、ラットの脳虚血による暗室への移動時間短縮が改善された。

#### 2-6. 老化促進マウス学習障害に対するTRHおよびazetirelineの作用

表23に示すように、SAM-Pの暗室への移動時間はSAM-Rに比較し有意に短かった。TRH(10 mg/kg po)およびazetireline(1, 10 mg/kg po)を20日間投与すると暗室への移動時間の短縮が改善され、これら二剤に学習行動障害改善作用を有することが示唆された(表23)。

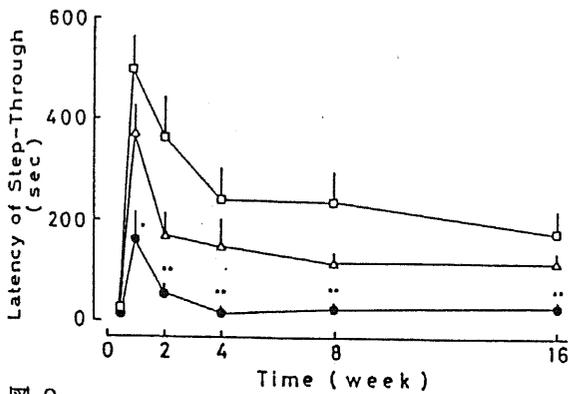
### 3. 考察

TRHおよびazetirelineはscopolamine, cycloheximide、低酸素、脳虚血(両側総頸動脈一時結紮スナネズミ、MCAラット)処置した動物および老化促進マウスの学習行動障害を改善したが、azetirelineの効力はTRHの約10倍であった。以上の実験成績からTRHおよびazetirelineには脳機能賦活作用を有することがわかった。尚、TRHのcycloheximide, scopolamine, 低酸素処置げっ歯類での学習障害改善作用は他家のものとはほぼ一致していた(36-38)。動物実験での学習行動の全てを臨床における記憶学習

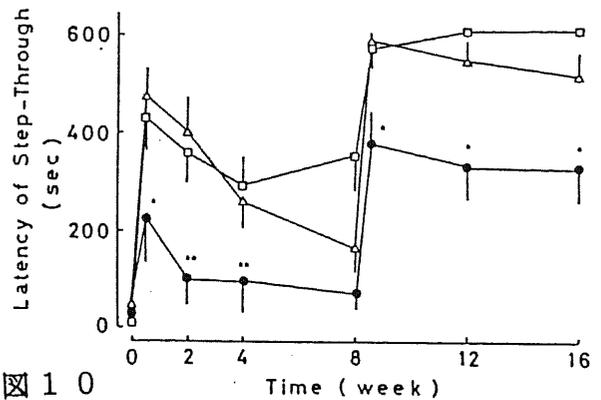
表 2 0 Effects of YM-14673, TRH and CDP-choline on step-through passive avoidance response in cerebral ischemia-treated gerbils

Treatment	Dose (mg/kg i.p.)	Latency of step-through (s)
Control	—	37 ± 7
YM-14673	0.01	46 ± 12
	0.1	112 ± 15**
	1	122 ± 24**
Control	—	26 ± 8
TRH	0.1	19 ± 3
	1	95 ± 15**
	10	25 ± 8
Control	—	36 ± 15
CDP-choline	100	53 ± 15
	300	25 ± 5
	1 000	65 ± 29

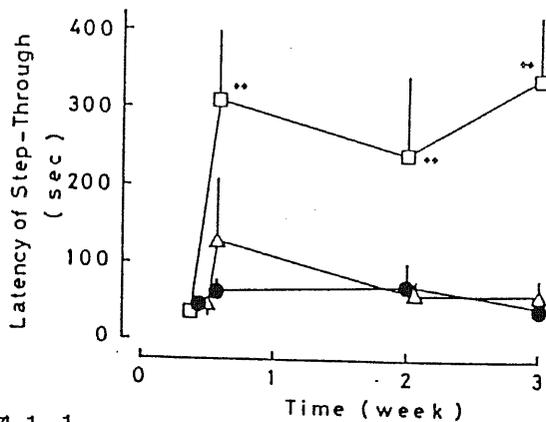
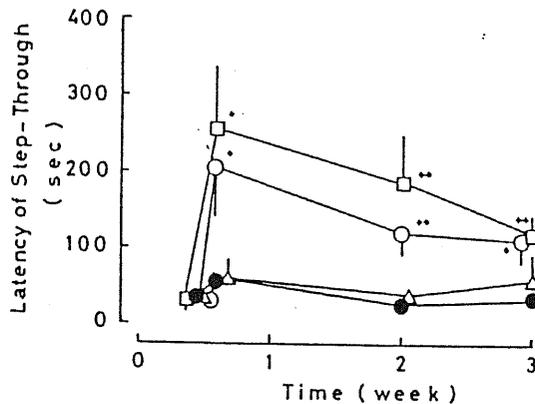
Each value represents the mean ± SE from 7–8 gerbils. Latency of step-through in normal gerbils was 275 ± 16 s ( $N = 8$ , mean ± SE). YM-14673, TRH and CDP-choline were administered intraperitoneally 30, 15 and 30 min before training of passive avoidance task, respectively. Significantly different from the value for control group: \*\*  $P < 0.01$  (Mann-Whitney  $U$ -test)



☒ 9 Latency of step-through in passive avoidance task in normal, sham-operated and MCA-occluded rats. Each point represents the mean  $\pm$  S.E.M. from 6-8 rats. □: normal rats; △: sham-operated rats; ●: MCA-occluded rats. Rats were trained at 3 days after the operation and latency of step-through was measured at 4 days, 2, 4, 8 and 16 weeks after the operation. Significantly different from sham-operated values: \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  (Mann-Whitney *U*-test).



☒ 10 Latency of step-through in passive avoidance task in normal, sham-operated and MCA-occluded rats subjected to re-training at 8 weeks after the operation. Each point represents the mean  $\pm$  S.E.M. from 9-13 rats. □: normal rats; △: sham-operated rats; ●: MCA-occluded rats. The rats were trained at 3 days and 8 weeks (56 days) after the operation, and the testings were conducted at 4 days, 2, 4, 8 weeks, 57 days, 12 and 16 weeks. Significantly different from sham-operated values: \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  (Mann-Whitney's *U*-test).



⊠ 1 1 Effects of YM-14673 administered intraperitoneally (top) and orally (bottom) daily for 3 weeks on latency of step-through of one-trial passive avoidance response in rats after occlusion of left middle cerebral artery. Each point represents mean  $\pm$  SEM from 7-10 rats. Latency on Day 3 is conditioning trial, and subsequent data points on Day 4 and Weeks 2 and 3 represent test trials. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  significantly different from solvent-treated control by Mann-Whitney U test. For top: ●, saline solvent; Δ, 0.03 mg/kg i.p. YM-14673; □, 0.1 mg/kg i.p. YM-14673; ○, 0.3 mg/kg i.p. YM-14673. For bottom: ●, distilled water solvent; Δ, 0.1 mg/kg p.o. YM-14673; □, 1 mg/kg p.o. YM-14673.

表 2 1 Effects of YM-14673 on Neurologic Deficit and Passive Avoidance Response Latency in Rats Subjected to Permanent Middle Cerebral Artery Occlusion

Treatment	n	Neurologic deficit score			Response latency (sec)	
		1 wk	2 wk	3 wk	2 wk	3 wk
Sham operation	6	0	0	0	300±0	300±0
Occlusion						
Saline	5	3.0±0.4	3.4±0.2	3.0±0.3	59±22	84±30
YM-14673	8	3.5±0.3	1.8±0.3*	0.9±0.2†	184±41*	233±30*

Data are mean±SEM.

\*† $p < 0.05, 0.01$ , respectively, different from saline by Mann-Whitney  $U$  test.

表 2 2

Effects of TRH on passive avoidance response latency in rats subjected to permanent middle cerebral artery occlusion. The value represents mean±SE. \*P<0.05 Significantly different from saline control by Mann-Whitney U test. Drugs were administered intraperitoneally for 2 weeks once daily from 1 week after the occlusion.

Treatment	Dose (mg/kg ip)	N	Response latency (sec)	
			2 wk	3 wk
Sham operation		6	300±0	300±0
Occlusion				
Saline		8	37±7	33±17
TRH	1	8	145±46 *	107±36
	10	6	170±45 *	167±49 *
	multiple 1)	8	172±49 *	132±44 *
SALINE		5	59±22	84±30
YM-14673	0.1	8	184±41 *	233±30 *

1) TRH was administered by the schedule described in methods and figure 1.

表 2 3

EFFECTS OF YM-14673 AND TRH ON THE STEP-THROUGH PASSIVE  
AVOIDANCE RESPONSE IN SAM

SAM	Treatment	Dose (mg/kg PO)	N	Latency of Step-Through (sec)
R/1	Solvent	—	9	266 ± 13
P/8	Solvent	—	10	110 ± 24*
	YM-14673	0.1	8	190 ± 39
		1	8	218 ± 36†
		10	8	238 ± 33†
		TRH	1	8
		10	8	221 ± 34†

Each value represents the mean ± SE. The solvent and drugs were administered orally once a day for 20 days and thereafter administered 30 min before training on 21st day after first administration. Significantly different from the value for SAM-R/1: \* $p < 0.01$  (Mann-Whitney U-test). Significantly different from the value for solvent group in SAM-P/8: † $p < 0.05$ , statistically significant at  $p = 0.012$  by Kruskal-Wallis H-test. Each comparison was done by Mann-Whitney U-test.

と関連づけることはできないが、少なくとも学習行動実験により脳の機能変化をとらえうることは確かである。事実、学習行動障害改善作用を有する薬物は既に多くあり、そのうち一部の薬物は脳血管障害患者の自発性低下や情緒障害に改善作用を示している。一方、脳血管障害や老年痴呆患者の記憶学習障害を改善した薬物はないが、現在多くの薬物が臨床において治験を行っている。このように、老年痴呆患者における記憶学習障害等の中核症状を動物実験で評価するのは難しいが、本成績から、TRHおよびazetirelineは脳血管障害や老年痴呆等脳器質性疾患患者における自発性低下、情緒障害、見当識障害、記憶学習等の精神症状を改善することが期待しうる。

脳虚血モデルでの学習行動障害に対するTRHの効果をみた報告はない。薬理実験を行うに先立ちMCAラットを用いて局所脳虚血後の慢性期における学習行動変化を観察した。その結果、MCA閉塞16週間後まで受動回避学習行動が障害されることがわかった。本研究で用いたMCAラットは大脳皮質、線条体が(48)、両側総頸動脈一時結紮スナネズミは海馬が特異的に障害されるモデルである(49)。これらの脳部位は学習機能を調整する部位として知られている。TRHおよびazetirelineはMCAラットで脳組織障害に対して影響を及ぼさないこと(第4章第2節)および中枢賦活作用を有することから、脳虚血学習行動障害に対するこれら二剤の改善作用は梗塞周辺の残存細胞や脳幹網様体等の中枢賦活系活性を促進する作用に基づくと考えられる。

学習機能の調整に中枢アセチルコリン(50)やモノアミン神経系活性(51)等が関与することがよく知られている。Scopolamineおよびcycloheximideはこれらの神経系活性を低下させることから、これら薬物を投与した学習行動障害モデルは学習機能に対する薬物評価実験に頻用されている(52)。TRHおよびazetirelineがreserpine拮抗作用を示すこと(53)、これら二剤のpentobarbital睡眠拮抗作用がatropineで拮抗される(54)ことからTRHおよびazetirelineに脳内アセチルコリンおよびモノアミン神経系賦活作用を有することが示唆されている。従って、TRHおよびazetirelineの学習行動障害改善作用にこれらの神経系賦活作用の関与が考えられる。

老年痴呆の適切なモデルはないのが現状であり、老化促進マウスも病態研究や薬効評価に使われているものの決して満足いくモデルではない。老化促進マウスの平均寿命は約10カ月で正常マウスが約20カ月であるのに比較して短く(47)、生後約2カ月より学習行動障害が観察される(55)。病理学的には、アミロイド蛋白の沈着がみられるが、老年痴呆患者のそれとは異なることがわかっている(56)。本モデルにおいて海馬モノアミン含量低下が観察されており(57)、TRHおよびazetirelineが脳内モノアミン神経賦活作用を有することから(53)、これら二剤の学習障害改善作用に脳内モノアミン神経系賦活作用が関与しているかも知れない。

#### 4. 小括

1. TRHおよびazetirelineはscopolamine, cycloheximide, 低酸素および脳虚血処置モデル、また老化促進マウスの受動回避学習行動障害に対し改善作用を示しこれら二剤に脳機能賦活作用を有することが示唆された。なお、azetirelineの効力はTRHの約10倍であった。
2. 脳血管障害、老年痴呆等脳器質性疾患において見当識障害、記憶学習障害等精神症状が観察されており、脳機能が低下していることがわかっている。TRHおよびazetirelineは脳機能賦活作用を有することから、脳器質性疾患において低下した脳機能を改善する可能性が示唆された。

#### 第2節 運動失調改善作用

TRHはRolling Mouse Nagoyaモデル(58)、Weaver マウス(12)やcytosine arabinoside マウス(12)等の運動失調モデルにおいて運動失調改善作用を示し、現在脊髄小脳変性症に伴う運動失調の治療薬として使用されている(13)。そこで本章においては簡便に作成しうる点でスクリーニングに適したcytosine arabinosideマウスを用いてTRHおよびazetirelineの運動失調に対する作用をTRHと比較検討した。

## 1. 実験方法

雄ICR新生マウスを使用した。蛋白合成阻害剤cytosine arabinoside 40 mg/kgをマウスへ出生2、3日目に皮下投与し、投与4-5週間目後にそのマウスを実験に供した。転倒回数および自発運動量を第1実験日に生理食塩水投与後30分間及び第2実験日に被験薬物投与後30分間測定し、歩行失調の程度を転倒回数/自発運動量 $\times 100$ により評価した。

## 2. 実験成績

TRH(10, 30 mg/kg ip)およびazetireline (0.1, 1 mg/kg ip)はcytosine arabinosideマウスの歩行失調の程度を有意に低下させた(表24)。

## 3. 考察

TRHおよびazetirelineはcytosine arabinosideマウスの歩行障害に対し改善作用を示したが、azetirelineの効力はTRHより約30倍強かった。脊髄小脳変性症患者における主症状は歩行障害である。TRHはRolling Mouse Nagoya(35)、Weaver Mouse(12)およびcytosine arabinosideマウス(12)の歩行障害に対して改善作用を示し、脊髄小脳変性症患者の治療薬として使用されている(13)。従って、azetirelineがこの領域で臨床治験を行う価値は高いと考えられた。Cytosine arabinosideマウスの歩行失調と生化学的変動との詳細な関連性は現在不明であり、今後検討を要する。しかし、TRHおよびazetirelineは脳内モノアミン神経系賦活作用を有することから(53)、これら薬物の歩行失調改善作用に脳内モノアミン神経系賦活作用が一部関与しているかもしれない。

## 4. 小活

TRHおよびazetirelineはcytosine arabinosideマウス運動失調を改善した。Azetirelineの効力はTRHの約30倍であった。

表 2 4

Effects of YM-14673 and TRH on cytosine arabinoside-induced ataxia in mice. Each value represents the mean  $\pm$  S.E.

Treatment	Dose (mg/kg i.p.)	N	Degree of ataxic gait <sup>a</sup>	
			Saline (1st day)	Drug (2nd day)
Saline		5	8.9 $\pm$ 0.7	9.1 $\pm$ 0.7
YM-14673	0.1	5	13.0 $\pm$ 1.2	8.5 $\pm$ 2.7
	1	5	7.8 $\pm$ 2.0	2.9 $\pm$ 0.9 <sup>b</sup>
TRH	10	5	10.0 $\pm$ 0.8	6.0 $\pm$ 1.6
	30	5	6.8 $\pm$ 0.6	2.6 $\pm$ 0.6 <sup>c</sup>

<sup>a</sup> Degree of ataxic gait (falling index): (the ratio of the number of inversions to spontaneous motor activity)  $\times$  100. Spontaneous motor activity and the number of inversions were measured for 30 min after both saline (1st day) and drug administration 24 h after saline injection (2nd day) in the same animal. Significantly different from the pre-drug measurement (1st day): <sup>b</sup>  $P < 0.05$ , <sup>c</sup>  $P < 0.01$  (paired t-test).

## 第4節 抗うつ作用

抗うつ薬のスクリーニングとして reserpine 反応に対する作用を観察することがよく行われる。TRHは reserpine 低体温に拮抗作用を示すことから(8-10)、うつ病患者において臨床治験が行われてきた(14)。しかし、これらの臨床治験において必ずしもよい結果が得られているとはいえない。そこで、本節においてはTRHおよびTRHよりも半減期の長い azetireline の reserpine マウス低体温、けいれん閾値低下、および reserpine ネコ PGO 波に対する作用を検討した。

### 1. 実験方法

#### 1-1. 体温低下

雄ICRマウス(体重約25g)を用いた。Reserpine 2 mg/kg を皮下投与した18時間後に被験薬物を静脈内および経口投与し、投与前後の直腸温差を観察した。Control群の体温を2°C上昇させる投与量ED<sub>2</sub>°Cを用量作用曲線から求めた。

#### 1-2. けいれん閾値低下

雄ICRマウス(体重約25g)を用いた。Reserpine 2 mg/kg 皮下投与18時間後に被験薬物を静脈内投与したマウスに硬直性けいれんを引き起こすよう電気刺激(50Hz, 0.2s)を与えた。半分のマウスがけいれんを引き起こす電位(ED<sub>50</sub>)を30%上昇させる投与量ED<sub>30%</sub>を用量作用曲線から求めた。

#### 1-3. Ponto-genicullo-occipital (PGO) 波

雌雄別なくネコを使用し、ガラミン不動化した。外側膝状体(A; 7.0, L:10.5, V:+6.0--3.0、Snider and Niemer の脳図譜による(42)に脳波記録用双極同心円電極を刺入し、スパイク様のPGO(ponto-genicullo-occipital)波を測定した。Reserpine 0.5 mg/kg (ip)投与後5時間目よ

り薬物を30分毎に静脈内投与した。薬効評価は30分間のPGO波の出現数を記録して行い、PGO波出現数を25%抑制するED25%を用量作用曲線から求めた。

## 2. 実験成績

### 2-1. Reserpine低体温に対するTRHおよびazetirelineの作用

Reserpineによる体温低下はTRH投与により有意に拮抗された。TRHおよびazetirelineのED<sub>2</sub>°Cはそれぞれ0.4, 0.02 mg/kg (iv)であり(表25)、azetirelineの効力はTRHの約20倍強力であった。TRHおよびazetireline 0.1 mg/kg (iv)の持続時間はそれぞれ30、180分であった(図12、13)。

### 2-2. Reserpineけいれん閾値低下に対するTRHおよびazetirelineの作用

TRHおよびazetirelineは用量依存的にreserpineによるけいれん閾値低下に拮抗した。ED30%はそれぞれ0.1, 0.01 mg/kg (iv)であり、azetirelineの効力はTRHの約10倍であった(表25)。

### 2-3. Reserpine PGO波に対するTRHおよびazetirelineの作用

Reserpine 投与5時間後のPGO波出現数は約21.1±3.8であった。TRH(3-10 mg/kg)およびazetireline(0.3-10 mg/kg)は有意にPGO波出現数を減少させた(図14)。ED25%はそれぞれ1.1 および0.14 mg/kg (iv)であり、azetirelineの効力はTRHより約8倍であった(表25)。

## 3. 考察

TRHおよびazetirelineはマウスreserpine低体温、マウスけいれん閾値低下およびネコreserpinePGO波出現に対し拮抗作用を示した。Reserpine低体温は主に中枢ノルアドレナリン神経系が(59)、けいれん閾値低下およびPGO波出現は主に中枢セロトニン神経系が(59, 60)関与するとい

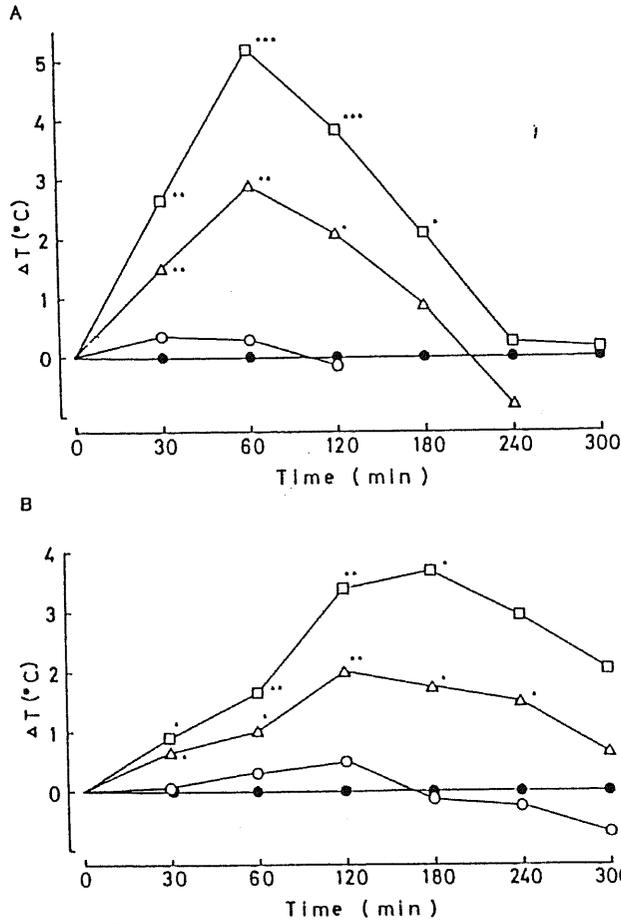
表 2 5. Effects of YM-14673 and TRH on reserpine-induced hypothermia, facilitation of convulsion and PGO wave

Treatment	ED (mg/kg)		
	Hypothermia <sup>a</sup>	Convulsion <sup>b</sup>	PGO wave <sup>c</sup>
YM-14673	0.02 IV 0.3 PO	0.01 IV	0.14 IV
TRH	0.4 IV 6.0 PO	0.1 IV	1.1 IV

<sup>a</sup> Reserpine, 2 mg/kg SC, was given to mice 18 h before intravenous or oral administration of the test compounds. The ED<sub>2°C</sub>, the doses to increase rectal temperature by 2° C was obtained from the dose-response curves. For each dose of the test drugs 7 mice were used

<sup>b</sup> Reserpine, 2 mg/kg SC, was given to mice 18 h before intravenous administration of the test drugs. The ED<sub>30%</sub>, the dose to elevate the current (EC<sub>30</sub>), which caused tonic extensor convulsions in half of mice, by 30% was obtained from dose-response curves. For each dose of the test drugs 9-10 mice were used

<sup>c</sup> Reserpine, 0.5 mg/kg IP, was given to cats 5 h before intravenous administration of the test compounds. The test compounds were administered in increasing doses at intervals of 30 min. ED<sub>25%</sub>, the doses to inhibit appearance of PGO wave by 25% was obtained from dose-response curves. For the each test compound 4 cats were used



1 2. Effects of YM-14673 on reserpine-induced hypothermia in mice. Vertical scale shows the average difference between the rectal temperature just before and after the administration of the test compound at each time. Each value represents the mean from seven mice. YM-14673 was intravenously (A) and orally (B) administered to mice 18 h after subcutaneous administration of reserpine (2 mg/kg). A —●— control; —○— 0.01 mg/kg; —△— 0.03 mg/kg; —□— 0.1 mg/kg; B —●— control; —○— 0.1 mg/kg; —△— 0.3 mg/kg; —□— 1 mg/kg. Significantly different from the value for respective control group: \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$  (Student's *t*-test)

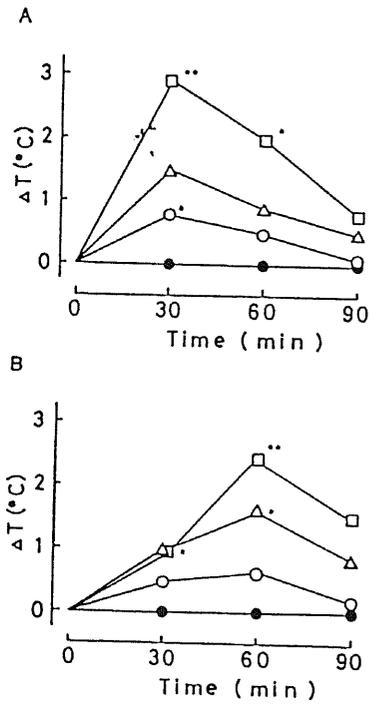
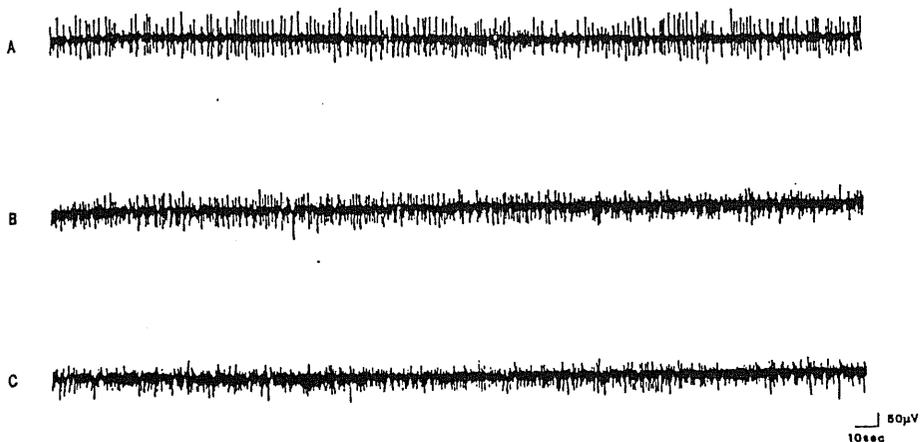


Fig 1.3 Effects of TRH on reserpine-induced hypothermia in mice. Vertical scale shows the average difference between the rectal temperature just before and after the administration of the test compound at each time. Each value represents the mean from seven mice. TRH was intravenously (A) and orally (B) administered to mice 18 h after subcutaneous administration of reserpine (2 mg/kg). A —●— control; —○— 0.1 mg/kg; —△— 0.3 mg/kg; —□— 1 mg/kg; B —●— control; —○— 1 mg/kg; —△— 3 mg/kg; —□— 10 mg/kg. Significantly different from the value for respective control group: \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$  (Student's *t*-test)



14 Effects of YM-14673 on the reserpine-induced PGO waves in a gallamine-immobilized cat. PGO waves were recorded from the lateral geniculate body. The compound was administered intravenously in increasing doses at intervals of 30 min. Voltage and time calibrations: 50  $\mu$ V and 10 s. A: Before drug administration, B: Thirty minutes after YM-14673 (0.03 mg/kg IV). The number of PGO waves was not affected. C: Thirty minutes after YM-14673 (0.3 mg/kg IV). The number of PGO waves was decreased by administration of YM-14673

う報告があり、本実験成績からTRHおよびazetirelineは脳内モノアミン神経系を賦活することが示唆された。TRHの成績は他家の報告と一致しており(61,62)、azetirelineの効力はTRHの約8-20倍強く、約6倍持続性のものであった。生化学的研究において寺井らはazetirelineが脳内ドパミン、ノルアドレナリンおよびセロトニン含量に影響なく、それらの代謝物含量を増大することから、本薬は脳内モノアミン神経系賦活作用を有することを示唆した(63)。

うつ病患者において脳内ノルアドレナリンやセロトニン神経系活性の低下がみられるが(64)、これらの低下したモノアミン神経系を賦活する多くの薬物はうつ病患者で抗うつ活性を示すことが知られている(65)。実際、TRHは抗うつ活性を有するという報告もある(14)。しかし、TRHの効果はまちまちであるが、これはTRHの半減期が短いためであるという可能性が考えられる。AzetirelineはTRHより強力な抗reserpine作用を示すことから、脳器質性疾患患者での精神症状やうつ病の治療に有益かも知れない。

#### 4. 小活

1. TRHおよびazetirelineはreserpine処置動物の低体温、けいれん閾値低下およびPGO波出現に対し拮抗作用を示し、これら二剤に脳内モノアミン神経系賦活作用を有することが示唆された。Azetirelineは強力で持続型TRH誘導体であることがわかった。
2. TRHおよびazetirelineは抗reserpine作用を示したことから抗うつ活性を有することが示唆された。

### 第3章 慢性脳虚血モデルにおける神経症状に対するTRHおよび azetirelineの薬効評価に関する薬理的検討

脳血管障害患者においてはその後遺症として精神症状（自発性低下、感情障害等）、自覚症状（頭重、めまい等）および神経症状（片まひ等）が観察される。これらの症状の中で精神症状および自覚症状はそれぞれ多くの脳代謝賦活剤および脳循環改善剤により改善効果が観察されているが、一方、片まひ等神経症状に臨床応用が認められているのは citidine diphosphate choline(CDP-choline)一剤にすぎないのが現状であり、この領域の薬剤開発が強く望まれている。

Fadenらはオピオイド拮抗薬naloxoneが脊髄損傷および脳虚血モデルにおける神経症状を改善したと報告した(26)。さらに、オピオイド拮抗作用を有するTRHも脊髄損傷で神経症状改善作用を有することを報告したが(66)、脳虚血モデルの神経症状には影響を示さなかった。一方、Yamamotoらはazetirelineがオピオイド拮抗作用を示すことを確かめた(67)。脊髄損傷と脳虚血には多くの共通した病態変化が考えられており、脳虚血モデルに対してTRHが無効であったのはTRHの半減期が短いこと、又、薬効評価に適切な脳虚血モデルがないことによると考えられた。また、TRH(68)およびCDP-choline(69)はウサギ脳幹部電気刺激によりえられた誘発筋放電の閾値を下降させた。これらの成績からTRHおよびCDP-cholineが運動神経系のうち随意運動系である錐体路を賦活する可能性が示唆された。ところで、脳虚血モデルにおいても片まひ等の神経症状が惹起されるが、その成因として、錐体路の障害による可能性が考えられる。CDP-cholineは脳虚血モデル(70)および脳血管障害患者における片まひ等神経症状(71)に対して改善作用を示した。従って、TRHやazetirelineが脳虚血モデルにおける神経症状にその改善効果が期待された。

そこで本章においては、まず既知の慢性脳血腫モデルを用いて上記薬剤の神経症状に対する効果を検討した。さらに、薬効評価に適切な慢性脳虚血モデルを新規に確立し、単回および頻回投与によるTRHや持続型TRH誘導体azetirelineの脳虚血モデル神経症状に対する作用を観察した。

## 第1節 既知の脳血腫ラットにおける神経症状に対するTRHおよびazetirelineの薬効評価

本節においてazetirelineが脳血管障害慢性期から投与されることを考慮にいれ、既知の慢性期脳虚血モデルすなわち脳血腫ラット(72)を用いて、さらにTRHおよびazetirelineの作用を確かめた。

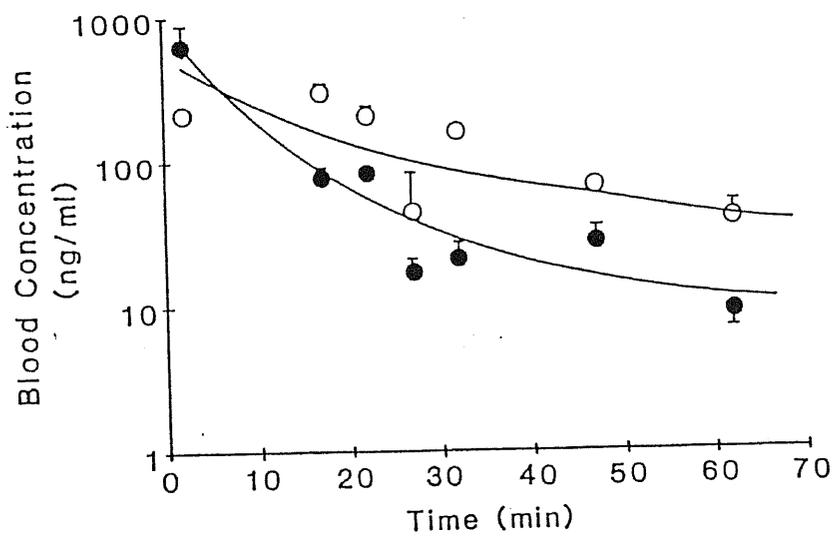
### 1. 実験方法

雄Wistarラット(体重約300g)を用い、大西らの方法(73)に従って、pentobarbital(30 mg/kg ip)麻酔下に左側sagittal sutureから4mm左側、coroneal sutureから2mm後方、脳表面から4mm verticalの脳部位へ自家動脈血(0.25 ml)を注入した。このモデルでは左側内包、被殻および尾状核に血腫が生じることが知られている(74)。神経症状は右後肢を強制的に4.5cmの高さのplateにのせ、強制姿勢を示す時間を測定することにより評価した。これらの観察は術後7日間TRHおよびazetirelineを腹腔内投与したそれぞれ15,30分後に行われた。TRHは単回および頻回投与したが、頻回投与のスケジュールは図15に示すようにTRHによる血中未変化体濃度がazetireline 0.1mg/kgによる血中未変化体濃度と同じレベルに保つよう設定した(75)。

### 2. 実験成績

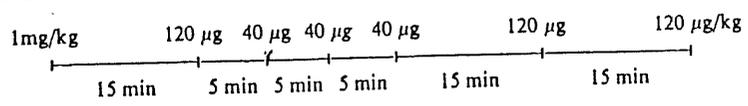
神経症状は図16に示すように術後3日目をピークに回復していった。術後3日目においてcontrol群では約 $49.8 \pm 6.2$  (N=42)秒間強制姿勢を保持した。Azetireline(0.1-0.3 mg/kg ip)を7日間投与すると有意に神経症状の回復が促進された(図16)。TRH(10 mg/kg ip)およびCDP-choline(300 mg/kg ip)の一日一回投与では神経症状に影響を示さなかった(図17、18)。一方、TRHを図15に示すようなスケジュールで頻回投与すると神経症状の回復が促進された(図17)。

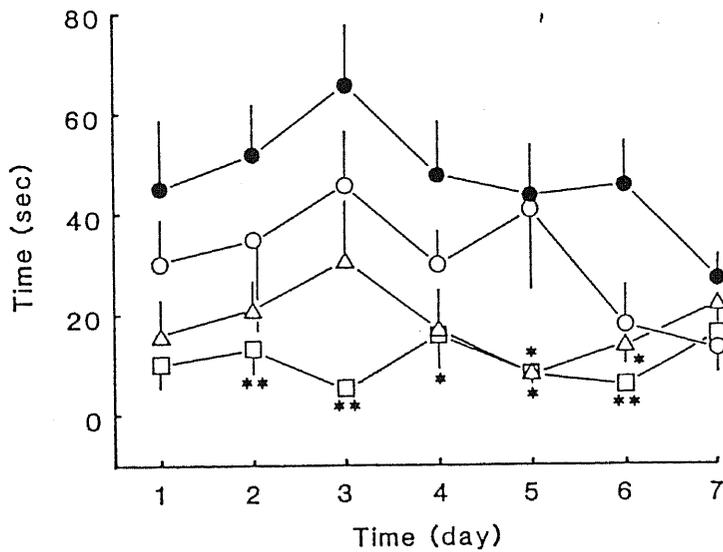
### 3. 考察



☒ 1 5

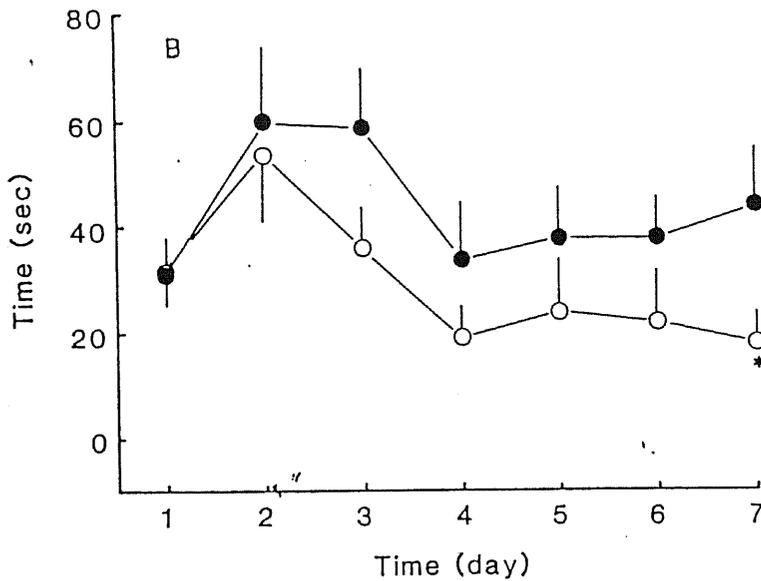
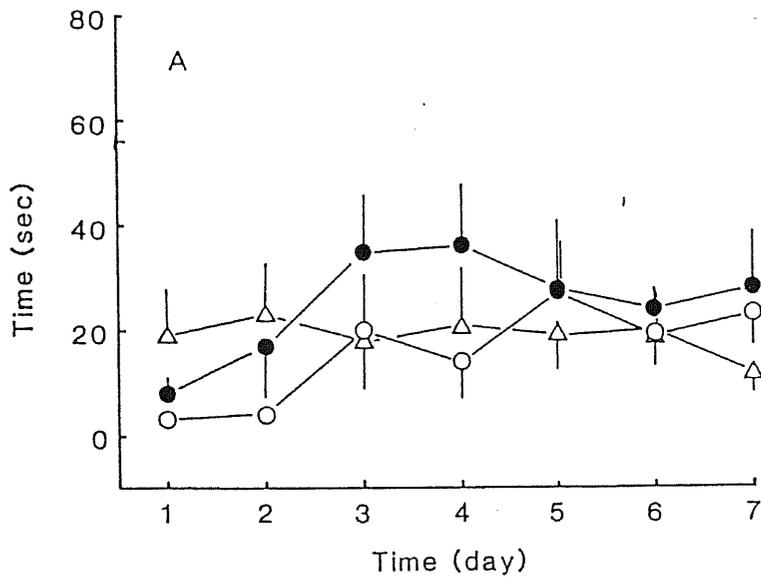
Plasma concentration of unchanged YM-14673 and TRH after i.p. administration of single YM-14673 and multiple TRH in rats. TRH was administered by the schedule as described below. Each point represents mean  $\pm$  S.E.M. from 8 rats. O: YM-14673 (single administration, 0.1 mg/kg i.p.), ●: TRH (multiple i.p. administration),





⊠ 1 6

Effects of YM-14673 on neurological deficits in rats subjected to application of autologous blood into the brain. The drug was administered i.p. once a day for 7 days. Each point represents mean  $\pm$  S.E.M. from 8 rats. Significantly different from saline-injected value: \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$  (Mann-Whitney U-test). -●-: Saline, -○-: YM-14673 (0.03 mg/kg), -△-: YM-14673 (0.1 mg/kg), -□-: YM-14673 (0.3 mg/kg).



☒ 1 7

Effects of TRH on neurological deficits in rats with an experimental hematoma. Neurological deficits were observed by measuring the time to continue the forcible posture. Single (A) and multiple (B) i.p. administration of TRH were conducted. Each point represents mean  $\pm$  S.E.M. from 8 rats. Schedule of multiple administration of TRH is described in the text and in the legend to Fig. 5. Significantly different from saline-injected value: \*  $P < 0.05$  (Mann-Whitney U-test). (A) —●—: Saline, —○—: TRH (1 mg/kg i.p.), —△—: TRH (10 mg/kg i.p.), (B) —●—: Saline, —○—: TRH (multiple administration).

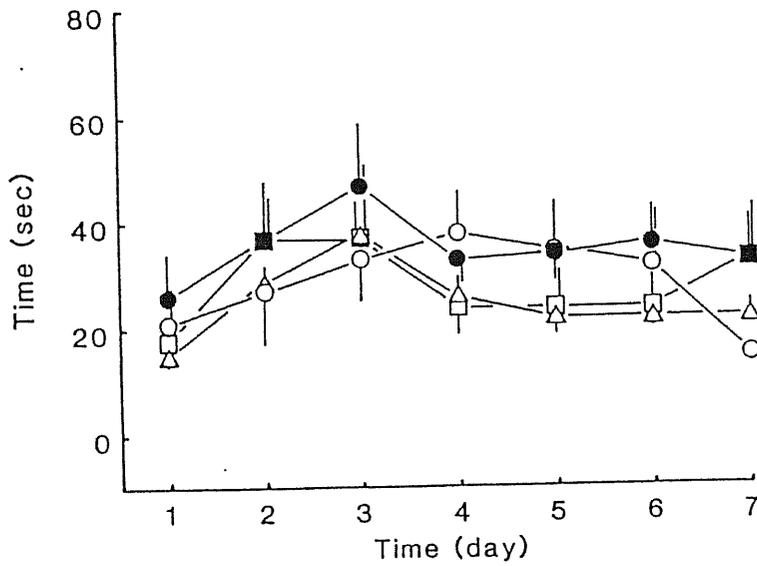


图 18

Effects of CDP-choline on neurological deficits in cerebral hematoma rats. The drug was administered once a day for 7 days after the operation. Each point represents mean  $\pm$  S.E.M. from 8 rats. -●-: Saline, -○-: CDP-choline (30 mg/kg i.p.), -△-: CDP-choline (100 mg/kg i.p.), -□-: CDP-choline (300 mg/kg i.p.).

自家血注入により内包および尾状核近傍に血腫ができた脳血腫モデルにおいて、大西ら(72)と一致して注入反対側の後肢が強制姿勢を保持する等の神経症状が観察された。TRHおよびazetirelineはこの脳虚血慢性モデルにおいて神経症状の回復を促進した。TRHの1日1回投与は脳血腫ラット神経症状に影響を与えなかったが、TRHの血しょう中濃度を図15のようにazetireline(0.1 mg/kg ip)と同程度に保つようTRHを頻回投与すると神経症状の回復が促進された。これらの成績からTRHに脳血腫ラット神経症状改善作用を有することがわかり、azetirelineの神経症状改善効果はTRH様活性による可能性が考えられた。

すでに臨床で用いられているCDP-cholineは本実験における脳血腫モデルの神経症状に対して影響を示さなかった。従って、azetirelineの神経症状に対する薬理作用はCDP-cholineより幅広く、本薬は脳血管障害患者の神経症状にその改善効果が期待される。

#### 4. 小括

Azetirelineは脳血腫ラットの神経症状の回復を促進した。また、TRH頻回投与により脳血腫ラットの神経症状の回復が促進されたことから、TRHに神経症状改善作用があることおよびazetirelineの神経症状改善作用はTRH様活性による可能性が考えられた。

### 第2節 中大脳動脈閉塞ラットを用いた新規慢性脳虚血モデルの作成

諸種の脳虚血モデルが報告され(76-79)、これらのモデルを用いて脳血管障害の領域に使用する薬物の薬効評価が行われている。しかし、慢性期に使用される薬物でさえも、臨床と対応のある適切な慢性脳虚血モデルがない為、急性脳虚血モデルを使用して薬効評価が行われているのが現状である。TRHおよびazetirelineは強力な中枢賦活作用を有するため脳酸素消費量をも高める可能性があり、脳への酸素供給が低下している脳血管障害急性期に用いるより、酸素供給が比較的安定した脳血管障害亜

急性期または慢性期に使用する薬物と考えられる。そこで、TRHおよびazetirelineの薬効を評価するにあたり、まず、臨床とよく対応しているMCAラット(80)を用いて慢性期における行動変化を観察し、薬物の脳虚血慢性期評価方法として適している慢性脳虚血モデルを新規に確立した(81)。

## 1. 実験方法

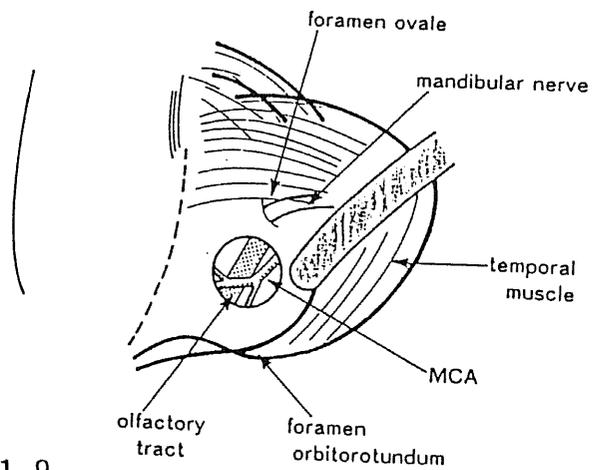
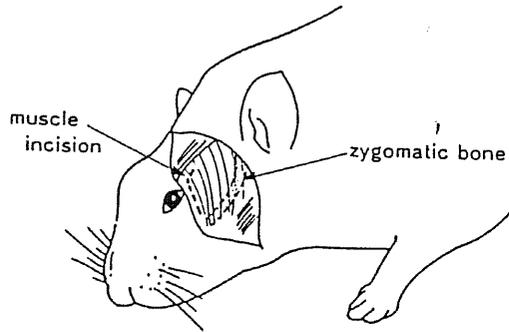
雄Wistarラット(体重約300g)を使用した。2%halothane麻酔下にTamuraらの方法に従い(82,83)、左側MCAを閉塞し(図19)、閉塞1,2,3,4,8,16週間後に神経症状を観察した。神経症状は右前肢を観察棒に強制的に乗せたときにみられる右前肢の片まひの程度およびラットの尾部を持ち上げたときにみられる四肢の異常姿勢の程度をスコア化して評価した。すなわち、0: 正常、1: 異常姿勢あるいは片まひのいずれかの症状があり、その持続が10秒未満の場合、2: 異常姿勢あるいは片まひのいずれかの症状があり、その持続が10秒以上の場合または、異常姿勢と片まひの両方の症状を示し、それらの持続がいずれも10秒未満の場合、3: 異常姿勢と片まひの両方の症状を示し、どちらかの持続がいずれも10秒以上の場合、4: 異常姿勢と片まひの両方の症状を示し、それらの持続がいずれも10秒以上の場合、したがって、スコア4は神経症状の程度が最も強いことを示す。

## 2. 実験成績

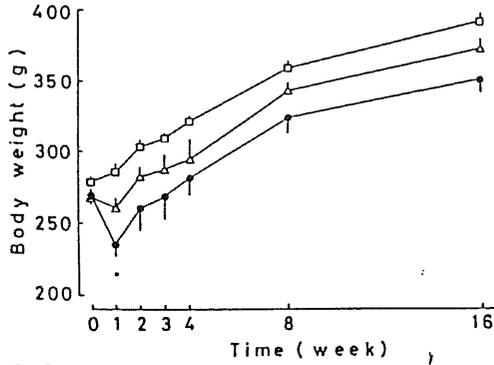
本モデルにおいて閉塞1週間に体重減少(図20)、閉塞2日目にdelta波成分の増大およびalpha波成分減少が(図21)観察された。また、図22に示すように、MCA閉塞4週間後まで神経症状が観察された。

## 3. 考察

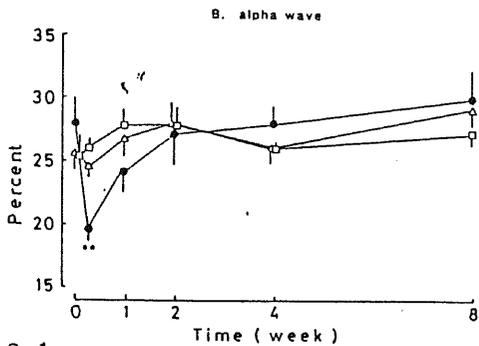
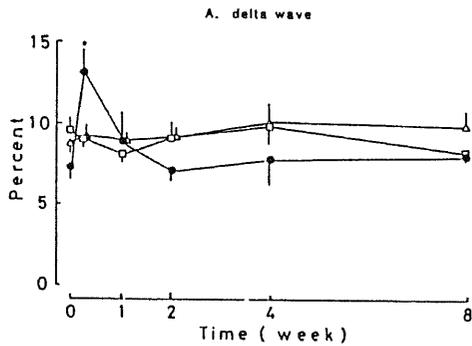
慢性脳虚血モデル確立のため、MCAラットを用いて、局所脳虚血後の慢



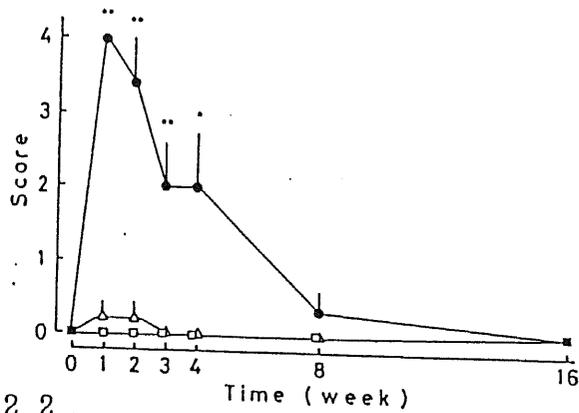
☒ 19. Surgical procedure of middle cerebral artery occlusion in rats. A low power view (upper) showing the skin incision and muscle incision (broken line) which were exaggerated for the figure. A high power view (lower) showing the small craniectomy anterior to the foramen ovale accomplished simply by retraction of the temporalis muscle.



20 Changes in body weight in normal, sham-operated and MCA-occluded rats. Each point represents the mean  $\pm$  S.E.M. of 7-12 rats. □: normal rats; △: sham-operated rats; ●: MCA-occluded rats. Time: time after the operation. Significantly different from sham-operated values: \* $P < 0.05$  (Student's *t*-test).



21 Changes in  $\delta$ - (2-3.75 Hz) and  $\alpha$ - (8-12.75 Hz) wave components of the spontaneous EEG in normal, sham-operated and MCA-occluded rats. Each point represents the mean  $\pm$  S.E.M. of 10-15 rats. A:  $\delta$ -wave components. B:  $\alpha$ -wave components. □: normal rats; △: sham-operated rats; ●: MCA-occluded rats. Significantly different from sham-operated values: \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  (Mann-Whitney's *U*-test).



2.2 Incidence of neurological deficits in normal, sham-operated and MCA-occluded rats. Each point represents the mean  $\pm$  S.E.M. from 7-12 rats. □: normal rats; △: sham-operated rats; ●: MCA-occluded rats. Neurological deficits were evaluated by measuring extent of both abnormal posture and hemiplegia, and then they were classified into 3 grades (0-2) according to extent of each symptom. Significantly different from sham-operated values: \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  (Mann-Whitney *U*-test).

性期における行動変化を観察したところ、MCA閉塞4週間後まで神経症状を示すことがわかった。本モデルではMCA流域内の大脳皮質および線条体において局所脳梗塞がみられることが知られているが(83,84)、予備実験においてもMCA閉塞16週間後に大脳皮質および線条体におけるニューロンの著しい萎縮がみられた(田村、未発表)。それ故、神経症状はこれらの部位の梗塞による可能性が考えられる。以上の実験成績から、本モデルは脳虚血慢性期の機能変化を経時的に測定するのに有益なものと思われた。

#### 4. 小括

MCAラットを用いて脳血管障害慢性期に使用する薬物の薬効評価に適した脳虚血慢性モデルを新規に確立した。

### 第3節 中大脳動脈閉塞ラットにおける神経症状に対するTRHおよびazetirelineの薬効評価

前節および第2章第2節において中大脳動脈閉塞ラットを用いて脳虚血慢性期の神経症状や学習行動障害を経時的に測定できる慢性脳虚血モデルを新規に確立した。本節においてこの臨床により即した慢性脳虚血ラットを用いて神経症状に対する単回および頻回投与によるTRHや持続型TRH誘導体azetirelineの作用を検討した。尚、同モデルにおける学習行動障害に対する薬効評価は第2章第2節に記した。

#### 1. 実験方法

薬理実験においては、azetirelineをMCA閉塞直後から3週間または閉塞1週間後から2週間腹腔内または経口投与した。一方、TRHは閉塞1週間後から2週間1日1回または1日頻回腹腔内投与した。TRHの頻回投与のスケジュールは図15に示すようにTRHによる血しょう中未変化体濃度がazetireline 0.1 mg/kgによる血しょう中未変化体濃度と同程度のレベルに保つよう設定した(75)。神経症状はMCA閉塞1、2、3週間目の

azetireline投与30分後またTRH投与15分後に観察した。尚、MCA閉塞1週間後から薬物を投与した実験において、薬物投与直前にも神経症状を観察した。一部の実験で閉塞3週間後における脳梗塞の状態を病理組織学的に観察した。

## 2. 実験成績

Azetireline 0.1, 0.3 mg/kg(ip) および1 mg/kg (po)をMCA閉塞直後から3週間(図23)または、0.1 mg/kgをMCA閉塞1週間後から2週間腹腔内投与すると(表26)有意に神経症状の回復が促進された。一方、TRH(1-10 mg/kg ip)を閉塞1週間目より2週間単回投与しても神経症状は影響しなかったが、頻回投与すると神経症状の回復が促進された(表26)。尚、MCA閉塞1週間後から薬物を投与した実験系で、MCA閉塞2週間目においてazetireline単回およびTRH頻回投与前においてもこれらの薬物を投与した後に観察されたと同程度の神経症状の回復促進が観察された。梗塞はMCA control群において大脳皮質および線条体にみられたが、azetirelineおよびTRHの投与により梗塞面積は影響されなかった(表27)

## 3. 考察

持続型TRH誘導体azetirelineをMCA閉塞直後から3週間および閉塞1週間後から2週間腹腔内または経口投与すると神経症状の回復が促進された。しかし、azetirelineをMCA閉塞直後から3週間投与しても脳梗塞の面積は影響されなかった。従って、本薬は梗塞に影響なくおそらく、脳梗塞周辺の残存している神経を賦活することにより神経症状改善作用を示すものと考えられる。MCA閉塞1週間後から薬物を投与した実験系で、MCA閉塞2週間目においてazetireline単回およびTRH頻回投与前にもこれら薬物投与後と同程度の神経症状の回復促進が観察された。これらの成績から、azetireline単回およびTRH頻回投与による神経症状改善作用は投与による急性的な一過性の薬理作用ではなく、連続投与による慢性的な薬理作用に基づくものと考えられた。

TRH1日1回投与により神経症状は影響されなかったが、TRHの血し

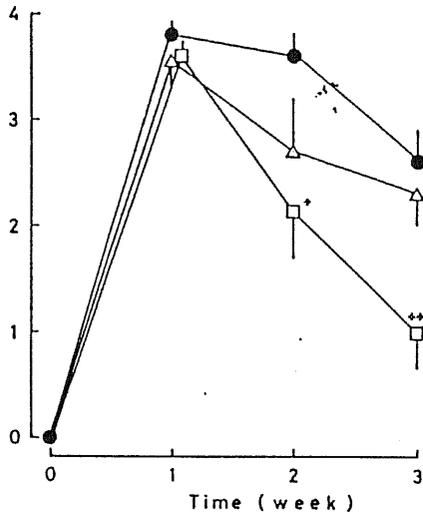
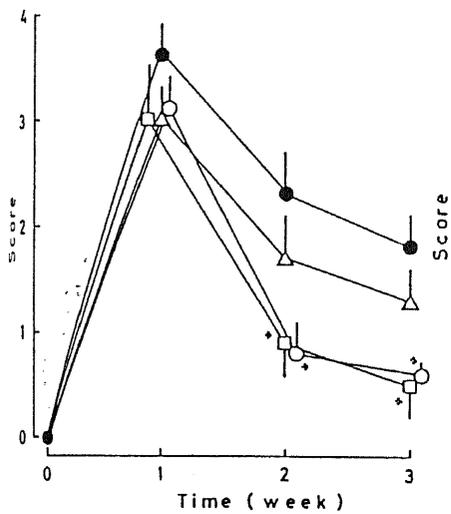


图 23 Effects of YM-14673 administered intraperitoneally (left) and orally (right) daily for 3 weeks on neurologic deficits in rats after occlusion of left middle cerebral artery. Each point represents mean  $\pm$  SEM from 7-10 rats. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  significantly different from solvent-treated control by Mann-Whitney U test. For left: ●, saline solvent; △, 0.03 mg/kg i.p. YM-14673; □, 0.1 mg/kg i.p. YM-14673; ○, 0.3 mg/kg i.p. YM-14673. For right: ●, distilled water solvent; △, 0.1 mg/kg p.o. YM-14673; □, 1 mg/kg p.o. YM-14673.

表 2 6 .

Effects of TRH on neurological deficits in rats<sup>1</sup> subjected to middle cerebral artery occlusion  
 Drugs were administered intraperitoneally for 2 weeks once daily from 1 week after the occlusion. Each value represents mean±SE. Evaluation of neurological deficits were conducted 15 min after drug administration. \*P<0.05, \*\* P<0.01 Significantly different from saline control by Mann-Whitney U test.

Treatment	Dose (mg/kg ip)	N	Score of Neurological Deficits		
			1	2	3 Weeks
Sham operation		6	0±0	0±0	0±0
Occlusion					
Saline		8	2.9±0.3	2.8±0.3	2.3±0.3
TRH	1	8	2.8±0.3	2.8±0.4	2.3±0.3
	10	6	2.6±0.3	2.6±0.2	1.9±0.3
	multiple 1)	8	2.6±0.3	1.5±0.3 *	0.8±0.2 **
Saline		5	3.0±0.4	3.4±0.2	3.0±0.3
YM-14673	0.1	8	3.5±0.3	1.8±0.3 *	0.9±0.2 **

1) Multiple administration of TRH was conducted by the schedule described in methods and Fig. 1.

表 2 7 Effects of YM-14673 on Ischemic Brain Damage After Middle Cerebral Artery Occlusion in Rats

Rat	Ischemic brain damage (% of total area)			
	Saline (n=8)	YM-14673 (mg/kg i.p.)		
		0.03 (n=7)	0.1 (n=8)	0.3 (n=8)
1	14.1	18.1	11.2	12.1
2	14.2	10.0	15.5	12.8
3	9.9	17.7	11.9	13.9
4	12.3	12.3	8.8	15.0
5	10.9	18.5	11.4	11.9
6	6.3	9.4	12.9	9.9
7	8.2	5.1	8.5	13.0
8	7.0	—	35.6	12.7
Mean±SEM	10.4±1.1	13.0±2.0	14.5±3.1	12.7±0.5

Data are averages from five coronal sections.

よう中濃度を図15に示すようにazetireline 0.1 mg/kg (ip)投与による血しょう中azetireline濃度と同程度に保つようTRHを頻回投与すると、MCAラットの神経症状の回復が促進した。又、LathamらはTRHより半減期の長いCG-3509(orotyl-His-ProNH<sub>2</sub>)およびRX-77368(pGlu-His-3,3-dimethyl ProNH<sub>2</sub>)がTRHと異なり、MCAラット感覚神経誘発電位の振幅減少を改善したと報告している(85)。これらの成績からazetirelineの脳虚血モデル神経症状改善効果はTRH様活性による可能性が考えられる。尚、本モデルの特徴は脳梗塞患者の病態に類似していること、慢性期の行動変化を定量化できることおよび薬剤投与期間を薬剤の性質により選択できることである。

#### 4. 小活

1. AzetirelineをMCA閉塞直後または閉塞1週間後から投与すると神経症状の回復が促進された。この神経症状はTRHの単回投与により影響されなかったが、TRHの頻回投与により回復が促進された。このようにTRHおよびazetirelineは慢性脳虚血モデルにおいて神経症状改善作用を示すことがわかった。
2. 以上の成績から、TRHおよびazetirelineは慢性脳虚血モデルにおいて神経症状改善作用を示したが、azetirelineの作用はTRH様活性に基づくものと考えられた。

### 第4章 新規錘体運動路障害モデルの作成とTRHおよびazetirelineの神経症状評価に関する薬理的検討

TRHおよびazetirelineが慢性脳虚血モデルの神経症状を改善することが明らかとなった。脳虚血モデルにおける片まひ等神経症状の成因として随意運動神経系である錘体路の障害が考えられる。そこで、第1章においてはこれら薬剤の神経症状改善作用の機序の一部を検討するためラットを用いて錘体路の一部である内包を電気破壊して神経症状を惹起させたモデルを新規に確立し、本モデルの神経症状等に対するTRHおよびazetirelineの作用を検討した。最近脳血管障害患者の治療としてしば

しば発症早期からリハビリテーションが施されている。そこで、第2節ではより臨床に即したモデルで薬効評価を行うことを目的として第1節で確立した内包破壊ラットに運動負荷を行ったモデルを新たに確立し、持続型TRH誘導体azetirelineの作用を検討し、運動負荷を実施しなかった内包破壊ラットでの成績と比較して、薬効評価を行う見地から運動障害モデルについて考察した。

## 第1節 錐体路障害ラット

第3章においてTRHおよびazetirelineが慢性脳虚血ラットの神経症状を改善したことを示した。一方、TRH, CDP-cholineが電気生理学的手法を用いた実験で錐体路運動神経系を賦活することはすでに報告されている(68, 69)。本節においてはTRHおよびazetirelineの脳虚血モデル神経症状改善作用の機序の一部を検討するため、錐体路の一脳部位である内包を電気破壊して神経症状を惹起したラットを用いて行動および電気生理学の実験を行い、TRHおよびazetirelineの錐体路に対する作用について検討した。

### 1. 実験方法

雄Wistarラット(体重約300g)を用いて、pentobarbital (30 mg/kg ip)麻酔下に左側内包[A:6.2, L:4.0, V:-3.0,  $\Delta$ :7.7 L:2.5, V:-4, König and Klippelの脳図譜による(31)]を電気(1 mA, 15s, 5分毎に2回)破壊した。神経症状を破壊後1, 2, 4, 6, 10, 14日目に観察し、MCAラットの神経症状を評価した方法と同様な方法でスコア化した(48) (詳細は第3章、第1節の方法を参照)。すなわち、右前肢片まひおよび異常姿勢の程度により評価し、スコア4は神経症状の程度が最も強いことを示す。TRHおよびazetirelineは毎日1回14日間腹腔内に投与され、TRHは別の実験で毎日頻回投与された。TRHの頻回投与のスケジュールは図15に示すようにTRHによる血しょう中未変化体濃度がazetireline 0.1 mg/kgによる血しょう中未変化体濃度と同じレベルに保つよう設定した(74)。さらに、

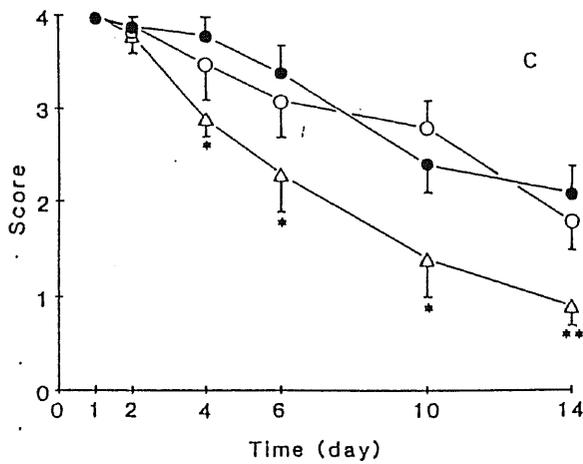
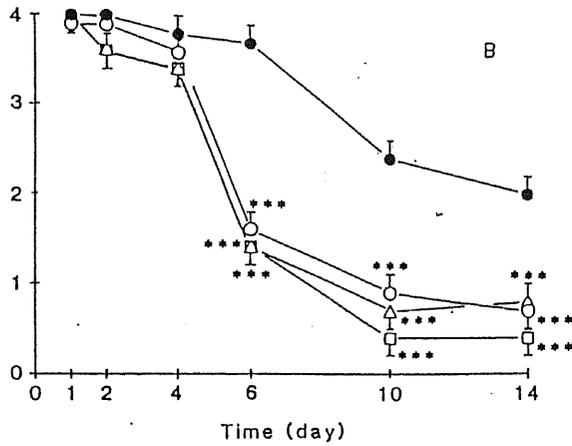
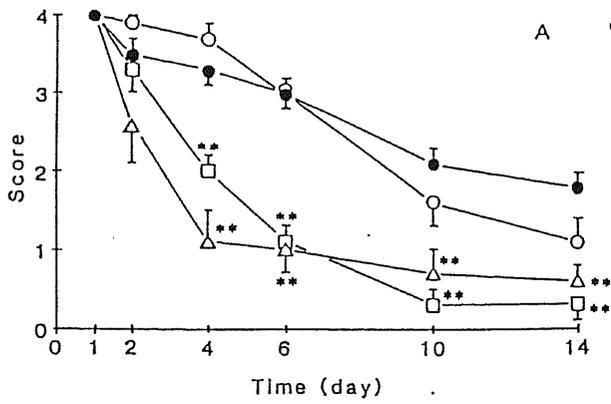


图 2 4

Effects of YM-14673 on neurological deficits in rats subjected to electrical destruction of the left internal capsule. The drug was administered i.p. (A), i.p., i.v. and i.m. (B) and orally (C) daily for 13 days. Neurological deficits were observed at 30 min after drug administration. Each point represents mean  $\pm$  S.E.M. of 9-17 rats.

\*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ ; Significantly different from vehicle-injected value (Mann-Whitney U-test).

\*\*\*  $P < 0.001$

A: ●: Saline; ○: YM-14673 (0.01 mg/kg, i.p.); △: YM-14673 (0.1 mg/kg, i.p.); □: YM-14673 (1 mg/kg, i.p.).

B: ●: Saline; ○: YM-14673 (0.1 mg/kg, i.p.); △: YM-14673 (0.1 mg/kg, i.v.); □: YM-14673 (0.1 mg/kg, i.m.).

C: ●: Distilled water; ○: YM-14673 (0.1 mg/kg, p.o.); △: YM-14673 (1 mg/kg, p.o.).

表 2 8

*Effects of parenteral administration of YM-14673 (0.1 mg/kg) on neurological deficits in rats subjected to electrical destruction of the left internal capsule*

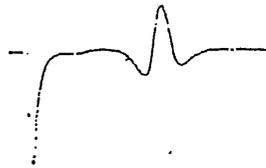
Treatment	Route ( <sup>1</sup> )	Score		
		Days after the lesion		
		6	10	14
Saline	i.p.	2.9 ± 0.3	2.4 ± 0.2	2.2 ± 0.1
YM-14673	i.p.	1.8 ± 0.1*	0.7 ± 0.2**	0.7 ± 0.2**
	i.v.	2.3 ± 0.3	1.0 ± 0.3**	0.9 ± 0.2**
	i.m.	2.0 ± 0.3	0.7 ± 0.2**	0.6 ± 0.2**

(<sup>1</sup>) Injection route.

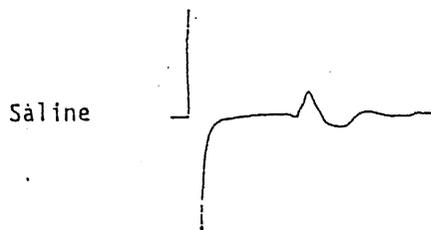
Neurological deficits were observed immediately before drug administration. Each figure represents mean ± S.E.M. of 9 rats.

\* P < 0.05, \*\* P < 0.01: Significantly different from the saline-injected vuluc (Mann-Whitney U-test).

Normal Rat



Internal Capsule Lesioned Rat



YM-14673



1 mV  
1 msec

⊗ 2 5

Effects of YM-14673 on the electromyographic activities evoked by electrical stimulation of the left sensory motor cortex in the left internal capsule-lesioned rat. Recording is typical of 1 experiment. YM-14673 (0.1 mg/kg) was administered i.p. once daily for 5 days. EMG was observed at 30 min after the final drug administration on the 6th day after the lesion. The evoked EMG potential was composed of 1 component with a latency of about 6 msec. Vertical and horizontal scales indicate 1 mV and 1 msec, respectively.

表 2 9

*Effects of YM-14673 on neurological deficits and electromyographic activities evoked by electrical stimulation of the left sensory motor cortex in rats subjected to left internal capsule lesion*

Treatment	N	Neurological deficits (score) (*)	EMG activity (mV) (b)
Intact rat	7	—	1.14 ± 0.04
Lesioned rat			
Saline	7	3 ± 0	0.60 ± 0.06 <sup>△△△</sup>
YM-14673	10	1 ± 0 <sup>**</sup>	0.91 ± 0.08 <sup>*</sup>

Administration of YM-14673 (0.1 mg/kg, i.p.) was started 1 day after operation and repeated once daily for 5 days. Neurological deficits and EMG activity were observed 30 min after the final administration of YM-14673 on the 6th day after surgical operation.

(\*) Neurological deficits were measured using the scoring method (score 0–4) described by Yamamoto *et al.* (1988).

\*\* P < 0.01: Significantly different from saline-treated value (Mann-Whitney U-test).

(b) EMG activity was evaluated by measuring the amplitude with a latency of about 5 msec.

• P < 0.05: Significantly different from saline-injected value (Student's *t*-test).

△△△ P < 0.001: Significantly different from nonoperated value (Student's *t*-test).

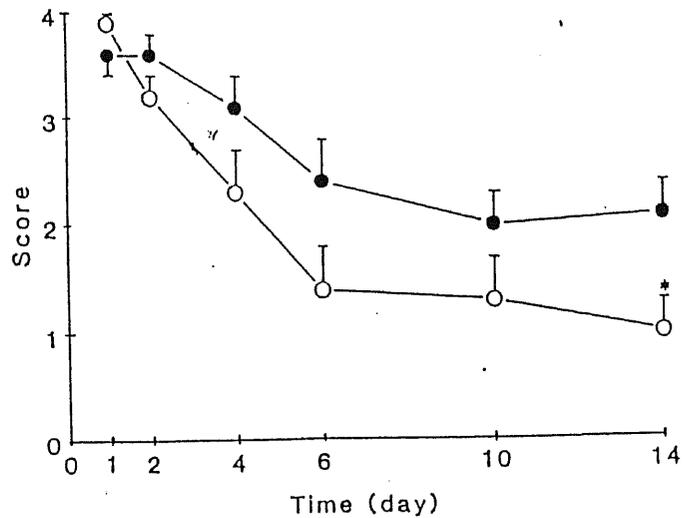
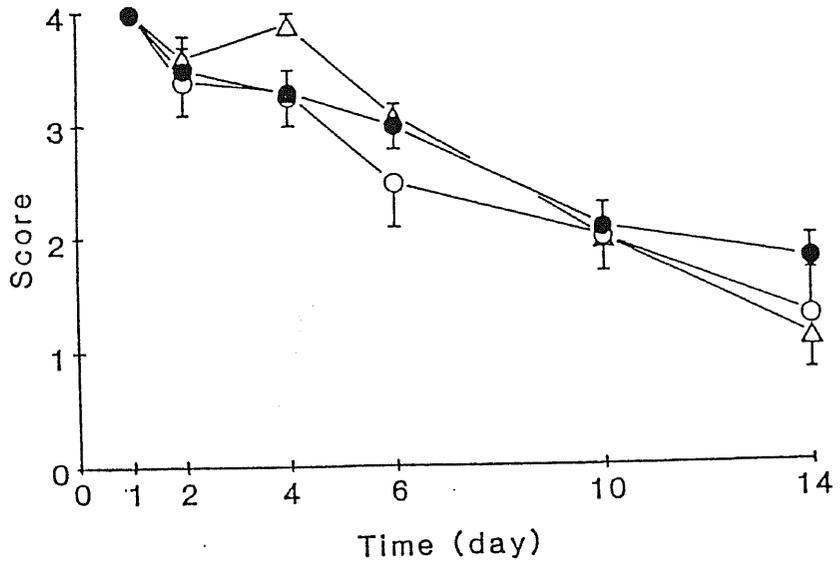


图 26

Effects of TRH on neurological deficits in rats subjected to electrical destruction of the left internal capsule. The drug was administered i.p. seven times an hour daily for 13 days. Neurological deficits were observed 30 min after the first administration of multiple doses. Each point represents mean  $\pm$  S.E.M. of 9-10 rats.

\*  $P < 0.05$ : Significantly different from vehicle-injected value (Mann-Whitney U-test).

—●—: Saline; —○—: TRH (multiple administrations, seven times an hour).

電気生理実験において、左側大脳皮質を電気刺激し(約100 v, 0.1 msec)右側前肢(triceps brachii muscle)から誘発筋電位を記録して、薬物投与6日目における電位の振幅を指標に薬効評価を行った。

## 2. 実験成績

内包破壊ラットにおいて破壊1日目をピークに2-3週間以上にわたり高いスコアの神経症状が観察されたが、図24に示すように神経症状の自然回復がみられた。Azetireline(0.1, 1 mg/kg ip, 0.1 mg/kg iv, im, 1 mg/kg po)は神経症状の回復を促進し(図24、表28)、誘発筋電位の振幅減少はazetireline (0.1 mg/kg ip)により改善された(図25、表29)。一方、TRHを単回投与(1-10 mg/kg ip)しても神経症状に影響なかったが、TRHを頻回投与すると神経症状の回復が促進された(図26)。CDP-choline (300 mg/kg ip)も本モデルの神経症状の回復を促進した(データ省略)。

## 3. 考察

正常ウサギを用いた電気生理実験からTRHが錐体路賦活作用を有する可能性が示唆されている(68)。本研究において錐体路系の内包を電気破壊したラットにおいて、破壊反対側前肢に神経症状が2-3週間以上にわたり惹起することがわかったが、本モデルを用いてTRHおよびazetirelineの効果を検討した。その結果、azetireline単回およびTRH頻回投与により神経症状の回復が促進され、さらに誘発筋電位の振幅減少はazetirelineにより改善された。これらの成績からTRHおよびazetirelineが錐体路賦活作用を有すること、azetirelineの内包破壊ラット神経症状改善作用はTRH様活性によることが推測された。さらに、前章でTRHおよびazetirelineは慢性脳虚血モデルにおいて神経症状改善作用を有することがわかったが、この作用に錐体路賦活作用が関与している可能性が考えられた。

CDP-cholineは脳血管障害患者の片まひの治療にすでに使用されている薬物だが(71)、TRHおよびazetirelineと同様、内包破壊ラットの神経症

状の回復を促進し、その効力はazetirelineの約1/3000であった。従って、TRHおよびazetirelineは臨床において脳血管障害患者の片まひ等神経症状にその改善効果が期待された。

#### 4. 小括

1. 錐体運動路が損傷された内包破壊ラットを用いて運動障害モデルを新規に確立し、TRHおよびazetirelineの慢性脳虚血モデルにおける神経症状改善作用の作用機序の一部を検討するため、これら二剤の錐体路障害に対する薬効を評価した。
2. Azetirelineは内包破壊ラットにおいて神経症状の回復を促進し、誘発筋電位の振幅減少を改善したことから、本薬に錐体路賦活作用を有する可能性が考えられた。
3. TRHを単回投与しても内包破壊ラットの神経症状は影響されなかったが、TRHを頻回投与すると、神経症状改善作用がみられた。従って、TRHにも神経症状改善作用を有することがわかり、azetirelineの内包破壊ラット神経症状改善作用はTRH様活性によることが考えられた。また、TRHおよびazetirelineの脳虚血モデルにおける神経症状改善作用に錐体路賦活作用の関与する可能性が考えられた。
4. すでに臨床で頻用されているCDP-cholineも内包破壊ラット神経症状の回復を促進した。したがって、azetirelineは臨床においてCDP-cholineと同様に片まひ等神経症状を改善することが期待された。

#### 第2節 錐体路障害運動負荷ラット

脳血管障害特に運動機能障害の治療の際には薬物療法とともに早期よりリハビリテーションが実施される為(71)、薬物の臨床治験の際、このリハビリテーションの影響は見逃せない。従って、動物実験においてもリハビリテーションを負荷したモデルを使用することは重要であると考え、本研究では内包破壊ラットに運動負荷(リハビリテーション)を行ったモデルで持続型TRH誘导体azetirelineの薬効を評価し、運動障害領

域における薬効評価方法について考察した。

## 1. 実験方法

第1節で記した方法で内包破壊ラットを作成し、このラットへ回転籠、トレッドミルおよび水泳により強制運動を負荷(リハビリテーション)し、どの運動負荷が神経症状の回復促進に効果的かを検討した。回転籠運動負荷は4m/minで1日10分間、トレッドミル運動負荷は10m/minで1日10分間、また水泳運動負荷は水温37°Cで1日5分間行った(図27)。これらの基礎実験の後、azetirelineを運動負荷10分前に腹腔内投与して、内包破壊リハビリテーションラットの神経症状に対する作用を検討した。なお、運動負荷および薬物投与は内包破壊4日後より開始した。

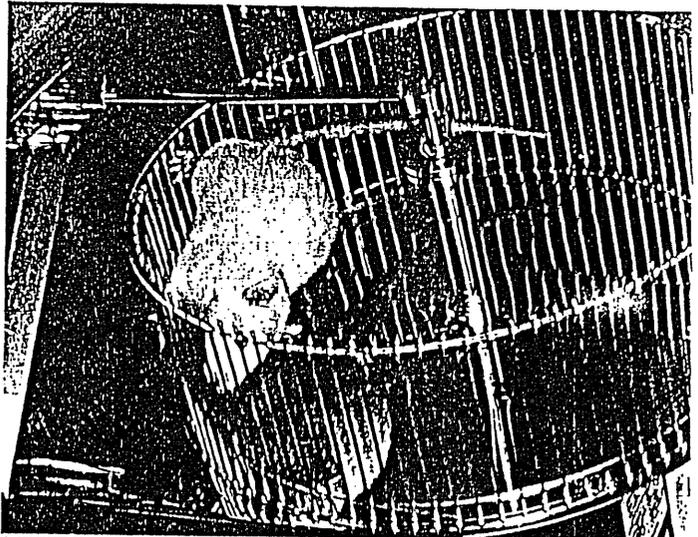
## 2. 実験成績

神経症状の回復は回転籠運動負荷により促進されたが、トレッドミルおよび水泳によっては影響を受けなかった(図28)。Azetireline(0.03-0.1 mg/kg ip)は運動負荷を行っていない内包破壊ラットの神経症状回復を促進した(図29,  $P < 0.05-0.01$ , 対生理食塩水投与群)。また、azetireline(0.03 mg/kg ip)は回転籠により運動負荷した内包破壊ラットの神経症状の回復も有意に促進した(図29,  $P < 0.05-0.01$  対生理食塩水投与群)。

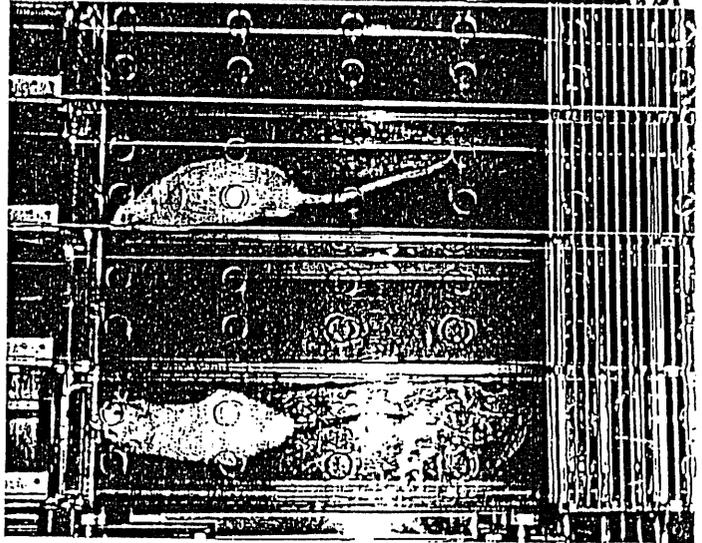
## 3. 考察

脳血管障害の治療としてリハビリテーションが実施されているが、脳血管障害と関連したモデルへリハビリテーションを施した報告はない。本研究においては内包破壊ラットに運動負荷(リハビリテーション)を加えたモデルを新規に確立し、神経症状に対する持続型TRH誘導体azetirelineの影響をみた。すなわち、神経症状はトレッドミルおよび水泳により強制運動負荷した場合影響はなく、回転籠により強制運動負荷

Wheeling-drum  
(4 m/min for 10 min)

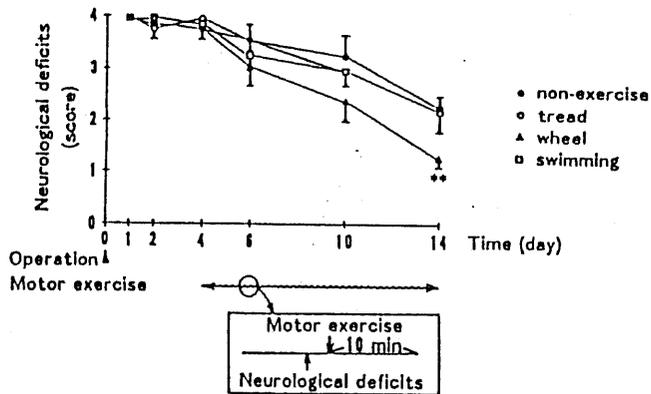


Tread-mill  
(10 m/min for 10 min)

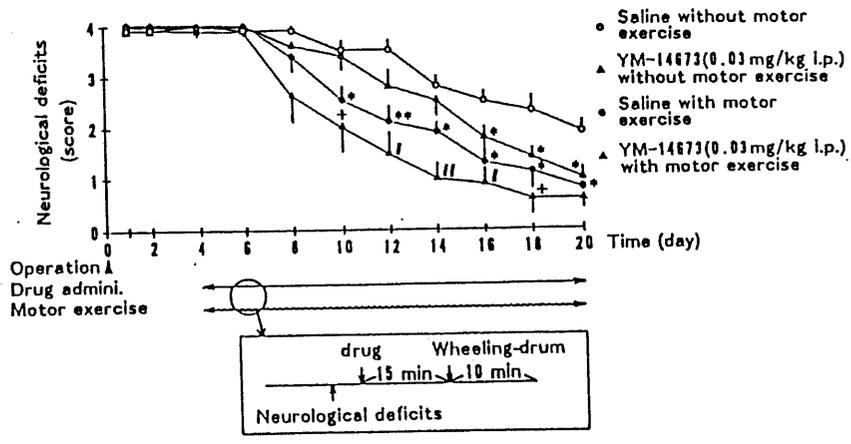


Swimming  
(37°C for 5 min)





2.8 Effects of motor exercise (rehabilitation) on neurological deficits in IC rats. Motor exercise using swimming, tread-mill and wheeling-drum started from the 4th day after surgical operation and repeated once daily for 10 days. Neurological deficits were observed immediately before motor exercise. Each point represents the mean  $\pm$  S.E. from 9-10 rats. Significantly different from the value for respective non-exercised group: \* \*  $P < 0.01$  (Mann-Whitney U-test).



⊗ 2 9 Effects of YM-14673 on neurological deficits in IC rats both with and without motor exercise. Both motor exercise using wheeling-drum and drug administration started from the 4th day after surgical operation, and repeated once daily for 16 days. Neurological deficits were observed immediately before drug administration. Motor exercise was conducted 15 min after drug administration. Significantly different from the value for respective saline group in IC rats without motor exercise: \* P < 0.05 \*\* P < 0.01, (Mann-Whitney U-test). Significantly different from the value for respective saline group in IC rats with motor exercise: / P < 0.05, // P < 0.01 (Mann-Whitney U-test).

すると著明に改善された。従って、azetirelineの薬効評価は回転籠により運動負荷された内包破壊ラットを用いて行ったが、本薬は運動負荷生理食塩水投与群より著明に神経症状の回復を促進した。本成績から、azetirelineはリハビリテーションを実施している脳血管障害患者においても神経症状を改善することが期待される。

脳血管障害患者等において発症早期よりリハビリテーションが実施されている。本節において運動障害ラットにリハビリテーションを想定した運動負荷を行ったモデルでも運動負荷の効果が観察されたこと、また、このモデルでも運動負荷の効果に加えて薬効も観察されたことから、薬効評価を行う上で薬剤投与ばかりでなく、臨床に即したリハビリテーション等の治療の概念も考慮に入れることは重要であると考えられた。

#### 4. 小括

1. 回転籠による強制運動負荷（リハビリテーション）した内包破壊運動障害モデルを新規に確立した。
2. Azetirelineはリハビリテーション負荷内包破壊ラットにおいても著明に神経症状の回復を促進することがわかった。

## 総 括

種々の脳機能障害に対するTRHおよび持続型新規TRH誘導体azetirelineの薬効評価方法に関して薬理的に検討を行った。まずはじめにTRHに既知の薬理作用すなわち正常動物における自発運動量、自発脳波およびドパミン様行動について、ついで意識障害、学習行動障害、運動失調およびうつ病モデルにおける薬効を確かめた。さらに、TRHに報告されていない薬効を新たに見いだすために、新規慢性脳虚血モデル運動障害モデルおよび運動障害運動負荷（リハビリテーション）モデルを確立し、これらの実験系でazetirelineや単回および頻回投与によるTRHの薬効を検討した。

第1章では正常動物を用いてTRHおよびazetirelineの中枢薬理作用を検討した。すなわち、TRHおよびazetirelineは正常ラットで自発運動量増大、脳波賦活等の中枢賦活作用を示したが、これら薬物による自発運動量増大はドパミン遮断薬haloperidolにより拮抗されることから、これらの作用に脳内ドパミン神経系賦活の関与が示唆された。また、TRHおよびazetirelineをマウスへ投与すると中脳辺縁ドパミン神経系と関連あるclimbing行動等が惹起された。一方、methamphetamineは中脳辺縁および線条体ドパミン神経系とそれぞれ関連あるclimbing, biting両行動等を惹起し、この点でTRHおよびazetirelineはmethamphetamineと異なっていた。これらazetirelineの効力はTRHの約10-20倍、持続は約6倍であり、azetirelineは強力かつ持続型のTRH誘導体であることがわかった。

第2章では現在脳機能賦活薬の評価法として繁用されている脳機能障害モデルを用いてTRHおよびazetirelineの中枢薬理作用を検討した。すなわち、TRHおよびazetirelineは中枢抑制剤pentobarbital投与による睡眠およびpentobarbital, ethanol投与による低体温に対して拮抗作用を示した。さらに意識障害モデルである脳震盪マウスおよび視床下部破壊ネコの行動や脳波障害に対してTRHおよびazetirelineは改善作用を示した。したがって、azetirelineはTRHと同様頭部外傷等に伴う意識障害に臨床応用が期待された。TRHおよびazetirelineは下垂体摘出マウスにお

いて正常マウスと同様のpentobarbital睡眠拮抗作用を示したことから、これら薬物の作用は下垂体を介さず、中枢賦活作用によることが示唆された。また、TRHおよびazetirelineによるpentobarbital睡眠拮抗作用は抗コリン薬atropineにより拮抗されることから、これらの作用に脳内アセチルコリン神経系賦活の関与が考えられた。TRHおよびazetirelineは抗コリン薬scopolamine, 蛋白合成阻害薬cycloheximide投与、低酸素、脳虚血負荷モデルおよび老化促進マウスの学習行動障害に対して改善作用を示し、これら薬物に脳機能賦活作用を有することが示唆され、両薬物は脳器質性疾患の精神症状に臨床応用が期待された。また、これらの二剤は蛋白合成阻害薬cytosine arabinoside投与によるマウス運動失調に対して改善作用を示し、脊髄小脳変性症等の運動失調にその臨床応用が期待された。さらに、reserpine投与による低体温、けいれん閾値低下およびponto-genicullo-occipital (PGO)波出現に対してTRHおよびazetirelineは拮抗作用を示し、これら薬物に脳内モノアミン神経系賦活作用を有することが示唆され、脳血管障害の精神症状やうつ病にその臨床応用が期待された。これらの実験系でazetirelineの効力はTRHの約10-100倍, 持続は約8-36倍であった。以上のごとく、TRHおよびazetirelineは既知の種々の脳機能障害モデルにおいて改善作用が認められたが、azetirelineはTRHよりも強力でかつ持続的であることがわかり、以後の実験においてazetirelineを持続型のTRH誘導体として使用し、その薬理作用をTRHと比較した。

第3章においてはTRHに期待されているが、実際は無効または報告されていない脳虚血モデルの神経症状に対する作用を検討するため、中大脳動脈閉塞ラットを用いて新規慢性脳虚血モデルを確立し、azetirelineおよび単回、頻回投与によるTRHの効果を検討した。すなわち、このモデルでは中大脳動脈閉塞4週間にわたり片まひ等の神経症状が観察され、その神経症状は閉塞1週間後から回復に向かうが、azetirelineは神経症状の回復を促進した。慢性脳虚血モデルである脳血腫ラットにおける神経症状もazetirelineの投与により回復が促進された。一方、TRHの1日1回投与では中大脳動脈閉塞および脳血腫ラットの神経症状に影響なかったが、TRHを頻回投与すると両モデルの神経症状の回復が促進され

た。以上の成績から、TRHに慢性脳虚血モデルの神経症状を改善する性質を有することがみいだされた。

第4章においては、TRHおよびazetirelineの脳虚血モデルにおける神経症状改善作用の機序の一部を検討するため、錘体運動路の1部位である内包を電気破壊したラットを用いて錘体運動路障害モデルを新規に確立し、錘体路に対する作用を検討した。本モデルにおいても慢性脳虚血モデルで観察されたと同様の神経症状が観察されたが、azetirelineおよび頻回投与したTRHは同モデルの神経症状の回復を促進し、また、azetirelineは内包破壊による誘発筋電位振幅の減少を改善したことから、これら二剤が錘体路を賦活する可能性が示唆された。以上の成績から、TRHおよびazetirelineの脳虚血モデルにおける神経症状改善作用に錘体運動路賦活作用が関与している可能性が考えられた。また、脳血管障害領域の治療としてリハビリテーションが発症早期より実施されており、リハビリテーションの効果も加味した薬効評価系の重要性が考えられた。そこで、内包破壊ラットへ運動負荷（リハビリテーション）を行ったモデルを新規に確立し、神経症状に対するazetirelineの作用を検討した。すなわち、内包破壊ラットへ回転籠による運動負荷（リハビリテーション）を行うと、神経症状の回復が促進されたが、azetirelineは本モデルの神経症状の回復をさらに促進した。従って、azetirelineは脳血管障害後にリハビリテーションを実施している患者においても神経症状の改善が期待された。

以上のごとく、TRHおよびazetirelineは中枢賦活作用や脳機能障害を改善する作用を有することまた、azetirelineはTRHよりも強力でかつ持続的なTRH誘導体であることがわかった。特に興味深いことは臨床に即した新規モデルの確立およびTRHの頻回投与や持続型TRH誘導体azetirelineの評価によりいままでTRHに有効性が認められていない脳虚血モデルにおける神経症状改善作用がTRHに見いだされたことである。本研究により臨床に即した慢性脳虚血や運動障害モデルを用いた薬効評価系が確立されたが、本領域の病態の研究や薬剤の開発に意義あることと考える。さらに、TRHおよびTRH誘導体の臨床応用が既知の頭部外傷、脊髄小脳変性症ばかりでなく、脳血管障害における神経症状の領域にも広がる可能

性が示唆されたことは満足いく薬剤がない領域であるが故に意義有ることと考える。

## 謝 辞

本研究に際し、終始御懇篤なご指導ご鞭撻と本論文の御校閲を賜りました千葉大学薬学部、渡辺和夫教授に謹んで感謝致します。また、適切なご指導とご鞭撻をいただきました山之内製薬関屋延雄顧問、取締役専務高橋孝三博士、中央研究所常務取締役前野弘夫博士、リサーチセンター長取締役立川四郎博士、開発薬理研究所長竹田正明博士、研究統括部田村隼也博士に厚く御礼申し上げます。慢性脳虚血ラットに関する共同研究において終始熱心なご指導をいただきました帝京大学医学部脳神経外科佐野圭二教授、田村晃教授、桐野高明助教授に厚く御礼申し上げます。さらに、実験および資料作成に温かいご協力、ご援助を頂きました研究所各位特に笹又理央修士、岩井晃彦修士、矢次真一修士、寺井道夫修士、岡田正路博士の各氏に心から感謝致します。

## 掲載雑誌目録

### 第1章の内容は

Shimizu, M., Yamamoto, M. and Kobayashi, K.: Arch. int.

Pharmacodyn. 301:100-111(1989)

に下記の表題で掲載されたものである。

Effects of a new TRH analogue, YM-14673 on spontaneous motor activity in rats.

また Yamamoto, M., Yatsugi, S. Sasamata, M.: Curr. Ther. Res.

47(5): 781-794(1990)

に下記の表題で掲載されたものである。

Pharmacological actions of YM-14673, a new TRH analogue, on central nervous system in animals.

また Yamamoto, M., Ozawa, Y., Sasamata, M., Koshikawa, N. and

Kobayashi, M.: Eur. J. Pharmacol. 180:319-324 (1990)

に下記の表題で掲載されたものである。

Central dopaminergic actions of YM-14673, a new TRH analogue in rodents.

### 第2章第1節の内容は

Yamamoto, M. and Shimizu, M.: Naunyn-Schmiedeberg's Arch

Pharmacol 336:561-565 (1987)

に下記の表題で掲載されたものである。

Effects of a new TRH analogue, YM-14673 on the central nervous system.

また Yamamoto, M. and Shimizu, M.: Neuropharmacology 28:863-866

(1989)

に下記の表題で掲載されたものである。

Effects of a new analogue of thyrotropin-releasing hormone on pentobarbital-induced sleeping time in rodents.

第2章第2節の内容は

Yamamoto, M. and Shimizu, M.: Naunyn-Schmiedeberg's Arch  
Pharmacol 338:262-267 (1988)

に下記の表題で掲載されたものである。

Effects of a new TRH analogue, YM-14673 on a passive avoidance test as a possible criterion of improvement in cognitive disturbance in rodents.

また Yamamoto, M., Iwai, A., Ozawa, Y.: Pharmacol. Biochem. Behav.  
35: 727-729 (1990)

に下記の表題で掲載されたものである。

Effects of a new TRH analogue, YM-14673, on disturbance of passive avoidance learning in senescence accelerated mice.

第2章第3節の内容は

Yamamoto, M. and Shimizu, M.: Europ. J. Pharmacol. 166:545-547  
(1989)

に下記の表題で掲載されたものである。

Effect of YM-14673, a new thyrotropin releasing hormone analogue, on ataxic gait in cytosine arabinoside-treated mice.

第2章第4節の内容は

Yamamoto, M., Shimizu, M. and Iwai, A.: Psychopharmacology 95:  
162-166(1988)

に下記の表題で掲載されたものである。

Antagonizing effects of YM-14673, a new TRH derivative, on behavioral and electroencephalographic changes in reserpinized

animals.

第3章第1節の内容は

Yamamoto, M., Tamura, A., Kirino, T., Shimizu, M. and Sano, K.:

Brain Res. 452:323-328(1988)

に下記の表題で掲載されたものである。

Behavioural changes after focal cerebral ischemia by left middle cerebral artery occlusion in rats.

第3章第2節の内容は

Yamamoto, M., Tamura, A., Kirino, T., Shimizu, M. and Sano, K.:

Stroke 20:362-366(1989)

に下記の表題で掲載されたものである。

Effects of a new thyrotropin-releasing hormone derivative on behavioral changes after focal cerebral ischemia in rats.

また Yamamoto, M., Shimizu, M., Kirino, T., Shimizu, M. and Sano, K.: Stroke 20:1089-1091 (1989)

に下記の表題で掲載されたものである。

Effects of a new thyrotropin-releasing hormone analogue administered in rats 1 week after middle cerebral artery occlusion.

また

Yamamoto, M., Tamura, A., Kirino, T., Shimizu, M. and Sano, K.:

European J. Pharmacology.

に下記の表題で印刷中のものである。

Effects of thyrotropin releasing hormone on behavioural disturbances in middle cerebral artery occluded rats.

第3章第3節の内容は

Yamamoto, M., Shimizu, M., Kawabata, S. and Terai, M.: Arch. int  
. Pharmacodyn 299:55-64(1989)

に下記の表題で掲載されたものである。

Effects of YM-14673, a new TRH analogue, on neurological  
deficits in rats with experimental cerebral hematoma.

第4章第1節の内容は

Yamamoto, M., Shimizu, M., Kawabata, S. and Terai, M.: Arch. int  
. Pharmacodyn. 306: 5-17(1990)に

下記の表題で掲載されたものである。

Effects of YM-14673, a new TRH analogue, on behavioural and  
electrophysiological changes in rats subjected to electrical  
lesion of the internal capsule.

#### 文 献

- 1)Schally, A.V., Bowers, Redding, T.W. and Barrett, J.F.,  
Biochem. Biophys. Res. Commun. 25,265(1966)
- 2)Boler, J., Enzmann, F., Folkers, K., Bowers, C.Y. and Schally,  
A.V., Biochem. Biophys. Res. Commun., 37,705(1969)
- 3)Jackson, I.M.D. and Reichlin, S., Endocrinology 95,854 (1974)
- 4)Oliver, C., Eskay, R.L., Ben-Jonathan, N. and Porter, J.C.,  
Endocrinology, 95,540 (1974)
- 5)Johannsson, O., Hokefelt, T., Jeffcoate, S.L., White, N. and  
Sternberger, L.A., Exp. Brain Res. 38, 1 (1980)
- 6)Fleisher, N., Vale, W., Dunn, T. and Guillemin, R., J. Clin.  
Endocrinol. Metab., 31,109(1970)
- 7)Bowers, C.Y., Frissen, H.G., Hwang, P., Guyda, H.J. and  
Folkers, K., Biochem. Biophys. Res. Commun., 45,1033 (1971)
- 8)Breese, G.R., Copper, B.R., Prange, A.J., Cott, J.M., Lipton,  
M.A., The thyroid axis, Drugs and Behavior: pp.115(1974)

- 20, 497(1981)
- 11) 佐野圭二、Adv Neurol Sci 23, 184(1979)
  - 12) Matsui, K., Mano, Y., Mukoyama, M., Muramoto, O., Toyoshima E., Ando K., Exp. Anim. 32, 13(1983)
  - 13) 祖父江逸郎, 神経研究の進歩 26, 172(1982)
  - 14) Kastin, A.J., Ehrensing, R.H., Schalch, D.S. and Anderson, M. S., Lancet, II, 999 (1972)
  - 15) Inanaga, K., Nakano, T., Tanaka, M. and Ogawa, N., Arch. Gen. Psychiat. 35, 1011(1978)
  - 16) Tirway, C.M., Rosenbloom, A.L., Robertson, M.F. and Parker, J. C., 4th Int. Cong. of Int. Society of Psychoneuroendocrinology, Berkeley, California, 1973
  - 17) Griffiths, E.C., Clin. Sci. 73(5), 449 (1987)
  - 18) Mccaul, J.A., Cassell, K.J. and Stern, G.M., Lancet, II 735 (1974)
  - 19) Inanaga, K. and Inoue, Y., Kurume Med. J. 28, 201 (1981)
  - 20) Engel, W.K., Siddique, T. and Nicoloff, J.T., Lancet 1, 73 (1983)
  - 21) Morgan, B.A., Bower, J.D., Dettmar, P.W., Metcalf, G. and Schafer, D.J., Proceedings of the Sixth American Peptide Symposium, Perce Cherm. Co., Rockford, II, 909 (1979)
  - 22) Verber, D.F., Holby, F.W., Varga, S.L., Hirschmann, R.F., Nutt, R.F., Lotti, V.J. and Porter, C.C., Proceedings of 14th European Peptide Symposium, Univ. of Brussels Press, Belgium, 453 (1976)
  - 23) Friderichs, E., Schweitner, E., Herrling, S., Gunzler, W.A., Otting, F. and Flohe, L., Structure and Activity of Natural Peptides Selected Topics, W. De Gruyter, Berlin, in press
  - 24) Miyamoto M., Fukuda, N., Narumi, S., Nagai, Y., Saji, Y., Nagawa, Y., Life Sci 28, 861(1981)
  - 25) 田村隼也、吉田、岩本英徳、塚本伸一、山本実、加賀美荘一、第107

回日本薬学会総会、東京

- 26) Faden, A.I., Jacobs, T.P. and Holaday, J.W., *Science* 211, 493 (1981)
- 27) Plotnikoff, N.P., Prange, A.J., Breese, G.R., Wilson, I.C., *Life Sci* 14, 1271 (1974)
- 28) Kenneth, A.C. and Andrew J.P., *Neuropeptides* 6, 101 (1985)
- 29) Plotnikoff, N.A., and Kastin, A.J., *adv. Biochem. Psychopharmacol.* 17, 81 (1977)
- 30) 宮本政臣、佐治美和、名川雄児, *日薬理誌* 85, 129 (1985)
- 31) König, J.F.R. and Klipper, R.A. *The Rat Brain* (1963)
- 32) Kato, T., Okada, M. and Yamaguchi, T., (1989) (in press)
- 33) 間中信也、佐野圭司、*医学のあゆみ* 102, 867 (1977)
- 34) 土居孝行、佐治美和、名川雄児、*薬理と治療* 6, 23 (1978)
- 35) Sobue, I., Yamamoto, H., Kanagaya, M., Iida M. and Takayanagi, T., *Lancet* i, 418 (1980)
- 36) 山崎直樹、新谷美佐子、佐治美和、名川雄児、*薬物精神行動* 3, 127 (1983)
- 37) 山崎直樹、新谷美佐子、佐治美昭、名川雄児、*薬物精神行動* 5, 1 (1985)
- 38) 山崎直樹、永岡明伸、名川雄児 *薬物精神行動* 6, 359 (1986)
- 39) Yamamoto, M. and Shimizu, M., *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol.* 338, 262 (1988)
- 40) Breese, G.R., Cott, J.M., Cooper, B.R., Prange, A.J., Lipton, M.A. and Plotnikoff, N.P., *J. Pharmac. Exp. Ther.* 193, 11 (1975)
- 41) Nagai, Y., Narumi, S., Nagawa, Y., Sakurada, O., Ueno, H. and Ishii, S., *J. Neurochem.* 35, 963 (1980)
- 42) Snider, R.S., Niemer, W.T., *A Stereotaxic Atlas of the Cat Brain* (University of Chicago Press) 1961
- 43) Fluton, J.F., Bailey, P., *J Nerv Ment Dis* 69, 1, 145, 261 (1924)

- 44)Cott, J.and Engel, J., Psychopharmacology 52,145(1977)
- 45)Nilson, B. and Ponten, U., J. Neurosurg. 47, 252-261 (1977)
- 46)Mellow, A.M., Sunderland, T., Cohen, R.M., Lawlor, B.A., Hill  
 , J.L., Newhouse P.A., Cohen, M.R. and Murphy, D.L.,  
 Psychopharmacology 98, 40 3 (1989)
- 47)Takeda, T., Hosokawa, M. ,Takeshita, S., Irino, M., Higuchi,  
 K., Matsushita, T., Tomita, Y., Yasuhira, K., Hamamoto, H.  
 Shimizu, K., Ishii, M., Yamamuro, T., Mech. Ageing Dev. 17,  
 183(1981)
- 48)Yamamoto, M., Tamura, A., Kirino T, Shimizu, M. and Sano, K.,  
 Stroke 20,362 (1989)
- 49)Kirino,T., Brain Res. 239,57 (1982)
- 50)Poel, A.M., Prog. Brain Res. 36,127(1972)
- 51)Roffmann, M. and Lal, H., Psychopharmacology 25,195(1972)
- 52)Freedmann, L.S., Judge, M.E., Wuartermain, D., Pharm. Biochem  
 . Behav. 17,187(1982)
- 53)Yamamoto, M., Shimizu, M., Iwai, A., Psychopharmacology 95,  
 162 (1988)
- 54)Yamamoto, M. and Shimizu, M., Neuropharmacology, 28,863(1989)
- 55)Miyamoto, M., Kiyota, Y., Yamazaki, N., Nagaoka, A., Matsuo,  
 T., Nagawa, Y. and Takeda, T., Physiology and Behavior 38,  
 399 (1986)
- 56)Higuchi, K., Matsumura, A., Honma, A., Takeshita, S.  
 Hashimoto, K., Hosokawa, M., Yasuhira, K., Takeda, T., Lab.  
 Invest. 48,231 (1983)
- 57)Tanaka, S., Yagi, H., Kawamata, T., Akiguchi, I., Nakamura, S  
 .. Hosokawa, M., Takeda, T., Kameyama, M., The 5th Congress  
 of SAM Research. abstr. p.35 (1988)
- 58)Ohno, T., Prog. Nerve 23,295(1979)
- 59)Boggan, W.O., Serotonin and Behavior, Academic Press, New  
 York pp162(1973)

- 60)Ruch-Monachon, M.A., Jalfre, M., Haefely, W., Arch. int. Pharmacodyn, 219,269(1976)
- 61)Yarbrough, G.G., Prog. Neurobiol., 12,291(1979)
- 62)Metcalf, G., Brain Res Rev. 4,389(1982)
- 63)寺井道夫(投稿中)
- 64)Anderson, J.L., Life Sci 32,1791(1983)
- 65)Tachikawa, S., Harada, M. and Maeno, H., Arch. int. Pharmacodyn. 238, 81 (1979)
- 66)Faden, A.I. and Jacob, T.P., Neurology 35,1331(1985)
- 67)Yamamoto, M., Shimizu, M. and Ozawa, Y., Arch. int. Pharmacodyn. 300, 29(1989)
- 68)Yasuhara, M. and Naito, H., Int. J. Neurosci. 21, 197 (1983)
- 69)Yasuhara, M. and Naito, H., Curr. Ther. Res. 16,346(1974)
- 70)佐治美昭、名川雄児、水野清史、日々野啓、基礎と臨床、9,262 (1975)
- 71)Hazama, N., Hasegawa, T., Ueda, T. and Sakuma, A., 臨床と研究 53,3781 (1976)
- 72)中間元隆, 脳神経30,443(1978)
- 73)大西治夫、伊藤千尋、鈴木和男、仁保健、山口和夫、佐藤正己、基礎と臨床, 16,6197(1982)
- 74)Sugitani, Y., Nakama, M., Yamaguchi, Y., Imaizumi, M., Nukada, T. and Abe, H., J. Nucl. Med. 14, 912 (1973)
- 75)Yamamoto, M., Shimizu, M., Kawabata, S. and Terai, M., Arch. int. Pharmacodyn. 299, 55 (1989)
- 76)Pulsinelli, W.A., Brierley, J.B. and Plum, F., Ann. Neurol. 11,491(1982)
- 77)Mohamed, A.A., Mendelow, A.D., Teasdale, G.M., Harper, A.M., McCulloch, J., J Cereb. Blood Flow Metab. 5,26(1986)
- 78)Okamoto, K., Yamori, Y. and Nagaoka, A., Cir. Res. Suppl. 1, 143(1974)
- 79)Holaday, J.W. and D,Amato, R.J, Life Sci 31, 385(1982)

- 80) Tamura, A., Goto, O., Graham, D.I., Nagashima, T., Matsutani, M., and Orii, H., J Cereb Blood Flow Metab 3(suppl 1), S363 (1983)
- 81) Yamamoto, M., Tamura, A., Kirino, T., Shimizu, M. and Sano, K., Brain Res. 452, 323(1988)
- 82) Tamura, A., Graham, D.I., McCulloch, J. Teasdale, G.M., J Cereb Blood Flow Metab 1, 53(1981)
- 83) Tamura, A., Gotoh, O., Sano, K., Nagashima, T., Matsutani, M., Orii, H. and Graham, D.I., 脳と神経 38, 859 (1986)
- 84) Tamura, A., Nakayama, H., Kirino, T., Tomukai, N., Sano, K. and Kanazawa, I., Cerebral Blood Volume (in press)
- 85) Latham, A., Lye, R.H., Schrewsbury-Gee, J., Slater, P., Regul Pept 13, 80(1985)