

人成長ホルモン放出因子による山羊の成長ホルモン放出に 及ぼすソマトスタチンの抑制作用

誌名	畜産試験場研究報告 = Bulletin of the National Institute of Animal Industry
ISSN	0077488X
著者	甫立, 孝一 上家, 哲 川端, 麻夫 布施, 洋 大箸, 信一
巻/号	47号
掲載ページ	p. 23-28
発行年月	1988年3月

人成長ホルモン放出因子による山羊の成長ホルモン 放出に及ぼすソマトスタチンの抑制作用

南立孝一・上家 哲・川端麻夫・布施 洋・大箸信一*

要 約

合成人成長ホルモン放出因子 (hGRF-44) による山羊の成長ホルモン(GH) 放出に及ぼすソマトスタチン(SS-14) の抑制作用を検討した。hGRF-44 および SS-14 の静脈内投与前後の頸静脈血を針採血により経時的に採取し、血漿中の GH 濃度はラジオイムノアッセイ法で測定した。hGRF-44 (体重 kg 当り 0.25 μ g) と生理食塩水(SS-14 0 μ g) を同時に注射した子山羊の血漿中 GH 濃度は5分以内に有意に上昇し ($P < 0.01$), 10分後に頂値に達した。一方、同量の hGRF-44 と SS-14 500 μ g または 1,000 μ g の同時注射後の GH 濃度は5分経過後から上昇し、15分後に頂値に達したが、これらの頂値は投与量に反比例して低く、いずれも SS-14 0 μ g 区の頂値より低い値であった。特に、1,000 μ g 区の頂値は有意に低かった ($P < 0.01$)。各処置後放出された GH の総分泌量 (注射後60分間の GH 反応曲線下の面積) も SS-14 の投与量の増加に伴って減少し、1,000 μ g 区の値は 0 μ g または 500 μ g 区の値に比べ有意に小さくなった ($P < 0.05$)。これらの結果は、hGRF-44 による山羊の GH 放出に及ぼす SS-14 の抑制作用が投与量に比例して大きくなることを示している。

緒 言

動物の成長ホルモン (GH) 分泌は、視床下部の成長ホルモン放出因子 (GRF) と成長ホルモン放出抑制因子 (GIF; 別名ソマトスタチン) の二重支配を受けると考えられている¹⁾。44個のアミノ酸から成る GRF は、1982年に末端巨大症の人において腫瘍組織からはじめて単離され²⁾、その後視床下部由来の GRF と同一物質であることが明らかにされた³⁾。この天然および合成人 GRF (hGRF-44) は、人²⁾やラット²⁾だけでなく、牛⁴⁻⁶⁾、羊⁷⁻⁹⁾、山羊^{4,8,10)}、豚^{7,11)} および鶏^{12,13)} においても高い GH 放出活性を示す。一方、アミノ酸 14個から成るソマトスタチン (SS-14) は、1973年にはじめて羊の視床下

部から単離、精製された¹⁴⁾。この天然および合成 SS-14 はラットの GH 分泌を抑制し^{15,16)}、アルギニンおよび L-dopa 負荷後の人の GH 放出も抑制する¹⁷⁾。また家畜においても、アルギニン¹⁸⁾またはプロスタグランディン E₁¹⁹⁾ 投与による羊 GH 分泌の増加、ならびにプロスタグランディン F_{2a}²⁰⁾ 投与による牛 GH 分泌の増加などが抑制されることが明らかにされた。さらに、GRF の発見以後、*in vitro* において、hGRF によるラット GH 放出がソマトスタチンによって抑制されることが報告された^{21,22)}。家畜において外因性 GRF による GH 放出に及ぼすソマトスタチンの影響を調べた報告はきわめて少なく、SS-14 の前処置および同時投与によって hGRF-44 による雄子牛の GH 放出が有意に抑制されるという著者らの報告がみられるにすぎない²³⁾。

そこで、GRF 処置山羊においても、ソマトスタチン投与によって牛と類似の GH 放出抑制反応がみられるかどうか、また投与量によって抑制反応が影響されるかどうかを検討した。

実験材料および方法

供試動物として、当場産の3ヵ月齢のシバ雄子山羊4~5頭 (平均体重 11 kg) を用い、実験は1月中旬~2月上旬に行った。

合成 hGRF-44 および SS-14 は、OHASHI ら^{24,25)} が固相法によって合成したものを、それぞれ使用直前に滅菌した生理食塩水 0.5~1 ml に溶解して用いた。体重 kg 当り 0.25 μ g の hGRF-44 と1頭当り 500 μ g あるいは 1,000 μ g の SS-14 を同時に各実験動物の頸静脈内に注射した (hGRF-44 + SS-14)。また対照として、同量の hGRF-44 と生理食塩水 0.5 ml (SS-14 0 μ g) を同時に注射した (hGRF-44 + Saline)。これらの注射は午前11時 (給餌後2時間) に行い、各処置は1週間間隔で行った。

GH 測定用の血液試料は、hGRF-44 および SS-14 の同時注射前10分から注射後60分の間、各動物の頸静脈から針採血によって約 3~4 ml をヘパリン加試験管内に経時的に採取した。採取血液は直ちに氷冷後、血漿を分離

昭和62年11月4日受付

* 繊維高分子材料研究所

して GH 測定時まで -60°C で保存した。

血漿中の GH 濃度はラジオイムノアッセイ法で測定した²⁶⁾。SS-14 の抑制効果を検討するために、各注射に反応して放出された GH の総分泌量、すなわち注射直前(0分)から注射後60分間の GH 反応曲線下の面積を測定し比較検討した。測定値間の差の有意性は *t*-検定²⁷⁾により求めた。

実験結果

hGRF-44 + Saline 注射後の平均血漿 GH 濃度は、0分の 15.6 ng/ml から5分の 114.1 ng/ml ($P < 0.01$) および10分の頂値 130.5 ng/ml ($P < 0.01$) へ有意に上昇した(図1)。

一方、hGRF-44 + SS-14 500 μg 注射後の GH 濃度は5分では上昇せず(6.4 ng/ml)、その後上昇し15分に頂値 97.6 ng/ml ($P < 0.01$)に達した。この時の5分値は対応する hGRF-44 + Saline 区の GH 値よりも有意に

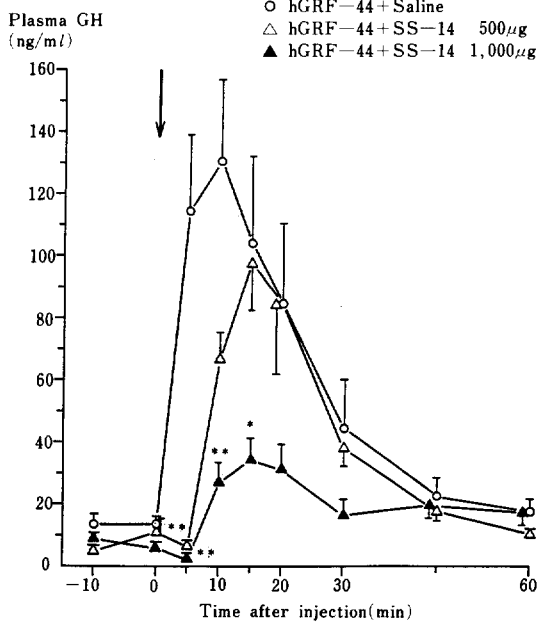


Fig. 1. Plasma GH response to a single intravenous injection of hGRF-44 [0.25 μg per kg of body weight (bw)] in combination with saline (0 μg of SS-14, ○) or SS-14 (500 μg , △; 1,000 μg , ▲) in Japanese native meat-type (Shiba) male goats (3 months old). An arrow indicates the time of each injection. Asterisks indicate the statistical differences; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ as compared with the corresponding levels of hGRF-44 in combination with saline. Each point with a bar represents Mean \pm SE ($n = 4-5$).

Table 1. Total amount of GH released in response to a single intravenous injection of hGRF-44 (0.25 μg per kg of bw) in combination with saline or SS-14; area under GH response curve for 60 min after each injection, in Shiba male goats (3 months old). The value is expressed as Mean \pm SE.

SS-14 dose (\bar{x} d)	n	Area (ng·min·ml ⁻¹)
0 (Saline)	4	3,438.4 \pm 849.2
500	4	2,335.5 \pm 383.1
1,000	5	1,203.9 \pm 231.9*

* $P < 0.05$ as compared with the value of 0 μg or 500 μg of SS-14.

低い値であった ($P < 0.01$; 図1)。さらに hGRF-44 + SS-14 1,000 μg 注射後の GH 濃度も5分では上昇せず(2.8 ng/ml)、その後漸増して15分に頂値 34.1 ng/ml ($P < 0.01$)を示した。この頂値は hGRF-44 + Saline 区の頂値に比べ有意に低い値であった ($P < 0.01$)。また、5~15分の GH 濃度もそれぞれ対応する hGRF-44 + Saline 区の GH 濃度に比べ有意に低い値であった ($P < 0.05$; 図1)。

各注射に対して放出された GH の総分泌量は表1に示したように、SS-14 の投与量の増加に伴って減少した。SS-14 1,000 μg 投与区の値は、SS-14 0 μg あるいは500 μg 区の値に比べ有意に小さくなった ($P < 0.05$)。

このように、hGRF-44 に対するシバ山羊の GH 放出に及ぼす SS-14 の抑制効果は投与量に比例して大きくなるのが認められた。

考 察

本実験結果は、外因性 GRF による山羊の GH 放出反応がソマトスタチンの同時投与によって有意に抑制され、その抑制効果はソマトスタチンの投与量に依存することを示している。類似の投与量依存性の抑制効果は、hGRF-44 (0.25 $\mu\text{g}/\text{kg}$) 注射前5分から注射後45分の間、1分間当たり 10 μg または 20 μg の SS-14 を連続注入した3ヵ月齢の雌子牛においても観察されている²⁸⁾。これらの結果は、hGRF による GH 放出がソマトスタチンの同時投与によって用量-反応的に抑制されるラットを用いた *in vitro* の実験結果²³⁾と一致する。

SS-14 による山羊の GH 放出抑制作用は、先に報告された雄牛^{20,23)}同様、SS-14 の投与後きわめて早い時期、すなわち10分以内に消失するものと推測される。このような SS-14 の効力の早期消失または減退は、SS-14 の

生物学的半減期が人における1.1~3.0分²⁹⁾やイヌにおける1.8分³⁰⁾と同様きわめて短かいことを反映しているものと考えられる。

アミノ酸14個から成る SS-14 は、最初羊視床下部から単離、精製されたが¹⁴⁾、豚³¹⁾およびラット視床下部³²⁾からも相次いで分離され、羊視床下部 SS-14 と同一物質であることが確認された。その後、SS-14 の外に28個のアミノ酸から成るソマトスタチン (SS-28) も豚³³⁾および羊視床下部³⁴⁾からそれぞれ単離され、両者の構造もまったく一致することが確認された。この SS-28 のラットの GH およびインスリン分泌抑制効果は SS-14 より大きく、持続的であると言われる³⁵⁾。また、*in vitro* における hGRF-44 によるラット GH 放出抑制に及ぼす効果も SS-14 に比べ大きいことが報告されている²¹⁾。

従って、家畜においても、SS-28 を使用した場合、SS-14 よりも大きい GH 放出抑制効果が得られる可能性がある。

最近、SS-14 をアジュバントを使って子羊に能動免疫したところ、対照羊に比べて増体量が有意に大きくなり、飼料効率が上昇することが SPENCER ら³⁶⁾によって報告されたが、他のグループによる同様な研究では血清 GH 濃度の有意な上昇が得られたにも関わらず羊の増体量に有意な変化はみられていない³⁷⁾。GH やインスリンなどの分泌を減少させるソマトスタチンの作用を抑制ないしは中和する方法はきわめて興味深い、家畜の発育あるいは泌乳に及ぼす効果については今後の検討がさらに必要と考える。

引用文献

- 1) GLUCKMAN, P.D., B.H. BREIER and S.R. DAVIS: Physiology of the somatotrophic axis with particular reference to the ruminant. *J. Dairy Sci.*, **70**, 442—466, 1987
- 2) GUILLEMIN, R., P. BRAZEAU, P. BÖHLEN, F. ESCH, N. LING and W.B. WEHRENBURG: Growth hormone-releasing factor from a human pancreatic tumor that caused acromegaly. *Science*, **218**, 585—587, 1982
- 3) LING, N., F. ESCH, P. BÖHLEN, P. BRAZEAU, W.B. WEHRENBURG and R. GUILLEMIN: Isolation, primary structure, and synthesis of human hypothalamic somatotrocinin: Growth hormone-releasing factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **81**, 4302—4306, 1984
- 4) HODATE, K., T. JOHKE, A. KAWABATA, S. OHASHI, M. SHIRAKI and S. SAWANO: Effect of synthetic growth hormone-releasing factor from a human pancreatic tumor on bovine and caprine growth hormone secretion. *Jpn. J. Zootech. Sci.*, **55**, 66—68, 1984
- 5) JOHKE, T., K. HODATE, S. OHASHI, M. SHIRAKI and S. SAWANO: Growth hormone response to human pancreatic growth hormone releasing factor in cattle. *Endocrinol. Japon.*, **31**, 55—61, 1984
- 6) MOSELEY, W.M., L.F. KRABILL, A.R. FRIEDMAN and R.F. OLSEN: Growth hormone response of steers injected with synthetic human pancreatic growth hormone-releasing factors. *J. Animal Sci.*, **58**, 430—435, 1984
- 7) DELLA-FERA, M.A., F.C. BUONOMO and C.A. BAILE: Growth hormone releasing factors and secretion of growth hormone in sheep, calves and pigs. *Domestic Anim. Endocr.*, **3**, 165—176, 1986
- 8) HODATE, K., T. JOHKE, A. KAWABATA, H. FUSE, S. OHASHI, M. SHIRAKI and S. SAWANO: Influences of dose, age and sex on plasma growth hormone response in goats and sheep to synthetic human growth hormone-releasing factor. *Jpn. J. Zootech. Sci.*, **56**, 41—48, 1985
- 9) DELLA-FERA, M.A., F.C. BUONOMO and C.A. BAILE: Growth hormone secretory responsiveness to multiple injections of growth hormone-releasing factor in sheep. *Domestic Anim. Endocr.*, **3**, 153—164, 1986
- 10) HART, I.C., S. JAMES, B.N. PERRY and A.D. SIMMONDS: Effect of intravenous administration of growth hormone-releasing factor (hpGRF-44) and Tyr-D-Trp-Ala-Trp-D-Phe-NH₂ on plasma hormones and metabolites in goats. *J. Endocr.*, **103**, 173—178, 1984
- 11) 甫立孝一・上家 哲・川端麻夫・布施 洋・大箸信一・白木 勝・澤野眞二：豚の成長ホルモン放出に及ぼす合成ヒト成長ホルモン放出因子の影響。畜試研報, **45**, 13—17, 1986
- 12) LEUNG, F.C. and J.E. TAYLOR: *In vivo* and *in vitro* stimulation of growth hormone release in chickens by synthetic human pancreatic growth hormone releasing factor (hpGRFs). *Endocrinology*, **113**, 1913—

- 1915, 1983
- 13) HARVEY, S. and C.G. SCANES : Comparative stimulation of growth hormone secretion in anaesthetized chicken by human pancreatic growth hormone-releasing factor (hpGRF) and thyrotrophin-releasing hormone (TRH). *Neuroendocrinology*, **39**, 314—320, 1984
 - 14) BRAZEAU, P., W. VALE, R. BURGUS, N. LING, M. BUTCHER, J. RIVIER and R. GUILLEMIN : Hypothalamic polypeptide that inhibits the secretion of immunoreactive pituitary growth hormone. *Science*, **179**, 77—79, 1973
 - 15) BRAZEAU, P., J. RIVIER, W. VALE and R. GUILLEMIN : Inhibition of growth hormone secretion in the rat by synthetic somatostatin. *Endocrinology*, **94**, 184—187, 1974
 - 16) SAWANO, S., Y. BABA, T. KOKUBU and Y. ISHIZUKA : Effect of synthetic growth hormone-release inhibiting factor on the secretion of growth hormone and prolactin in rats. *Endocrinol. Japon.*, **21**, 399—405, 1974
 - 17) SILER, T.M., G. VANDENBERG, S.S.C. YEN, P. BRAZEAU, W. VALE and R. GUILLEMIN : Inhibition of growth hormone release in humans by somatostatin. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **37**, 632—634, 1973
 - 18) DAVIS, S.L. : Somatostatin : Its influence on plasma levels of growth hormone, prolactin and thyrotropin in sheep. *J. Animal Sci.*, **40**, 911—916, 1975
 - 19) DAVIS, S.L. and M. ANFINSON : Dose-response influence of prostaglandin E₁ and somatostatin on plasma levels of growth hormone, prolactin and thyrotropin in sheep. *J. Animal Sci.*, **41**, 172—177, 1975
 - 20) HAFS, H.D., T.E. KISER, N.B. HAYNES, J.S. KESNER and J.N. STELLFLUG : Release of pituitary hormones, cortisol, testosterone and insulin in response to prostaglandin F_{2α} given during intracarotid infusion of somatostatin in bulls. *J. Animal Sci.*, **44**, 1061—1066, 1977
 - 21) BRAZEAU, P., N. LING, P. BÖHLEN, F. ESCH, S.-Y. YING and R. GUILLEMIN : Growth hormone releasing factor, somatocrinin, releases pituitary growth hormone *in vitro*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**, 7909—7913, 1982
 - 22) VALE, W., J. VAUGHAN, G. YAMAMOTO, J. SPIESS and J. RIVIER : Effects of synthetic human pancreatic (tumor) GH releasing factor and somatostatin, triiodothyronine and dexamethasone on GH secretion *in vitro*. *Endocrinology*, **112**, 1553—1555, 1983
 - 23) HODATE, K., T. JOHKE, A. KAWABATA, S. OHASHI, M. SHIRAKI and S. SAWANO : Effects of synthetic growth hormone-releasing factor and somatostatin on growth hormone secretion in young bulls. *Jpn. J. Zootech. Sci.*, **55**, 120—123, 1984
 - 24) OHASHI, S., K. OHTAKA, M. SHIRAKI, S. SAWANO, S. OZAKI, M. MORI and T. TAKAOKA : Synthesis of hpGRF-44 and its analogs. *Peptide Chemistry*, **1983**, 291—296, 1984
 - 25) OHASHI, S., S. SAWANO and T. KOKUBU : Synthesis and biological activities of somatostatin analogs II. *Peptide Chemistry*, **1976**, 135—138, 1977
 - 26) JOHKE, T. : Effects of TRH on circulating growth hormone, prolactin and triiodothyronine levels in the bovine. *Endocrinol. Japon.*, **25**, 19—26, 1978
 - 27) SNEDECOR, G.W. and W.G. COCHRAN : *Statistical methods*, 7th ed., 83—106, The Iowa State University Press, Ames, Iowa, U.S.A., 1980
 - 28) 甫立孝一・上家 哲・川端麻夫・布施 洋・大箸信一 : 牛および山羊の成長ホルモン放出に及ぼす合成 hGRF-44 およびソマトスタチンの影響. 第79回日本畜産学会大会講演要旨, 191, 1987
 - 29) SHEPPARD, M., B. SHAPIRO, B. PIMSTONE, S. KRONHEIM, M. BERELOWITZ and M. GREGORY : Metabolic clearance and plasma half-disappearance time of exogenous somatostatin in man. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **48**, 50—53, 1979
 - 30) SCHUSDZIARRA, V., V. HARRIS and R.H. UNGER : Half-life of somatostatin-like immunoreactivity in canine plasma. *Endocrinology*, **104**, 109—110, 1979

- 31) SCHALLY, A.V., A. DUPONT, A. ARIMURA, T.W. REDDING, N. NISHI, G.L. LINTHICUM and D.H. SCHLESINGER : Isolation and structure of somatostatin from porcine hypothalami. *Biochemistry*, **15**, 509—514, 1976
- 32) BÖHLEN, P., R. BENOIT, N. LING, R. GUILLEMIN and P. BRAZEAU : Isolation and characterization of rat hypothalamic somatostatin. *Endocrinology*, **108**, 2008—2010, 1981
- 33) SCHALLY, A.V., W.-Y. HUANG, R.C.C. CHANG, A. ARIMURA, T.W. REDDING, R.P. MILLAR, M.W. HUNKAPILLER and L.E. HOOD : Isolation and structure of pro-somatostatin : A putative somatostatin precursor from pig hypothalamus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **77**, 4489—4493, 1980
- 34) ESCH, F., P. BÖHLEN, N. LING, R. BENOIT, P. BRAZEAU and R. GUILLEMIN : Primary structure of ovine hypothalamic somatostatin-28 and somatostatin-25. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **77**, 6827—6831, 1980
- 35) TANNENBAUM, G.S., N. LING and P. BRAZEAU : Somatostatin-28 in longer acting and more selective than somatostatin-14 on pituitary and pancreatic hormone release. *Endocrinology*, **111**, 101—107, 1982
- 36) SPENCER, G.S.G., G.J. GARSSEN and I.C. HART : A novel approach to growth promotion using auto-immunization against somatostatin. I. Effects on growth and hormone levels in lambs. *Livest. Prod. Sci.*, **10**, 25—37, 1983
- 37) VARNER, M.A., S.L. DAVIS and J.J. REEVES : Temporal serum concentrations of growth hormone, thyrotropin, insulin, and glucagon in sheep immunized against somatostatin. *Endocrinology*, **106**, 1027—1032, 1980

Depression by Somatostatin on Synthetic Human Growth Hormone-Releasing Factor-Induced Growth Hormone Release in Goats

Koichi HODATE, Tetsu JOHKE, Asao KAWABATA, Hiroshi FUSE and Shinichi OHASHI*

Summary

We studied the effect of somatostatin (SS-14) on human growth hormone-releasing factor (hGRF-44)-induced growth hormone (GH) release in Japanese native meat-type (Shiba) male goats (3 months old). The jugular venous blood samples were taken by venipuncture before, and during 60 min after a single intravenous injection of synthetic hGRF-44 in combination with synthetic SS-14 or saline. plasma concentration of GH was measured by radioimmunoassay. When hGRF-44 (0.25 μg per kg of body weight) and saline (0 μg of SS-14) were injected simultaneously, the mean plasma GH concentration of the kids increased significantly from the value of 15.6 ng/ml at 0 min to 114.1 ng/ml ($P < 0.01$) at 5 min, and to the peak value of 130.5 ng/ml ($P < 0.01$) at 10 min. In contrast, the concentrations of plasma GH at 5 min in the kids received simultaneous injection of hGRF-44 and 500 μg or 1,000 μg of SS-14 (6.4 and 2.8 ng/ml, respectively) did not increase, and both the concentrations of GH at 5 min were significantly ($P < 0.01$) lower than the corresponding value of GH in the animals injected hGRF-44 in combination with saline. Thereafter, both the plasma GH levels elevated gradually, and the peak values (97.6 and 34.1 ng/ml, respectively) were obtained at 15 min. The peak value of GH in the kids receiving 1,000 μg of SS-14 was significantly ($P < 0.01$) low compared with that produced by the animals given saline. The total amount of GH released in response to each treatment, area under the GH response curve for 60 min after each injection, decreased inversely proportional to the dose of SS-14. The area in the kids given 1,000 μg of SS-14 was significantly ($P < 0.05$) lower than those obtained by the animals treated with saline or 500 μg of SS-14. The results demonstrate that the depression by somatostatin on exogenous GRF-induced caprine GH release exhibits the dose-response relationship.

* Research Institute for Polymers and Textiles