

Title	炎症性サイトカインの混合投与によるラット視床下部室傍核における一酸化窒素代謝産物の変化
Sub Title	
Author	脇田, 哲矢
Publisher	慶應医学会
Publication year	2003
Jtitle	慶應医学 (Journal of the Keio Medical Society). Vol.80, No.1 (2003. 3) ,p.5-
JaLC DOI	
Abstract	
Notes	号外
Genre	Journal Article
URL	<a href="https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=AN00069296-20030304-0005">https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=AN00069296-20030304-0005</a>

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the KeiO Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

# 炎症性サイトカインの混合投与による ラット視床下部室傍核における一酸化窒素代謝産物の変化

脇田 哲矢

## 内容の要旨

中枢神経系において一酸化窒素(NO)は微小血管の拡張作用や神経伝達作用を持つとされる一方で、酸化力の強いペルオキシナイトラートとなり細胞膜の脂質過酸化やDNA傷害を起こすことが知られている。これらの神経毒性としての性質から、脳外傷、感染症などの中枢神経系疾患に関与する報告がなされている。炎症性サイトカインは*in vitro*の実験にて誘導型一酸化窒素合成酵素(iNOS)を発現させる物質であり、中枢神経疾患におけるNOの産生には炎症性サイトカインが介在している可能性があるが、直接生体局所にサイトカインを投与しNO動態を検討した報告はない。本実験はストレス中枢でありサイトカイン産生部位である視床下部室傍核(PVN)に炎症性サイトカインを投与し、NO動態の変化を検討した。

〈方法〉①PVNにおける炎症性サイトカイン投与によるNO代謝産物(NOx)の変化生体局所での微量物質の回収が行えるマイクロダイアリシス法を用いてNOxの計測を行った。無麻酔自由行動のラットのPVNにおけるNOx値を測定し、さらに同部位にサイトカイン(TNF $\alpha$  (10ng)、IL-1 $\beta$  (2ng)とIFN $\gamma$  (2ng))を単独または混合投与しその後の変化を計測した。

②PVNにおける炎症性サイトカイン投与によるiNOS mRNAの検索  
サイトカインの混合投与後にPVNからtotal RNAを抽出し、iNOSのmRNAの発現をRT-PCRを用いて行った。

③PVNにおける炎症性サイトカイン投与によるiNOSタンパク質の同定

サイトカインの混合投与後にPVNの凍結切片を作成し、抗iNOS抗体を用いて免疫組織学的検索を行った。

〈結果〉①TNF $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ とIFN $\gamma$ のそれぞれを単独で視床下部室傍核へ投与したが、いずれも投与8時間後までNOx値に変化は認められなかった。TNF $\alpha$ とIFN $\gamma$ の混合投与ではNOx値は140分後から漸増し、380分でコントロール値の1.8倍に達した。TNF $\alpha$ とIL-1 $\beta$ の混合投与では、NOx値は最大でコントロール値の1.7倍になった。3種のサイトカインを混合投与するとNOx値は120分後から漸増し最大でコントロール値の3.3倍に達した。またiNOSの選択的阻害薬であるアミノグアニジンは、炎症性サイトカイン投与後のNOxの産生を有意に抑制した。

②RT-PCRの結果、混合サイトカインを投与したPVNでは、コントロールに対しiNOSのmRNAの発現が有意に強く認められた。

③炎症性サイトカインを混合投与したPVNにおいて、プローブ挿入部の先端を中心に抗iNOS抗体陽性の細胞が認められた。しかしコントロール群においても抗iNOS抗体陽性細胞は存在し、陽性細胞数に有意差は認められなかった。

以上の実験により、内因性の物質である炎症性サイトカインの相乗効果によって、無麻酔自由行動のラットPVNでは、iNOSを介してNOの産生が増加することが示唆された。

## 論文審査の要旨

ラジカルである一酸化窒素(NO)は、NO合成酵素(NOS)によって産生され、中枢神経系において血管拡張作用・神経伝達作用を持つとされる一方で、酸化力の強いペルオキシナイトラートとなり細胞膜の脂質過酸化やDNA傷害を起こすことが知られている。中枢神経系由来の培養細胞への炎症性サイトカインの刺激によりNOの産生増加が認められるが、生体の中枢神経に直接サイトカインを投与してNO動態を検討した報告はない。本研究では、自由行動下のラットに対し、ストレス中枢である視床下部室傍核(PVN)にTNF $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IFN $\gamma$ を投与しNO動態の変化を検討した。脳実質の局所の微量物質が回収できるマイクロダイアリシス法(MD法)を用いて行った実験では、サイトカインの単独投与ではNO代謝産物(NOx)の産生増加は認められないものの、TNF $\alpha$ とIFN $\gamma$ の混合投与では対照群の1.8倍に、TNF $\alpha$ とIL-1 $\beta$ の混合投与ではNOxは1.7倍に増加した。三種混合投与では、NOxは3.3倍に達し、それらの反応はサイトカインの相乗効果であると考えられた。さらに誘導型iNOSに対し選択的な阻害剤であるアミノグアニジンの腹腔内投与によりサイトカインによるNOxの産生増加は有意に抑制され、さらにPVNにおけるiNOS mRNAの転写促進があることから、NOxの産生増加はiNOSの作用によるものと考えられた。また、対照群と密度に有意差を認めなかったものの、免疫組織化学的検討よりサイトカイン投与部位近傍での抗iNOS抗体陽性細胞が認められた。以上よりPVNへのサイトカインの投与によりiNOSが産生されNOの産生が増加する可能性が示された。

審査では、本実験に至った経緯について質問がなされ、ストレス中枢と性ホルモン動態の解明の実験に取り組んだ過程であると回答された。それに対し、直接的にアプローチする実験を計画すべきだとの意見が述べられた。また、半定量的RT-PCRについて、定量性を得るためにリアルタイムPCR等を利用して精度を向上すべきとの意見が述べられた。また、MD法でNO活性が上昇したにも関わらず、免疫組織化学法にて抗iNOS抗体陽性細胞数が対照群と比較して有意差がなかったことについて質問がなされた。免疫組織化学法では、任意の断面の陽性細胞数の比較は酵素の活性化を直接反映しないとの回答がなされたが、より客観的に論文上で考察すべきであるとの意見が述べられ、論文に加筆が要請された。さらには、実験で産生されたNOの生理学的作用についても今後検討すべきであるという意見が述べられた。

以上のように、本研究はなおいくつかの検討を要する点は残されたものの、生体におけるサイトカイン投与によるNO産生を経時的に観察し、サイトカインの相乗効果を確認したこと、さらにその機序の一部を明らかにした点で、有意義な研究であると評価された。

論文審査担当者 主査 産婦人科学 野澤 志朗

医化学 末松 誠 生理学 岡野 栄之

神経精神医学 鹿島 晴雄 内科学 福内 靖男

学力確認担当者：

審査委員長：末松 誠

試問日：平成14年11月12日