

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(Wakita, Tetsuya) 野澤, 志朗
Publisher	慶應医学会
Publication year	2003
Jtitle	慶應医学 (Journal of the Keio Medical Society). Vol.80, No.2 (2003. 6) ,p.T39- T49
JaLC DOI	
Abstract	
Notes	学位論文
Genre	Journal Article
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=AN00069296-20030601-0039

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.

学 位 論 文

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

慶應義塾大学医学部産婦人科学教室

(指導：野澤志朗教授)

わき た てつ や
脇 田 哲 矢

(平成 14 年 6 月 6 日受付)

Key words : paraventricular nucleus, nitric oxide synthase, tumor necrosis factor alpha, interleukin-1 beta, interferon gamma

1980 年に内皮細胞由来平滑筋弛緩因子として Furchgott らが想定した物質は¹⁾, その後ガス状ラジカルである一酸化窒素 (Nitric Oxide 以下 NO と略す) であることが判明した²⁾. NO 合成酵素 (Nitric oxide synthase 以下 NOS と略す) は, L-アルギニンと分子状酸素を基質とし, NADPH, FMN, FAD, テトラヒドロbiopterin ((6R)-5,6,7,8-tetrahydro-L-biopterin 以下 H₄B と略す) を補酵素として, L-シトルリンと NO の生成を触媒する酵素である. NOS には 3 種のアイソフォームが存在する. 主として中枢・末梢神経, 副腎髄質に分布する神経型 NOS (neuronal NOS 以下 nNOS と略す) と血管内皮細胞に存在し血管弛緩作用を持つ血管内皮型 NOS (endothelial NOS 以下 eNOS と略す) は構成型 NOS であり, 通常は不活性型として存在し細胞質 Ca²⁺濃度の上昇時にカルモジュリンを介して活性化される. 一方, 誘導型 NOS (inducible NOS 以下 iNOS と略す) は通常状態では発現しておらず, 炎症刺激によりマクロファージ, 白血球, 脳グリア細胞などで誘導される. iNOS はカルモジュリン親和性が強い³⁾ため, 細胞内 Ca²⁺濃度非依存性の酵素活性を有する. さらに iNOS は high output NO 合成系とよばれ, 一度誘導されると大量の NO を合成し NO の局所濃度を著しく上昇させる³⁾.

NO 供与体や NO 合成阻害薬を用いた実験により, NO の中枢神経系における様々な生理学的作用が検討されてきた. 中枢神経系の血管の拡張作用以外にも, 海馬

における記憶の長期増強 (long term potentiation)⁴⁾や小脳のプルキンエ細胞での長期抑圧 (long term depression)⁵⁾等のシナプスの可塑性に關与する報告がなされている. しかし, その一方で, NO は炎症反応において同時に産生されるスーパーオキシドと反応し酸化力の強いペルオキシナイトライトとなる. ペルオキシナイトライトは細胞膜の脂質過酸化を引き起こし, DNA に傷害を起こすことが知られている⁶⁾. このような神経毒性としての性質から, 脳外傷⁷⁾, アルツハイマー病⁸⁾, AIDS 脳症⁹⁾などの中枢神経系の疾患に關与する可能性が示唆されている.

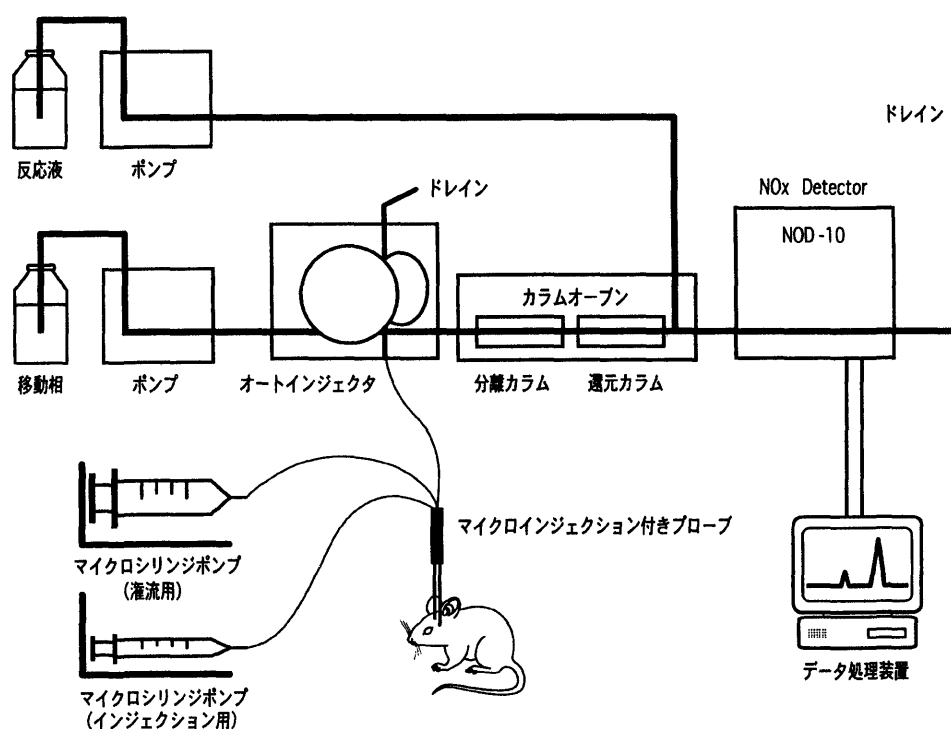
iNOS を発現させる物質として, 外因性としては細菌毒素であるリポポリサッカライド (lipopolysaccharide 以下 LPS と略す), 内因性としては炎症性サイトカインがあげられる¹⁰⁾. 腫瘍壊死因子 α (以下 TNF α と略す), インターロイキン β (以下 IL-1 β と略す), インターフェロン γ (以下 IFN γ と略す) などは後者に含まれ, 炎症性疾患発症時に局所での産生が増加する. 炎症性サイトカインの産生は免疫担当細胞のみではなく, 中枢神経系細胞自身も産生し, さらにそのレセプターも有しているため^{11,12)}, 各種培養グリア細胞において炎症性サイトカインの産生, 炎症性サイトカイン投与による iNOS の誘導と NO の産生が報告されている^{10,13,14)}. また, ラットに LPS を全身投与すると, 視床下部において IL-1 β と TNF α のレベルが上昇し¹⁵⁾, 視床下部室傍核 (paraventricular nuclei, 以下 PVN と略す) の iNOS

本論文は, Wakita T, Shintani F, Yagi G, Nozawa S, Asai M : Combination of inflammatory cytokines increases nitrite and nitrate levels in the paraventricular nucleus of conscious rats. Brain Res 905 : 12-20, 2001 の一部を含む.

mRNA の転写を促進することが報告されている¹⁶⁾。これらのことから LPS による iNOS 誘導においても、内因性因子である炎症性サイトカインが関わってくることが示唆される。しかしながら今日まで *in vivo* において、LPS の関与なしに炎症性サイトカインのみによる iNOS 誘導の直接証拠は報告されてない。本研究¹⁷⁾では無麻酔自由行動下のラットを用い、炎症性サイトカインを PVN へ注入し NO の代謝産物である亜硝酸イオン（以下 NO_2^- と略す）と硝酸イオン（以下 NO_3^- と略す）の経時的な変化をマイクロダイアリス法により観察することにより、内因性の炎症性サイトカインが NO 産生に作用をしているかを検討した。さらにサイトカイン投与時の NO 産生に iNOS の関与の有無の検討を、マイクロダイアリス法、RT-PCR、免疫組織化学法を用いて検討を行った。

対象および方法

6 週齢の Sprague-Dawley 系ラット（体重 240～260 g）を三協ラボサービス（静岡）より購入した。ラットは 12 時間の昼夜間隔、室温制御（23～25℃）、自由摂食摂水条件のもとで飼育した。実験は「慶應義塾大学医学部動物実験ガイドライン」（1988）に準拠してとり行った。合成ヒト型 IL-1 β （specific activity 20 million U/mg protein）は大塚製薬（徳島）から提供された。合成マウス型 TNF α （specific activity：20 million U/mg protein）、合成ラット型 IFN- γ （0.9 million U/mg）、aminoguanidine hemisulfate salt（以下アミノグアニジンと略す）は Sigma（St. Louis, MO, USA）から購入した。ウサギ型抗ラット iNOS ポリクローナル抗体は Santa Cruz Biotechnology 社（Santa Cruz, CA, USA）より購入した。その他の試薬に関しては記載のない限り和光化学（大阪）より購入した。



第1図 無麻酔自由行動下におけるラットのマイクロダイアリス法による NO 代謝産物の測定装置。ラット頭部にマイクロダイアリス用側管付きプローブを挿入し、灌流はハンクス液微速ポンプを用いて流速 1 $\mu\text{l}/\text{分}$ で行った。灌流液は 20 分毎に自動回収した。NO detector-HPLC system により、各灌流液中の NO_2^- と NO_3^- の濃度測定を行った。試料は最初のカラムで NO_2^- と NO_3^- に分離された。二つ目のカラムは還元カラムであり、 NO_3^- を NO_2^- に変化させた。その後試料中に存在するそれぞれの NO_2^- をグリース反応により発色し、540 nm の吸光度計で測定した。灌流開始 3 時間で、サイトカインの脳実質への投与を行った。サイトカインは、TNF α 、IL-1 β 、そして IFN γ を個別あるいは組み合わせたものを、2 μl の 0.1% 牛血清アルブミンを含む滅菌生理的食塩水に溶解し、注入用微少ポンプを動力として、0.2 $\mu\text{l}/\text{分}$ の速度で投与した。

1. ラット PVN における NO 代謝産物の経時的計測

1) 手術方法

61 匹のラット腹腔内にペントバルビタール (50 mg/kg) を投与し、十分な麻酔深度を確認した。頭部を脳定位固定装置に固定し頭蓋を露出、大泉門より後方 1.7 mm, 左 2.6 mm の位置にドリルを用いて穿孔した。マイクロダイアリシス・プローブ (以下プローブと略す) を挿入するためのガイドシャフト (MI-AG-8, 外径 0.7 mm, エイコム京都) を垂直軸より 15 度外側へ傾斜させ、骨表面より深さ 6.9 mm まで挿入、固定した¹⁸⁾。術後は個別のケージにて 6 日間飼育し、手術前の体重を維持していることを指標として回復を確認した。

2) マイクロダイアリシス法による NO 代謝産物の測定

回復確認後、エーテル吸入麻酔下にてプローブを挿入した。プローブは炎症性サイトカイン投与のための側管が付いたもの (MI-A-I-8-02, エイコム) を用いた。プローブ挿入から 24 時間後、脱気したハンス液 (137 mM NaCl, 5.4 mM KCl, 1.3 mM CaCl₂, 0.8 mM MgSO₄, 0.338 mM Na₂HPO₄, 0.4 mM KH₂PO₄, 5.6 mM glucose 4.2 mM NaHCO₃, pH7.4) をプローブ内灌流に用いた。あらかじめ灌流液からは NO₂⁻ と NO₃⁻ が検出されないことを確認した。灌流は 1 μl/分で行い、灌流液は 20 分毎に自動回収した。試料は NO detect-or-HPLC system (ENO-10, エイコム) により NO₂⁻ と NO₃⁻ の濃度測定を行った。試料を最初のカラムで NO₂⁻ と NO₃⁻ に分離し、二番目のカドミウムを利用した還元カラムで NO₃⁻ を NO₂⁻ に変化させた。その後、試料中に存在するそれぞれの NO₂⁻ をグリース反応によって紫に発色させ 540 nm の吸光度計で測定した。吸光度は接続したコンピューターを用いて記録・解析した (Power Chrom, AD Instruments, Castle Hill, Australia) (第 1 図)。

検量線は亜硝酸ナトリウム溶液と硝酸ナトリウム溶液を用いて求めた。さまざまな濃度の亜硝酸ナトリウム溶液と硝酸ナトリウム溶液にプローブを浸し、上記システムにてプローブの透析回収率を算出した結果、NO₂⁻ は 47±2%, NO₃⁻ は 50±2% という回収率を得た (n=10)。

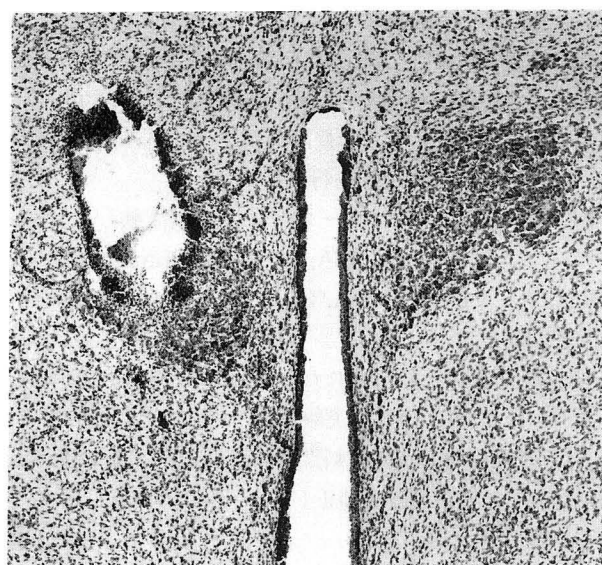
3) サイトカインの投与

PVN への灌流開始から 3 時間後、NO₂⁻ と NO₃⁻ の値が連続 3 回の計測でほぼ一定であることを確認した後、サイトカインを PVN へ投与した。サイトカインは単独、あるいは混合したものを 2 μl の 0.1% 牛血清アルブミンを含む滅菌生理的食塩水に溶解した。それぞれのサイトカイン溶液はプローブの側管から 0.2 μl/分の速度で注入した。本実験の前に、ラット PVN に対する炎症性サ

イトカインの投与量を決定するために、各群 3 匹ずつサイトカイン単独投与の予備実験を行った。TNFα については 0.2 ng, 2 ng, 10 ng, の三段階の濃度にて単独投与を行い、投与後 8 時間 NO_x⁻ 値を計測した。IFNγ については 0.2 ng, 2 ng の二段階の濃度を、また、IL-1β については 0.2 ng, 2 ng, 10 ng の三段階の濃度を投与した。予備実験の結果から、TNFα 10 ng, IFNγ 2 ng, IL-1β 2 ng を本実験の濃度として用いた。

NO₂⁻ と NO₃⁻ が NOS によって産生されることを確認する目的で、NOS 阻害剤であるアミノグアニジンをサイトカイン投与 3 時間後に腹腔内投与した。アミノグアニジンは 30 mg/kg を 0.5 ml の生理的食塩水に溶解し、対照群には同量の生理的食塩水を用いた。

さらにプローブの挿入位置を確認するため組織学的検索を行った。ラットに高容量のペントバルビタールで深麻酔し、経心臓的に 10% のホルマリン液を用いて脳を灌流固定した。脳を摘出し、30% 蔗糖を含む 3.7% ホルムアルデヒド溶液で後固定した後、厚さ 50 μm にて前額断連続切片を作製しクレシルバイオレットを用いてニッスル染色を行った (第 2 図)。6 匹のラットでは、プローブの先端の位置が PVN の外隔から 300 μm 以上離れていたため、実験結果から除外した。



第 2 図 マイクロダイアリシス終了後のラット脳冠状断標本。実験終了後にプローブの位置の確認を行った。経心臓的に 3.7% のホルムアルデヒドにて脳を灌流固定した。前額断で厚さ 50 μm に薄切し、ニッスル染色を行った。中央に第三脳室と両側の PVN があり、左側 PVN にプローブ先端の痕が確認された (倍率 40 倍)。6 匹のラットではプローブの先端から PVN までの距離が 300 μm 以上離れていたため、実験結果から除外した。

2. 半定量 RT-PCR を用いた iNOS mRNA の検出

ラット 3 匹の PVN に混合サイトカインを注入し、半定量 RT-PCR を用いて iNOS mRNA の変化を調べた。混合サイトカイン (TNF α ; 10 ng, IL-1 β ; 2 ng, IFN γ ; 2 ng) は、前述実験と同様にプローブ側管を介してラットに投与した。投与 6 時間後に断頭し脳を摘出、実験まで -80°C で保存した。対照群 3 匹には 0.1% 牛血清アルブミンを含む生理的食塩水を投与した。

脳はクライオスタットにて前額断連続 50 μ m に薄切した。室傍核近傍にプローブ挿入痕が存在するのを確認し、それを中心に直径 2 mm のステンレスチューブで円型に打ち抜いた。連続切片 10 枚から組織を採取し、TRIzol (Life Technologies, Rockville, MD, USA) を用いて total RNA を抽出した。total RNA 量は吸光度計にて計測し、その溶液が 1 μ g/ μ l になるよう調整した。RT-PCR 反応は Takara RNA PCR kit (タカラバイオ株式会社, 京都) を用いた。逆転写反応は、30°C 10 分、55°C 30 分、そして 99°C で 5 分間加温した。iNOS 固有のプライマー (forward, 5'-ACAACGTGGAGAAAACCCAGGTG-3', reverse, 5'-ACAGCTCCGGGCATCGAAGACC-3'), 内部コントロールのグリセルアルデヒド 3 リン酸脱水素酵素 (Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, 以下 GAPDH と略す) のプライマー (forward, 5'-CACGGCAAGTTCAATGGCACA-3'; reverse, 5'-GAATTGTG-AGGGAGAGTGCTC-3') を加えて、96°C 30 秒の変性反応、65°C 60 秒のアニーリング反応、72°C 90 秒の伸長反応を 1 サイクルとし、計 25 サイクルの PCR 反応を行った¹⁹⁾。

PCR 産物は 2% アガロースゲルで電気泳動し、エチジウムブロマイドにて染色、Molecular Imager FX® (BIO-RAD, Hercules, CA, USA) にて各バンドの発現強度を測定した。

なお吸光度計で算出された total RNA 量には誤差が生じやすいため、半定量実験を行う際には、GAPDH のバンドの出現強度が各試料間で同一になるように total RNA 溶液の希釈濃度を補正した。

3. 免疫組織化学による iNOS 蛋白質の同定

5 匹のラットに 3 種混合サイトカインを、4 匹の対照群には 0.1% 牛血清アルブミンを含む生理的食塩水を前述と同様の方法で投与した。投与から 8 時間後、ペントバルビタール深麻酔を施し、心臓より 0.1 M phosphate buffer saline (以下 PBS と略す) および 4% paraformaldehyde/0.1 M PBS を灌流した。脳を摘出し、同液にて 4°C で 24 時間後固定し、30% ショ糖/0.1

M PBS に置換した後、クライオスタットを用いて厚さ 20 μ m の連続切片を作製した。

切片は 0.05 M PBS にて洗浄後、0.3% H₂O₂ を含むメタノールにて内因性ペルオキシダーゼを不活化させた。バックグラウンドを除去するため 1.5% ヤギ血清、1% ウシ血清アルブミンを含む PBS で処理をした。一次抗体に抗 iNOS 抗体 (希釈倍率 2000 倍) を室温で一晩反応させた。二次抗体以降は、Vectastain ABC kit (Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA, USA) 付属の HRP 標識ヤギ抗ウサギ抗体を用い、反応時間は 30 分とした。0.05 M PBS で 3 回の洗浄後、0.3% H₂O₂ を含む 3,3-diaminobenzidine tetrahydrochloride (以下 DAB と略す) と 7 分間反応させ、褐色に発色させた。観察は光学顕微鏡を用いて行い、PVN を含む連続する 2 枚の切片における DAB 発色細胞を計算した。PVN を含むことは、免疫組織化学染色を施行した前後の切片にニッスル染色で PVN が存在することにより確認した。

4. 統計

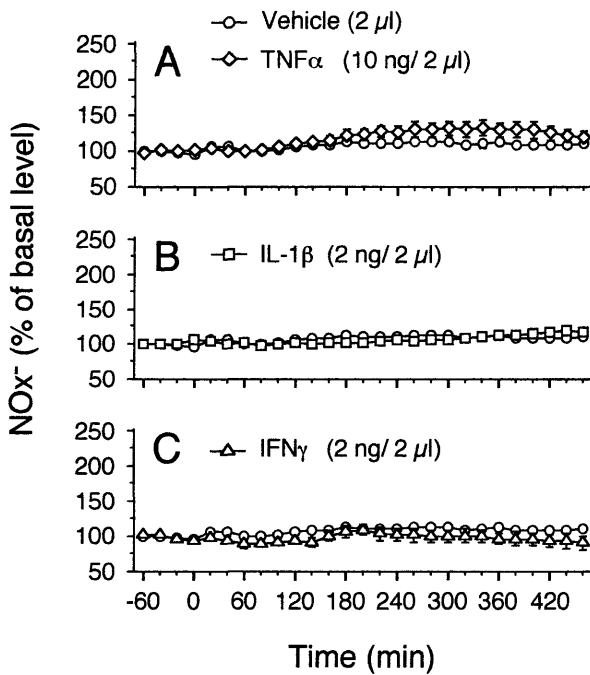
結果は平均値 $\pm$ 標準誤差として示した。統計学的有意差はマイクロダイアリス実験の測定値については repeated ANOVA を用いて行った。半定量 RT-PCR 実験と免疫組織化学実験の結果は、Student's t-test を用いて統計処理を行った。両検定とも 5% を有意差水準とした。

結 果

1. 炎症性サイトカインの投与によるラット PVN での NO 代謝産物の変化

マイクロダイアリス法を用いて得られた灌流液中の NO₂⁻ と NO₃⁻ の和を NO 代謝産物として NO_x⁻ と定義した。NO₂⁻ と NO₃⁻ の基礎値は、サイトカイン投与直前に回収した 3 回の灌流液試料中のそれぞれの値を平均して求めた。NO₂⁻ と NO₃⁻ の基礎値は、それぞれ 8.0 $\pm$ 0.6 と 44.1 $\pm$ 1.5 pmol/20 μ l, NO_x⁻ の基礎値は 52.2 $\pm$ 1.9 pmol/20 μ l だった (n=40)。計測された NO₂⁻ と NO₃⁻ の基礎値の比は、18.0 $\pm$ 1.1% だった。

まず初めに 3 種類の炎症性サイトカイン投与量の決めるための予備実験を行った。TNF α は 0.2 ng, 2 ng, 10 ng, の 3 段階の濃度にて投与を行ったが、すべての濃度において計測 8 時間では、炎症性サイトカインを含まない対象群と比較して NO_x⁻ 値の変化は認められなかった。また IFN γ は 0.2 ng と 2 ng の 2 種類の濃度で投与を行ったが、変化は認められなかった。ゆえに、



第3図 炎症性サイトカイン単独投与刺激でのラット PVN における NO 代謝産物の変化。TNF α 10 ng (A), IL-1 β 2 ng (B), IFN γ 2 ng (C) を PVN へ投与した。対照群には、同量の 0.1% BSA 入りの生理的食塩水を投与した。マイクロダイアリス法にて、PVN での NO $_2^-$ と NO $_3^-$ を 20 分おきに計測し、その和を NO $_x^-$ と定義した。サイトカイン投与前の基礎値は、52.2 $\pm$ 1.9 pmol (n=40) であり、その値からの変化率をグラフに示した。TNF α , IL-1 β , IFN γ すべての単独投与群において、NO $_x^-$ 値は 480 分間有意な変化を示さなかった。(Wakita T et al : Brain Res 905 : 12-20, 2001 の第 1 図を、許可を得て転載。)

TNF α , IFN γ とともに高い濃度を本実験の投与量とした。IL-1 β についても 0.2 ng, 2 ng, 10 ng の 3 種類の濃度で検討したところ、IL-1 β 10 ng の投与により NO $_x^-$ 値の上昇を僅かに観察した。そこで NO $_x^-$ 値を上昇させなかった 2 ng を IL-1 β 濃度とし本実験を行った。

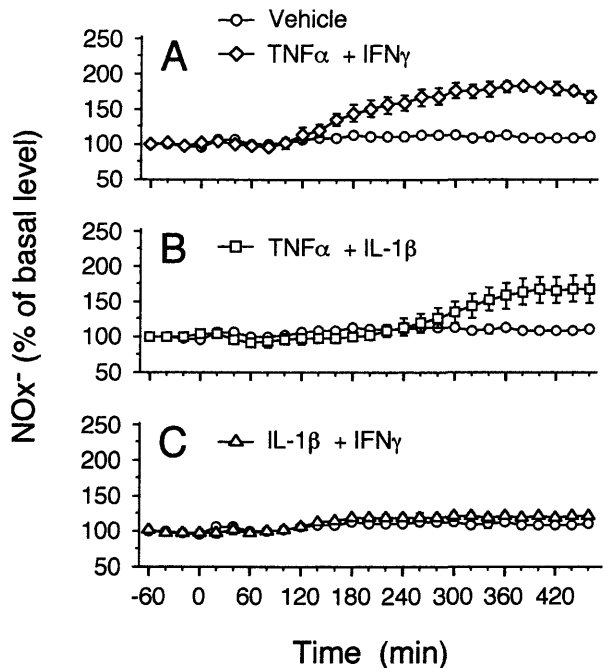
これらの濃度を用いて、TNF α , IL-1 β , IFN γ の単独投与を行い PVN における NO $_x^-$ 値の変化を投与後連続 8 時間測定したが、対照群と比較していずれの群においても NO $_x^-$ 値の有意な変化は認められなかった (第 3 図)。

次に 2 種類の炎症性サイトカインを組み合わせ投与した。TNF α 10 ng と IFN γ 2 ng を混合した場合、PVN の灌流液中の NO $_x^-$ 値は投与後 160 分より漸増し始め、380 分後に最大値をとり、対照群の 1.8 倍となった (第 4 図 A)。また TNF α 10 ng と IL-1 β 2 ng を混合したところ、NO $_x^-$ 値は投与後 300 分より漸増し、

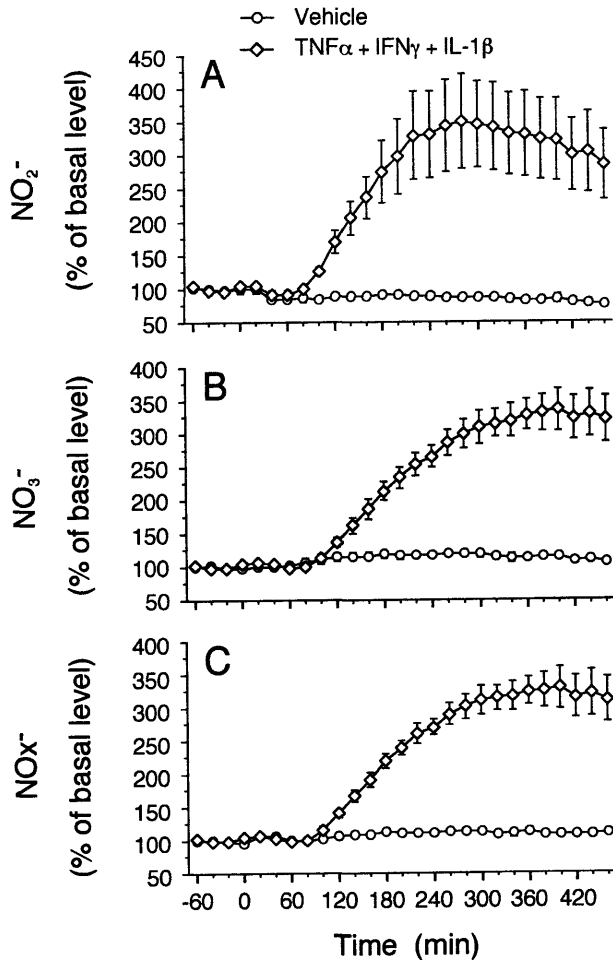
440 分後に最大値をとり、対照群の 1.7 倍となった (第 4 図 B)。すなわち、TNF α と IFN γ , TNF α と IL-1 β の間には相乗効果が観察された。それに対し、IL-1 β 2 ng と IFN γ 2 ng の PVN へ投与では単独投与と同様に NO $_x^-$ 値の変化が認められなかった (第 4 図 C)。

3 種の炎症性サイトカイン (TNF α 10 ng, IL-1 β 2 ng, IFN γ 2 ng) を混合して PVN へ投与した場合の灌流液中の NO $_2^-$, NO $_3^-$, および NO $_x^-$ 値の変化を第 5 図に示した。NO $_2^-$, NO $_3^-$ は対照群と比較してそれぞれ 120 分後、140 分後より漸増した。また、NO $_x^-$ 値も投与後 120 分より有意な漸増が認められ、400 分後で最大となり、その値は対照群の 3.3 倍であった。

そこで、3 種混合投与と 2 種混合投与の NO $_x^-$ 値を統計的に比較したところ、3 種混合群と TNF α +IFN γ 混合群との間では、投与後 120 分より実験終了の 460 分まで有意に高く (第 4 図 A と第 5 図 C)、また、TNF α +IL-1 β 混合群、IL-1 β +IFN γ 混合群との間においても、



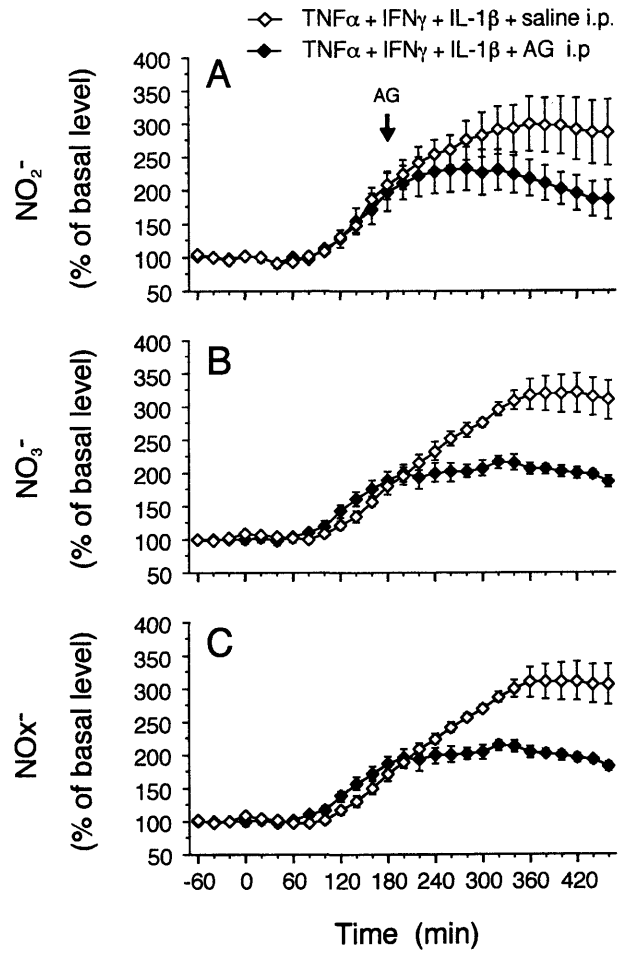
第4図 炎症性サイトカイン 2 種混合投与刺激でのラット PVN における NO $_x^-$ 値の変化。TNF α 10 ng と IFN α 2 ng の混合投与においては、投与後 120 分までは対照群と比較し NO $_x^-$ 値の変化は認められないが、140 分より有意な漸増を示し、380 分後に最大値である投与前基礎値の 1.8 倍となった。(A)、TNF α 10 ng と IL-1 β 2 ng の混合投与においては、投与後 300 分より NO $_x^-$ 値の有意な漸増が認められ、440 分で投与前基礎値の 1.7 倍となった (B)。IL-1 β 2 ng と IFN γ 2 ng の混合投与は、480 分の観察中に対照群との有意な差は認められなかった (p<0.05)。(Wakita T et al : Brain Res 905 : 12-20, 2001 の第 2 図を、許可を得て転載。)



第5図 炎症性サイトカイン3種混合投与刺激でのラットPVNにおけるNO代謝産物(NO_2^- 値(A), NO_3^- 値(B) and NO_x^- 値(C))の変化. $\text{TNF}\alpha$ 2 ng, $\text{IL-1}\beta$ 2 ng と $\text{IFN}\gamma$ 2 ng をラットPVNに混合投与した. NO_2^- 値と NO_3^- 値はそれぞれサイトカイン投与後100分と140分から対照群と比較して有意な増加を示した. NO_x^- 値は投与後120分から有意な漸増をはじめ、400分後に投与前基礎値の3.3倍となった ($p < 0.05$). (Wakita T et al: Brain Res 905: 12-20, 2001の第3図を、許可を得て転載.)

NO_x^- 値は120分後から実験終了まで有意な差がみられた。(第4図B, Cと第5図C)

これらの結果における NO_2^- と NO_3^- , および NO_x^- 値の上昇が, NOS の作用であることを検討するため, 3種混合サイトカイン投与3時間後にアミノグアニジン 30 mg/kg を腹腔内投与した. 生理的食塩水を腹腔内注射した対照群と比較したところ, NO_2^- , NO_3^- はそれぞれ, アミノグアニジン投与から120分後(サイトカイン投与より300分後)と60分後(サイトカイン投与より240分後)より実験終了まで有意な低下が観察された(第6図A, B). NO_x^- 値はアミノグアニジン投与か

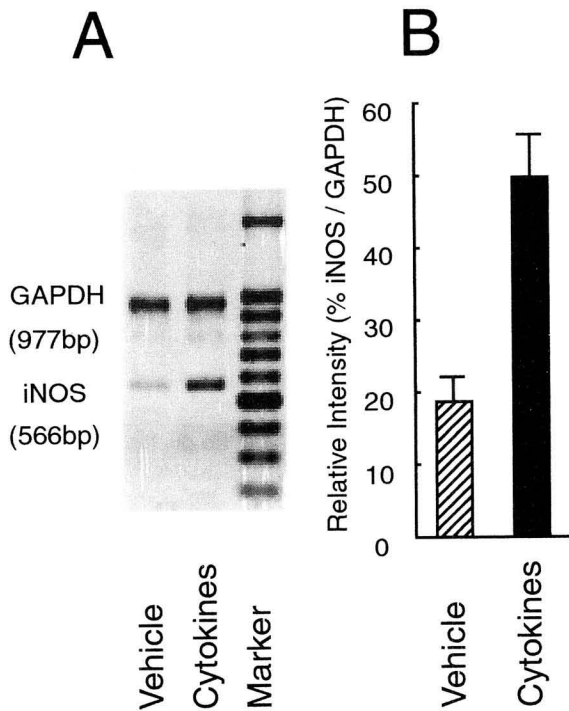


第6図 サイトカイン刺激後のNO代謝産物へのアミノグアニジンの効果. 混合した炎症性サイトカイン($\text{TNF}\alpha$ 10 ng, $\text{IL-1}\beta$ 2 ng, $\text{IFN}\gamma$ 2 ng)をラットPVNに投与し, 3時間後にアミノグアニジン溶液(30 mg/kg)の腹腔内投与を行った. 対照群には同量の生理的食塩水を投与した. NO_2^- 値は, 対照群と比較して有意な効果が認められなかったが(A),と NO_3^- 値と NO_x^- 値はAG投与後80分より効果が認められ, 460分まで効果は持続した ($p < 0.05$). (Wakita T et al: Brain Res 905: 12-20, 2001の第4図を、許可を得て転載.)

ら80分後(サイトカイン投与より260分後)より実験終了まで有意な低下が観察された(第6図C). アミノグアニジンを投与した際にも2.1倍の NO_x^- 値上昇が認められたが, 対照群の3.0倍(サイトカイン投与340分後)に比べ有意に抑制された.

2. PVNにおける炎症性サイトカイン投与後のiNOS mRNA発現

3種の炎症性サイトカイン($\text{TNF}\alpha$ 10 ng, $\text{IL-1}\beta$ 2 ng, $\text{IFN}\gamma$ 2 ng)を投与し, PVNにおけるiNOS mRNAの発現をRT-PCRを用いて検討した. iNOS mRNAと



第7図 半定量的 RT-PCR を用いたラット PVN における iNOS mRNA の発現。混合した炎症性サイトカイン (TNF α 10 ng, IL-1 β 2 ng, IFN γ 2 ng) をラット PVN に投与し、6 時間後に脳を摘出した。PVN をパンチアウトし、mRNA を抽出し RT-PCR を行った。(A) iNOS mRNA と GAPDH mRNA のバンドはそれぞれ 566 bp と 970 bp に認められた。サイトカイン投与群における iNOS mRNA は対照群のそれと比較し増加を示した。マーカーは、100 bp-DNA ladder marker である。(B) GAPDH mRNA のバンドを標準として用いて iNOS mRNA の半定量化を行った。サイトカイン投与群 (n=3) においては、iNOS mRNA/GAPDH mRNA の値は、 $49.7 \pm 5.7\%$ であり対照群 (n=3) の $18.7 \pm 3.4\%$ に対して有意な上昇が認められた ($p < 0.05$)。(Wakita T et al : Brain Res 905 : 12-20, 2001 の第 5 図を、許可を得て転載。)

GAPDH mRNA の RT-PCR 産物は、アガロースゲル上でそれぞれ予測された 566 bp と 970 bp のバンドに分離された。iNOS mRNA のバンドは対照群においても認められたが、サイトカイン投与群における iNOS mRNA の発現は対照群より強く認められた (第 7 図 A)。

GAPDH mRNA との比によって iNOS mRNA の発現量を標準化すると、iNOS/GAPDH bands 比はサイトカイン投与群 (n=3) で $49.7 \pm 5.7\%$ 、対照群 (n=3) で $18.7 \pm 3.4\%$ となり、両群間の発現量には有意差が認められた ($t=4.530$, $df=4$, $p < 0.05$) (第 7 図 B)。

3. PVN における iNOS 蛋白質の免疫組織化学的検索

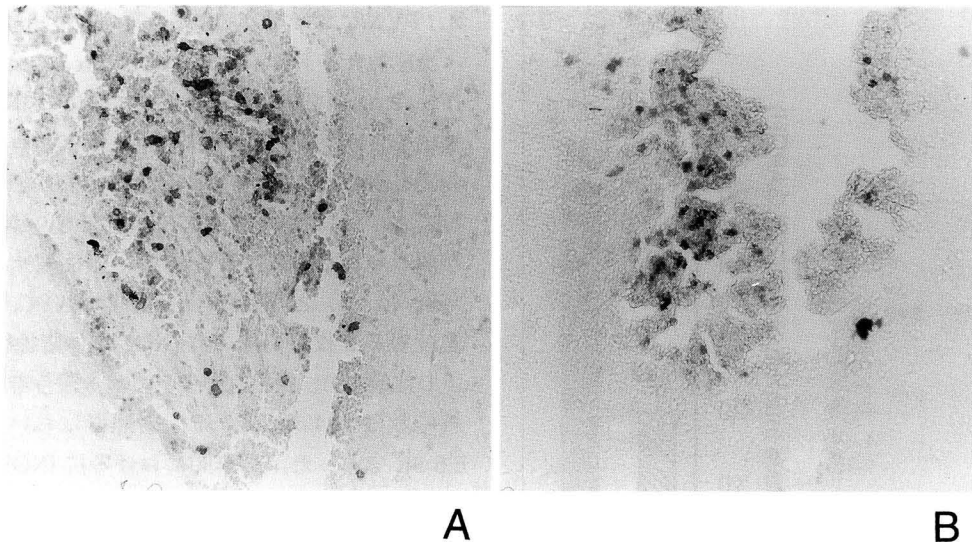
炎症性サイトカイン 3 種 (TNF α 10 ng, IL-1 β 2 ng, IFN γ 2 ng) を投与後の PVN における iNOS の蛋白質の検出を、免疫組織化学法にて行った。プローブ挿入部の先端を中心に抗 iNOS 抗体陽性の細胞が認められた (第 8 図 A)。しかし、対照群においても、iNOS 陽性細胞が認められたため (第 8 図 B)、炎症性サイトカイン投与群 (n=5) と対照群 (n=4) において、PVN を含む連続する 2 枚の切片の抗 iNOS 抗体陽性細胞をカウントし比較した。炎症性サイトカイン投与群における陽性細胞数は $184.6 \pm 28.7SE$ 、対照群においては $166.5 \pm 6.5 SE$ であった。両群間における抗 iNOS 陽性細胞数に有意な差は認められなかった。 ($t=0.547$, $p=0.601$)

考 察

NO は微量でも組織内において生理学的作用を持ち、かつ拡散性と短い半減期を持つため、局所的かつ経時的に産生量を計測する必要がある。本研究ではマイクロダイアリシス法とグリース反応を組み合わせ NO 代謝産物を測定する方法を確立し実験を行った。Ishizuka らは非麻酔下のラット PVN における NO $_2^-$ 、NO $_3^-$ イオンを本研究と同様の方法で計測し報告しているが、速度 1 μ l/分で灌流し回収は 10 分おきに回収した結果、基礎値は NO $_2^-$ は 3.6 ± 1.0 pmol, NO $_3^-$ は 27.8 ± 4.6 pmol であった²⁰⁾。いずれも本研究の結果とほぼ相違ないものであった。

本研究では複数の炎症性サイトカイン (TNF α 10 ng と IFN γ 2 ng, TNF α 10 ng と IL-1 β 2 ng あるいは 3 種混合) を PVN に投与した場合、同部位での NO 代謝物産生の亢進がみられた。NO $_2^-$ 、NO $_3^-$ とともに、2 時間の無反応期の後、緩やかな上昇が 6 時間に渡り持続的に認められた。Shintani らは NMDA receptor の刺激によって cNOS が活性化された結果、NO の代謝産物が刺激後 5 分以内で一過性に増加することを報告している²¹⁾。したがって、サイトカイン投与から NO $_x^-$ 値が上昇を始めるまでに 2 時間程度の時間を要しているのは、構成型 NOS が活性化されたのではなく、iNOS 蛋白質が合成された結果であるという仮説を想定した。

また、TNF α と IFN γ を PVN へ単独投与した場合、NO $_x^-$ 値の変化は認められなかったが、混合投与することにより NO $_x^-$ 値は上昇した。この理由として、TNF α と IFN γ の iNOS のプロモーターの共刺激によるものと想定もできる。iNOS の DNA 配列のプロモーター領域には IFN γ activation site (GAS), IFN γ -response ele-



第8図 抗 iNOS 抗体によるラット PVN の免疫組織学的染色標本. 混合した炎症性サイトカインを PVN に投与し 8 時間後に灌流固定した. PVN 近傍にて冠状断 20 μ m の連続切片を作製した. 一次抗体としてラット抗 iNOS 抗体を使用し, ABC 法を用いて DAB にて発色した. 抗 iNOS 抗体陽性細胞はマイクロダイアリシスプローブ挿入部近傍に出現した (A). 対照として 0.1%牛血清アルブミンを含む生理的食塩水を投与した群 (B) と比較検討したところ, 陽性細胞数に有意な差は認められなかった (サイトカイン投与群 $n=5$, 対照群 $n=4$). (倍率 100 倍) (Wakita T et al : Brain Res 905 : 12-20, 2001 の第 6 図を, 許可を得て転載.)

ment (γ -IRE), nuclear factor κ B (NF κ B) binding site, AP-1 binding site や TNF response element が存在する. なかでも, NF κ B binding site は, iNOS 遺伝子発現に深く関与すると考えられており, γ -IRE 領域を共刺激することによってその発現は強調される²²⁾. TNF α は TNF α receptor-associated factor 2 (TRAF2) を介して, NF κ B と AP-1 を活性化させ²³⁾, IFN γ は γ -IRE の活性を上昇させることから, 協調的に iNOS の発現に関与していると思われる. また IL-1 β も TNF α receptor-associated factor-6 (TRAF6) を介して NF κ B を活性化する²⁴⁾ため, IL-1 β と IFN γ の混合投与では有意な NO 産生は認められないものの, 3 者同時投与によってその効果が相乗的に増強されている. 以上のことから, 本実験における NO 代謝産物の産生増加は, 炎症性サイトカインによる iNOS の活性上昇の結果であると考え, これを実験的に証明するため本研究では, (1) サイトカインによる NO $_x$ 値の産生が iNOS 選択的阻害剤で抑制, (2) サイトカイン刺激による PVN での iNOS mRNA 増加の有無 (3) サイトカイン刺激による PVN での iNOS 蛋白質合成を調べた.

最初に, NO $_x$ 値を計測しながら, iNOS の選択的阻害薬であるアミノグアニジン投与したところ, NO $_x$ 値の上昇は有意に抑制された. LPS でラットの海馬を刺激し NO $_x$ 値を計測すると, NO $_x$ 値は基礎値の 7 倍の

上昇を示した. アミノグアニジン 100 mg/kg (高濃度) の投与により NO $_x$ 値の上昇が完全に抑制可能であるため, アミノグアニジン投与量を増量することで NO $_x$ 値の上昇を完全に抑制できると報告されている²⁵⁾. アミノグアニジンは iNOS の選択的抑制剤であるが, 高濃度を用いた場合には特異性を失い cNOS の作用も抑制する. つまり, iNOS に対する IC₅₀ は cNOS の 1/20 であるが²⁶⁾, 高濃度の場合には cNOS への作用は無視できない. 本研究では完全な阻害作用は示さず NO $_x$ 値の上昇が認められた. 低濃度のアミノグアニジンを用いたため iNOS に対して選択的な作用を得たと考えているが, アミノグアニジン投与後の上昇について cNOS の影響を否定できず, 今後の検討を要する.

次に, 炎症性サイトカインを PVN に投与した時, iNOS mRNA の転写が促進されるか否かを半定量 RT-PCR を用いて解析した. iNOS mRNA は, 炎症性サイトカインを投与した PVN で発現量が増加することから, 炎症性サイトカイン投与時に認められた NO 代謝産物の増加は iNOS の活性化によるものであると考えられる. しかし, iNOS mRNA の発現は炎症性サイトカインを投与していない対照群においてもわずかに認められた. 我々は予備実験として, 手術操作を加えていないラットの PVN の iNOS mRNA を同様に半定量 RT-PCR にて検索したが検出されなかった. ラットの脳に外傷を加え

ると iNOS mRNA の発現増加がみられることから⁷⁾, ガイドの挿入, プローブの挿入, 対照液の注入などの実験操作による脳の外傷が原因で, 炎症性サイトカインを投与しなかった群においても, iNOS mRNA の発現が認められたと考えられる。

第三に PVN における iNOS 蛋白の発現を, 抗 iNOS 抗体を用いて免疫組織学的に検討した。PVN に挿入したプローブの先端周囲に抗 iNOS 抗体陽性細胞が多く認められ, iNOS が投与部位に局在することが分かった。しかし, 対照群においても抗 iNOS 抗体陽性細胞が認められ, 抗 iNOS 抗体陽性細胞数において炎症性サイトカイン投与群と対照群の間で統計学的有意差を認めなかった。この理由として以下の二つが考えられる。本実験ではマイクロダイアリス法を用いて炎症性サイトカインの PVN への投与により NO 代謝産物の増加が観察された。この結果は個体における経時的变化であり, 基礎値をもとに増加した変化率を上昇としてグラフに示したものである。一方, 個体間を比較する免疫組織化学法は個体間の分散が大きい経時的变化を測定するにはあまり鋭敏ではないと考えられた。また, たとえ抗 iNOS 抗体陽性細胞数は同等であっても, 個々の細胞中で iNOS 活性には差がある可能性があるため蛋白レベルでの差を検出することは困難であった。

一方, 蛋白レベルでの iNOS の発現量の差に比して NO_x^- 値がサイトカイン投与群で有意に高値を示した可能性として, 炎症性サイトカインと LPS の投与によって, NOS の補酵素である H₄B の細胞内濃度が上昇し, その結果として NOS を介した NO 代謝産物産生が上昇するという報告を考慮する必要がある^{27, 28)}。この報告を元に本実験を解釈するなら, 混合した炎症性サイトカインは H₄B 量の上昇を介して NO_x^- 値の産生増加をおこした可能性があり, サイトカイン投与をした PVN の抗 iNOS 抗体陽性細胞数の増加がコントロール群と比較して認められなかったことと合致する。本実験結果では, iNOS 蛋白質量の上昇を完全には証明できず, さらに nNOS や eNOS の活性上昇を完全に否定することは困難であった。H₄B の動態も含めた今後の検討が必要であると思われた。

前述したようにラット腹腔内に LPS を投与すると PVN に iNOS 遺伝子が発現する¹⁶⁾。我々も予備実験として, 0.1 mg/kg の LPS を腹腔内投与後 PVN における NO 代謝産物の測定を行ったが, NO_x^- 値は 7 時間後に基礎値の 3 倍となった。LPS は脳血管関門 (blood-brain barrier) の透過性に影響し, LPS が直接 PVN に作用するという可能性も考えられるものの²⁹⁾, LPS

を腹腔内に投与することにより PVN において IL-1 β や TNF α が増加することが知られており¹⁵⁾, 今回の実験データを考え合わせると, LPS は視床下部で炎症性サイトカインの産生を促し, NO 産生に寄与しているとも考えられる。また同様に, 脳外傷の受傷部位における iNOS の活性の上昇^{7, 30)}は, 炎症性サイトカインの産生を介した反応の結果である事が考えられる。しかし, Holmin らは外傷により IL-1 β と TNF α は発現するが, IFN γ mRNA の発現が認められないと報告している³¹⁾。我々のデータでは IL-1 β と TNF α 混合投与により NO_x^- 値は上昇し, さらに IFN γ を同時投与することにより相乗的に NO_x^- 値を高めることから, IFN γ が炎症性サイトカインとして脳内で何らかの役割を担っている可能性が示唆された。ラットの培養アストロサイトは TNF α の投与により IFN γ 蛋白を産生することが知られており³²⁾, ラット PVN における IFN γ 受容体蛋白合成も確認されている³³⁾。一方で, リンパ球由来の IFN γ と質量に違いがある神経由来の IFN γ ³⁴⁾が存在し, ラット視床下部ニューロンで生物学的活性^{35, 36)}が確認されている。今後どのような条件で IFN γ が産生されるのを検討していく必要がある。

また本研究において PVN における iNOS 発現細胞の同定はなされていない。既報告³⁷⁾よりミクログリアの関与の可能性が考えられるが, 中枢神経における NO の作用という視点からも今後の研究で解明していきたいと考えている。

本実験において, ラット PVN における NO 代謝産物の増加は複数の炎症性サイトカインの相乗効果であった。このことから中枢神経系の炎症疾患における NO を介した細胞障害反応には複数の炎症性サイトカインが相乗効果を持って関与している可能性が高いと考えられた。中枢神経疾患に対する抗サイトカイン作用を持つ薬剤の開発が期待されているが, その時にも複数のサイトカインが協調的に働いている事に留意が必要であろう。

総 括

PVN における NO 産生への炎症性サイトカインの関与を調べるため, 無麻酔行動下ラットにマイクロダイアリス法を用いて NO 代謝産物を測定する実験系を確立し, 炎症性サイトカインを投与した後の変化を計測した。炎症性サイトカインとして TNF α 10 ng, IL-1 β 2 ng と IFN γ 2 ng を用いたが, それぞれを単独で PVN へ投与しても計測 8 時間まで NO_x^- 値に変化は認められなかった。しかし, 2 種類のサイトカインを同時に投与

したところ, $\text{TNF}\alpha$ 10 ng と $\text{IFN}\gamma$ 2 ng の組み合わせでは, NO_x^- 値は 140 分後から上昇が始まり, 380 分で開始時の値の 1.8 倍に達した. また, $\text{TNF}\alpha$ 10 ng と $\text{IL}-1\beta$ 2 ng の組み合わせでは, NO_x^- 値は, 投与後 340 分から上昇が認められ, 440 分には開始時の値の 1.7 倍に到達した. それに対し, $\text{IL}-1\beta$ 2 ng と $\text{IFN}\gamma$ 2 ng は NO_x^- 値に変化を与えなかった. しかし, 3 種類のサイトカインを混合投与した場合, NO_x^- 値は 120 分後から上昇が認められ, 400 分後には 3.3 倍に達した. 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 NO_x^- 値は有意に抑制された. 混合サイトカイン投与群では, iNOS の mRNA が対照群と比較し有意に多く発現していることが確認された. また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 iNOS 陽性細胞の存在が確認できた. 以上の結果より, 炎症性サイトカインの混合投与により, PVN において iNOS を介して NO が産生されることが示唆された.

本稿を終えるにあたり, 懇切なご指導とご校閲を賜りました慶應義塾大学医学部産婦人科学教室野澤志朗教授に深甚なる謝意を捧げます. また, 本研究に際して直接御指導いただきました慶應義塾大学医学部精神神経科学教室新谷太助手と, 実験の機会を与えてくださいました前慶應義塾大学医学部精神神経科学教室浅井昌弘教授に深く感謝いたします. さらに, 多大なるご助言を頂きました慶應義塾大学医学部産婦人科学教室の杉原一廣先生, 日本医科大学生理学教室佐久間康夫教授, 近藤保彦助手, ならびに教員諸先生方に感謝いたします.

本研究の一部は第 77 回日本生理学学会 (2000 年, 横浜) で発表した. 本研究の一部は 1999 年度慶應義塾大学医学部研究奨励費による.

文 献

- 1) Furchgott RF, Zawadzki JV : The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 288 : 373-376, 1980
- 2) Palmer RM, Ferrige AG, Moncada S : Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* 327 : 524-526, 1987
- 3) Dawson TM, Snyder SH : Gases as biological messengers : nitric oxide and carbon monoxide in the brain. *J Neurosci* 14 : 5147-5159, 1994
- 4) O'Dell TJ, Hawkins RD, Kandel ER, Arancio O : Tests of the roles of two diffusible substances in long-term potentiation : evidence for nitric oxide as a pos-

- sible early retrograde messenger. *Proc Natl Acad Sci USA* 88 : 11285-11289, 1991
- 5) Daniel H, Hemart N, Jaillard D, Crepel F : Long-term depression requires nitric oxide and guanosine 3' : 5' cyclic monophosphate production in rat cerebellar Purkinje cells. *Eur J Neurosci* 8 : 1079-1082, 1993
- 6) Yermilov V, Rubio J, Ohshima H : Formation of 8-nitroguanine in DNA treated with peroxynitrite *in vitro* and its rapid removal from DNA by depurination. *FEBS Lett* 376 : 207-210, 1995
- 7) Sinz EH, Kochanek PM, Dixon CE, Clark RS, Carcillo JA, Schiding JK, Chen M, Wisniewski SR, Carlos TM, Williams D, DeKosky ST, Watkins SC, Marion DW, Billiar TR : Inducible nitric oxide synthase is an endogenous neuroprotectant after traumatic brain injury in rats and mice. *J Clin Invest* 104 : 647-656, 1999
- 8) Dorheim MA, Tracey WR, Pollock JS, Grammas P : Nitric oxide synthase activity is elevated in brain microvessels in Alzheimer's disease. *Biochem Biophys Res Commun* 205 : 659-665, 1994
- 9) Bukrinsky MI, Nottet HS, Schmidtayerova H, Dubrovsky L, Flanagan CR, Mullins ME, Lipton SA, Gendelman HE : Regulation of nitric oxide synthase activity in human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1)-infected monocytes : implications for HIV-associated neurological disease. *J Exp Med* 181 : 735-745, 1995
- 10) Simmons ML, Murphy S : Cytokines regulate L-arginine-dependent cyclic GMP production in rat glial cells. *Eur J Neurosci* 5 : 825-831, 1993
- 11) Woodroffe MN : Cytokine production in the central nervous system. *Neurology* 45 : S6-10, 1995
- 12) Rothwell NJ, Luheshi G, Toulmond S : Cytokines and their receptors in the central nervous system : physiology, pharmacology, and pathology. *Pharmacol Ther* 69 : 85-95, 1996
- 13) Chao CC, Lokensgard JR, Sheng WS, Hu S, Peterson PK : IL-1-induced iNOS expression in human astrocytes via NF-(B. *Neuroreport* 8 : 3163-3166, 1997
- 14) Romero LI, Tatro JB, Field JA, Reichlin S : Roles of IL-1 and TNF-(in endotoxin-induced activation of nitric oxide synthase in cultured rat brain cells. *Am J Physiol* 270 : R326-332, 1996
- 15) Kakizaki Y, Watanobe H, Kohsaka A, Suda T : Temporal profiles of interleukin-1 β , interleukin-6, and tumor necrosis factor- α in the plasma and hypothalamic paraventricular nucleus after intravenous or intraperitoneal administration of lipopolysaccharide in the rat : estimation by push-pull perfusion. *Endocr J* 46 : 487-496, 1999
- 16) Harada S, Imaki T, Chikada N, Naruse M, Demura H : Distinct distribution and time-course changes in neuronal nitric oxide synthase and inducible NOS in the paraventricular nucleus following lipopolysaccharide injection. *Brain Res* 821 : 322-332, 1999

- 17) Wakita T, Shintani F, Yagi G, Nozawa S, Asai M : Combination of inflammatory cytokines increases nitrite and nitrate levels in the paraventricular nucleus of conscious rats. *Brain Res* 905 : 12-20, 2001
- 18) Paxinos G, Watson C : *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. Academic Press, London, 1999
- 19) Okamoto H, Ito O, Roman RJ, Hudetz AG : Role of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 in endotoxin-induced cerebral hyperemia. *Stroke* 29 : 1209-1218, 1998
- 20) Ishizuka Y, Ishida Y, Jin QH, Shimokawa A, Saita M, Kato K, Kunitake T, Hanamori T, Mitsuyama Y, Kannan H : Abdominal vagotomy attenuates interleukin-1 β -induced nitric oxide release in the paraventricular nucleus region in conscious rats. *Brain Res* 789 : 157-161, 1998
- 21) Shintani F, Kanba S, Nakaki T, Sato K, Yagi G, Kato R, Asai M : Measurement by *in vivo* brain microdialysis of nitric oxide release in the rat cerebellum. *J Psychiatry Neurosci* 19 : 217-221, 1994
- 22) Zhang H, Chen X, Teng X, Snead C, Catravas JD : Molecular cloning and analysis of the rat inducible nitric oxide synthase gene promoter in aortic smooth muscle cells. *Biochem Pharmacol* 55 : 1873-1880, 1998
- 23) Song HY, Regnier CH, Kirschning CJ, Goeddel DV, Rothe M : Tumor necrosis factor (TNF)-mediated kinase cascades : bifurcation of nuclear factor κ B and c-jun N-terminal kinase (JNK/SAPK) pathways at TNF receptor-associated factor 2. *Proc Natl Acad Sci USA* 94 : 9792-9796, 1997
- 24) Cao Z, Xiong J, Takeuchi M, Kurama T, Goeddel DV : TRAF6 is a signal transducer for interleukin-1. *Nature* 383 : 443-446, 1996
- 25) Yamada K, Komori Y, Tanaka T, Senzaki K, Nikai T, Sugihara H, Kameyama T, Nabeshima T : Brain dysfunction associated with an induction of nitric oxide synthase following an intracerebral injection of lipopolysaccharide in rats. *Neuroscience* 88 : 281-294, 1999
- 26) Misko TP, Moore WM, Kasten TP, Nickols GA, Corbett JA, Tilton RG, McDaniel ML, Williamson JR, Currie MG : Selective inhibition of the inducible nitric oxide synthase by aminoguanidine. *Eur J Pharmacol* 233 : 119-125, 1993
- 27) Werner-Felmayer G, Werner ER, Fuchs D, Hausen A, Reibnegger G, Wachter H : Tetrahydrobiopterin-dependent formation of nitrite and nitrate in murine fibroblasts. *J Exp Med* 172, 1599-1607 1990
- 28) Sakai N, Kaufman S, Milstien S : Parallel induction of nitric oxide and tetrahydrobiopterin synthesis by cytokines in rat glial cells. *J Neurochem*. 65895-902, 1995
- 29) Quagliarello VJ, Ma A, Stukenbrok H, Palade GE : Ultrastructural localization of albumin transport across the cerebral microvasculature during experimental meningitis in the rat. *J Exp Med* 174 : 657-672, 1991
- 30) Stojkovic T, Colin C, Le Saux F, Jacques C : Specific pattern of nitric oxide synthase expression in glial cells after hippocampal injury. *Glia* 22 : 329-337, 1998
- 31) Holmin S, Schalling M, Hojeberg B, Nordqvist AC, Skeftruna AK, Mathiesen T : Delayed cytokine expression in rat brain following experimental contusion. *J Neurosurg* 86 : 493-504, 1997
- 32) Xiao BG, Link H : IFN- γ production of adult rat astrocytes triggered by TNF- α . *Neuroreport* 9 : 1487-1490, 1998
- 33) Robertson B, Kong G, Peng Z, Bentivoglio M, Kristensson K : Interferon-gamma-responsive neuronal sites in the normal rat brain : receptor protein distribution and cell activation revealed by Fos induction. *Brain Res Bull* 52 : 61-74, 2000
- 34) Olsson T, Kelic S, Edlund C, Bakhiet M, Hojeberg B, van der Meide PH, Ljungdahl A, Kristensson K : Neuronal interferon-(immunoreactive molecule : bioactivities and purification. *Eur J Immunol* 24 : 308-314, 1994
- 35) Kiefer R, Kreutzberg GW : Gamma interferon-like immunoreactivity in the rat nervous system. *Neuroscience* 37 : 725-734, 1990
- 36) Bentivoglio M, Florenzano F, Peng ZC, Kristensson K : Neuronal IFN- γ in tuberomammillary neurones. *Neuroreport* 5 : 2413-2416, 1994
- 37) Kitamura Y, Takahashi H, Matsuoka Y, Tooyama I, Kimura H, Nomura Y, Taniguchi T : In vivo induction of inducible nitric oxide synthase by microinjection with interferon- γ and lipopolysaccharide in rat hippocampus. *Glia* 18 : 233-243, 1996