ラット視床下部EnkephalinおよびDynorphinニューロン系における Nitric Oxide Synthaseの発現

京都府立医科大学麻酔学教室

村 上 剛

Expression of Nitric Oxide Synthase in Enkephalin and Dynorphin Systems of the Rat Hypothalamus

Tsuyoshi Murakami

Department of Anesthesiology, Kyoto Prefectural University of Medicine

Nitric oxide (NO), a simple gas with free radical chemical properties, is synthesized by nitric oxide synthase (NOS) from arginine in neurons and acts as a neurotransmitter in the central and peripheral nervous systems. The immunohistochemical demonstration of NOS-immunoreactivity and its histochemical marker, NADPH-diaphorase activity in many neurons of the hypothalamus, suggest that NO plays a role in controlling the production and/or release of hypothalamic neuroendocrine peptides. In the present study, the expression of NOS in the enkephalin and dynorphin systems of the rat hypothalamus was examined by the combined method of the NADPH-diaphorase histochemistry and the immunocytochemistry of methionine enkephalin (M-Enk) or dynorphin B (Dyn-B). About 6 to 9% of M-Enk immunoreactive neurons in the paraventricular, arcuate and ventromedial nuclei expressed NADPH-diaphorase activity. Dyn-B immunoreactive neurons, however, showed NADPH-diaphorase activity in high ratio (37%-84%) in the supraoptic nucleus and the parvocellular and magnocellular paraventricular nucleus. These results revealed that a part of the enkephalin and dynorphin neurons in the rat hypothalamus have the ability to produce NO. The high ratio of expression of NO in magnocellular neurosecretory dynorphin containing neurons suggested that NO participates in controlling posterior pituitary hormone secretion together with dynorphin.

Keywords: Nitric oxide synthase, NADPH-diaphorase, Methionine enkephalin, Dynorphin B, Hypothalamus

緒 言

Nitric oxide (NO) は低分子のガス状フリーラディカルであり, 従来人体にとって有害な物質であると考えられてきた。しかし近年になって, 実際には体内で非常に多くの役割を担っていることが判明しつつあり, 各方面で注目を集めている¹⁾²⁾。NOの生体内での機能は大きく3つに分類でき³⁾, 1つはマクロファージや好中球の持つ抗菌作用・抗腫瘍作用として現れるもの, もう1つは内皮由来血管拡張物質 (endothelium-derived relaxing factor: EDRF) として知られていた性質, そして最後の1つが神経伝達物質としての性質である⁴⁾⁵⁾。フリーラディカルという性質上様々な物質と反応し¹⁾, シナプス小胞に貯蔵されることなく細胞膜を透過してゆくという²⁾, 今まで一般に知られていた神経伝達物質とは異なった低分子ガス独特の作用の仕

方もわかり、更に免疫組織化学的検索により脳内にはNO合成酵素であるnitric oxide synthase (NOS) を産生するニューロンが広範な部位に多く存在することが各研究者によって報告されている⁹⁾。現在までにNOSの作用や存在様式、発現調節等の研究は多いが、NOが実際に脳内でどのような機能を果たしているかについては十分に解明されているとは言えないのが現状である。神経内分泌領域においては、luteinizing hormone releasing hormone (LHRH) 分泌の調節⁸⁾、growth hormone releasing hormone (GRH) によるGHの調節⁹⁾などにNOが関与していることが示唆されているが、その視床下部での広範な分布密度から考えると、他の様々な作用が考えられる。一方、enkephalinとdynorphinニューロン系に代表されるオピオイドペプチドニューロンも視床下部の多くの部位に存在し、様々な視床下部ホルモンの分泌を制御していると言われて^{10)~17)}。今回NOの神経内分泌における役割を解明する一助として、NOSがenkephalinおよびdynorphinニューロン系に発現するかどうかをラット視床下部において検索した。NOSの検出にあたっては、NADPH-diaphorase (NADPH-d) 組織化学的手法を用いた。この検出法はNOSがNADPHから電子を受け取り還元され、還元型NOSがCaイオン/calmodulin/O₂の存在下にL-arginineを水酸化し、それによって生じたhydroxyarginineは更にNOSによって酸化されてcitrullineとNOが産生されるという一連の酵素反応を利用したものである¹⁾。NADPHにより還元されたNOSは他の適当なproton acceptor、例えばnitro blue tetrazoliumに電子を与えることでNADPH-d活性を示す²⁾。従ってこの組織化学法では還元されたnitro blue tetrazoliumのformazan生成物による青い発色部位がNOSの存在部位を示すと考えられる。

材 料 と 方 法

成熟Wistar系雄性ラット (体重200-240g) をペントバルビタール深麻酔下に2%パラホルムアルデヒドおよび0.2%ピクリン酸含有氷冷リン酸緩衝液 (PB) (pH7.4) で灌流後、取り出した脳を同液中で4℃にて2時間浸漬固定後、20% sucrose 含有0.1MPBに4℃、24時間浸透させた。次にクリオスタットを用いて厚さ15 μ mの前額断凍結切片を作製し、直ちにゼラチンコート済スライドガラスに貼り付けた。2時間室温で乾燥させた後、0.1Mリン酸緩衝食塩水 (PBS) (pH7.4) と0.1% Triton 含有0.1M PBS (pH7.4) にて各々2時間ずつ洗浄した。まずはじめに細胞中のNADPH-d活性がNOSの酵素分子の存在をあらわすかどうかを確認するため、NOS蛍光免疫細胞化学とNADPH-d組織化学を同一切片に適用した。まずNOSのC端の合成ペプチドを抗原としてウサギで作製した市販抗NOS血清 (1:500;Eurodiagnostica Co.:抗血清の特異性については文献 (18) 参照) 含有0.1M PBS (pH7.4) を室温で24時間反応させたのち、蛍光物質 (fluorescein) 標識抗ウサギ抗体 (1:500;Vecta) 含有0.1M PBS (pH7.4) を同じく室温で24時間反応させた。0.1M PBS (pH7.4) にて十分洗浄しグリセリン封入した後、蛍光顕微鏡を用いてNOS含有ニューロンを検索し、写真撮影を行った。0.1M PBS (pH7.4) にて洗浄しグリセリンを除去した後、 β -NADPH (1:5000;Oriental Bio.) およびnitro blue tetrazolium chloride (1:10000;Merk) を含む0.1% Triton 含有0.1M PBS (pH7.4) を37℃で1時間反応させた。0.1M PBS (pH7.4) にて洗浄した後、脱水包埋して写真撮影を行い、蛍光顕微鏡写真と比較検討した。

今回視床下部enkephalinニューロン系およびdynorphinニューロン系の検出にあたっては、各々の系の代表的なオピオイドペプチドであるmethionine enkephalin (M-Enk) およびdynorphin B (Dyn-B) に対する抗血清を用いた。NADPH-dとM-EnkあるいはDyn-Bの同一ニューロンでの発現の検出にあたっては、まずM-EnkあるいはDyn-Bの蛍光免疫細胞化学施行後、NADPH-d組織化学を行った。切片は抗M-Enk血清 (1:4000;Immunonuclear Corp.) または抗Dyn-B血清 (1:4000;Peninsula Labo.) を含む0.1% Triton 含有0.1M PBS (pH7.4) を室温で24時間反応させた後、fluorescein標識抗ウサギ抗体 (1:500;Vecta) 含有0.1M

PBS (pH7.4) を同じく室温で24時間反応させた後、蛍光写真撮影を行った。その後のNADPH-d反応および共存の検索は抗NOS血清の場合と同様に行った。共存率の算定にあたっては、5匹のラットからとった任意の切片中の各神経核におけるM-EnkおよびDyn-Bの陽性細胞（総計約5500個）を写真上で選び、その細胞がNADPH-d活性を発現するかどうかを各細胞毎に検出した。

結 果

1. 視床下部におけるNADPH-diaphorase含有細胞の分布とNOSとの共存

視床下部においてはNADPH-d活性を示す細胞は最も高頻度に室傍核および視索上核に、続いて外側視床下野に認められる（図1）。このうち外側視床下野の細胞はNADPH-d活性が強く、大脳皮質や線条体のものときほど程度は変わらなかった。室傍核、視索上核の細胞は他の部位の反応性に比して一般に弱く、またその反応程度にもばらつきがあった。室傍核を各亜核ごとに観察すると、室傍核前領域（PaAP）では中～大型の細胞が多数、室傍核室周囲領域（PaPe）、室傍核背側領域（PaDP）では小型の細胞が少数、室傍核内側領域（PaMP）、室傍核腹側領域（PaVP）では小型の細胞が中等数、室傍核外側大細胞領域（PaLM）では大型細胞が中等数、室傍核後領域（PaPo）では小型細胞が少数NADPH-d活性を示した（図1A, B）。更に、視索上核（SON）、視索上核視交叉後領域（SOR）でも多くの大型細胞に反応性が認められた（図1A, B, C）。NADPH-d活性は前視床下野（AH）、前室周囲核（PeA）、弓状核（Arc）、腹内側核（VMH）、背内側核（DMH）の小型細胞にも認められた（図1A, C）。NADPH-d組織化学とNOS免疫組織化学の同一切片への適応において、上記のいずれの部位においてもNOS免疫反応陽性細胞はNADPH-d活性を示した（図2）。

図1 視床下部におけるNADPH-d活性を発現するM-EnkおよびDyn-B含有細胞の分布の模式図。左はM-EnkとNADPH-dの共存を、右はDyn-BとNADPH-dの共存を示す。□：M-Enk免疫反応陽性であるがNADPH-d活性は陰性の細胞，■：M-Enk免疫反応，NADPH-d活性共に陽性の細胞，△：Dyn-B免疫反応陽性だがNADPH-d活性陰性の細胞，▲：Dyn-B免疫反応，NADPH-d活性共に陽性の細胞，●：NADPH-d活性陽性でM-Enk免疫反応，Dyn-B免疫反応いずれも陰性の細胞。冠状断切片のレベルはA;Bregma -1.40mm, B;Bregma -1.80mm, C;Bregma -2.56mmである。

図2 視床下部室傍核周辺におけるNOS免疫反応陽性細胞 (A) とNADPH-d活性陽性細胞 (B)。両者はほぼ完全に一致した。Bar=200 μ m

2. Enkephalin ニューロン系におけるNADPH-diaphoraseの発現

視床下部におけるM-Enk陽性細胞は前視床下野 (AH), 前室周囲核 (PeA), 室傍核 (Pa), 弓状核 (Arc), 腹内側核 (VMH), 背内側核 (DMH) に認められた (図1)。室傍核においては, 腹側および内側の小細胞領域に中型および小型のM-Enk陽性細胞が多数検出されたが, このうち少数のものはNADPH-d活性を発現していた (図3)。また腹内側核腹側部は, 視床下部内で最も密にM-Enk陽性細胞および線維終末が認められる部位であるが, ここでも約6%のM-Enk陽性細胞がNADPH-d活性を発現していた (図4)。図1左側はM-EnkとNADPH-dの共存部位を模式図で示したものである。各部位におけるM-Enk陽性細胞のNADPH-d活性発現率をまとめると, 室傍核小細胞部 (PaP: 室傍核内側領域PaMP, 室傍核腹側領域PaVP, 室傍核背側領域PaDPを合わせたもの) で最高の8.5%を示し, 弓状核 (Arc) 7.6%, 腹内側核 (VMH) 6.1%, 前視床下野 (AH) 3.2%と続いた (表1)。

図3 室傍核におけるM-Enk免疫反応陽性細胞 (A) とNADPH-d 活性陽性細胞 (B)。腹側および内側の小細胞領域に共存細胞 (矢印) が認められる。Bar=100 μ m

図4 腹内側核腹側部におけるM-Enk免疫反応陽性細胞 (A) とNADPH-d 活性陽性細胞 (B)。矢印は共存細胞を示す。 Bar=100 μ m

表1 視床下部各部位におけるM-Enk陽性細胞のNADPH-d活性発現率

	AH	PeA	PaP	VMH	DMH	Arc
A) Number of m-Enk-IR Neurons	186	61	436	476	303	525
B) Number of m-Enk-IR Neurons Expressing NADPH-d	6	0	37	29	0	40
B / A (%)	3.2	0	8.5	6.1	0	7.6

図5 室傍核におけるDyn-B免疫反応陽性細胞 (A) とNADPH-d 活性陽性細胞 (B)。大型のDyn-B陽性細胞が多数みられ、外側大細胞領域 (PaLM)、背側小細胞領域 (PaDP)、腹側小細胞領域 (PaVP)、内側小細胞領域 (PaMP) いずれにおいても多数の細胞がDyn-BとNADPH-d活性の両者を発現している。Bar=100 μ m

3. Dynorphin ニューロン系における NADPH-diaphorase 活性の発現

Dyn-B 陽性細胞は視索上核 (SON), 視索上核視交叉後領域 (SOR), 室傍核, 弓状核 (Arc), 背内側核 (DMH) のいずれの部位においても多数認められた (図1)。室傍核においては, 外側大細胞領域 (PaLM) を中心として多くの大型細胞 (直径30-50 μ m) に Dyn-B 免疫陽性反応が認められ, そのうち約30%のものが NADPH-d 活性を示した (図5)。視索上核および視索上核視交叉後領域は最も密に Dyn-B 免疫反応が認められる部位であるが, これらの細胞の NADPH-d 反応発現率も高く, 特に視索上核視交叉後領域においてはほとんどのものが NADPH-d 活性を発現した (図6)。図1右側は Dyn-B と NADPH-d の共存部位を模式図で示したものである。視床下部各領域における Dyn-B 陽性細胞の NADPH-d 活性発現率は, 前室周囲核 (PeA) 28.2%, 室傍核の前小細胞領域 (PaAP) 62.7%, 室周囲領域 (PaPe) 13.7%, 背側小細胞領域 (PaDP) 8.4%, 内側小細胞領域 (PaMP) 27.1%, 腹側小細胞領域 (PaVP) 55.5%, 外側大細胞領域 (PaLM) 37.0%, 後領域 (PaPo) 20.3%, そして視索上核 (SON) 50.5%, 視索上核視交叉後領域 (SOR) 84.0%, 弓状核 (Arc) 2.8%, 背内側核 (DMH) 1.1% であった (表2)。

図6 視索上核 (A, C) および視索上核視交叉後領域 (B, D) における Dyn-B 免疫反応陽性細胞 (A, B) と NADPH-d 活性陽性細胞 (C, D)。両部位とも Dyn-B 免疫反応陽性細胞が密にみられ, 視索上核においては半数以上の細胞に, 視索上核視交叉後領域においてはほとんどの細胞に NADPH-d 活性が発現している。Bar=100 μ m

表2 視床下部各部位におけるDyn-B陽性細胞のNADPH-d活性発現率

	PeA	PaAP	PaPe	PaDP	PaMP	PaVP	PaLM	PaPo	SON	SOR	Arc	DMH
A) Number of Dyn-B-IR Neurons	248	158	161	95	177	256	395	64	895	244	509	453
B) Number of Dyn-B-IR Neurons Expressing NADPH-d	70	99	22	8	48	142	146	13	452	205	14	5
B / A (%)	28.2	62.7	13.7	8.4	27.1	55.5	37.0	20.3	50.5	84.0	2.8	1.1

考 察

M-Enk と Dyn-B はともにオピオイドペプチドに分類されるが、各々別の前駆体から生成される。M-Enk は preproenkephalin (preproenkephalin A) からであり、Dyn-B は preprodynorphin (preproenkephalin B) からである¹⁰⁾¹¹⁾。脳内においては、preproenkephalin を code する遺伝子と preprodynorphin を code する遺伝子が別々のニューロンに発現して各々異なった機能をになっていると推測されている。視床下部においても enkephalin および dynorphin を発現するニューロンは多数検出され¹²⁾¹³⁾、enkephalin 含有ニューロンは腹内側核、脳弓周囲、弓状核に¹²⁾、dynorphin 含有ニューロンは腹内側核のみならず、視索上核および室傍核に多く検出される¹³⁾。preproenkephalin および preprodynorphin 由来の多数のペプチドは脳内神経内分泌における役割が注目されており¹⁴⁾¹⁵⁾、視床下部下垂体後葉系においては oxytocin, vasopressin の放出を修飾する働きがあると考えられている¹⁶⁾¹⁷⁾。

NO が注目されるようになったのは 1987 年に NO が EDRF と同一の物質であることが同定されてからである¹⁹⁾。それ以来様々な面から NO の生体内での役割について研究がなされており、内分泌系の研究も多い。NOS は発現様式や co-factor 要求性の違いにより血管内皮や神経細胞に分布する constitutive NOS (cNOS) とマクロファージや好中球に存在する inducible NOS (iNOS) に分類される¹⁾²⁾³⁾。このうち神経内分泌領域においては神経細胞に存在する constitutive type の NOS から放出される NO がホルモン分泌の調節に関わっていると考えられている。視床下部下垂体系においては、視床下部および下垂体の両レベルで NO がホルモン分泌に関与していると考えられている。下垂体レベルの調節の例としては、Kato は⁹⁾ラット下垂体前葉細胞を用いて GRH による Growth Hormone 分泌を NO が抑制することを明らかにしている。視床下部レベルでは、norepinephrine が NO を介して prostaglandin E₂ を増加させ、それによって LHRH の分泌を調節しているという報告がある⁸⁾。さらに Sagar らの食塩水負荷による下垂体後葉での NADPH-d 活性の増強²⁰⁾、Calka らの室傍核視索上核における NADPH-d と angiotensin-(1-7) との共存の報告は²¹⁾、NO が生体内で水分バランスの調節に関与していることを示唆している。

視床下部における NO 産生ニューロンに関しては、現在のところ NADPH-d 組織化学²⁰⁾²²⁾と NOS 抗血清を利用した免疫組織化学⁶⁾⁷⁾によって検索されており、現在まで中枢神経系においては NADPH-d 反応は完全に NOS 免疫活性と一致するとされている²³⁾²⁴⁾。両者の手法を用い、視床下部においては室傍核、視索上核から

下垂体後葉に至るニューロンがNOSを産生することは明らかになっているが²⁰⁾、その他の系についての詳細は解明されていない。今回我々の検索した視床下部においても、NOS免疫活性とNADPH-d反応は完全に一致し、NADPH-d反応は簡単な組織化学的手法でできる、有効なNOS産生ニューロン検出の手段と言える。今回の我々のNADPH-d組織化学反応の視床下部内での分布はVincentらのもの⁶⁾とはほぼ一致しているが、彼らの報告では弓状核においては細胞体は染まらないとされているのに対して、我々の結果では弓状核にも小型の細胞が少数陽性であった点が異なる。Sagarら²⁰⁾、Vincentら⁶⁾はともに室傍核と視索上核の大細胞性ニューロンにおけるNADPH-d活性が他の視床下部ニューロンより全体に弱く、またその染色程度に細胞間の強弱があることを指摘しているが、その点でも我々の結果は一致している。

M-EnkとNADPH-dとの共存関係を視床下部全体としてみると、Dyn-BとNADPH-dとの共存と比較して、部位も限定されるし共存率も低かった。その中で比較的共存率が高い(8.5%)室傍核小細胞領域は腹内側核へ投射する線維と正中隆起へ投射する線維を供給する部位であり、また次に高い(7.6%)弓状核は正中隆起外層に投射する部位としてよく知られており、また6%近くの共存率を示す腹内側核は脳の多くの神経核群と広く入出力関係を持ち、摂食行動を調節する中枢でもある。これらの部位で少数ながらもNOがM-Enkと同一ニューロン内に共存していることは、これらのニューロンにおいてはM-Enkが神経伝達物質として機能するとき、何らかの形でNOが共同作用することを示唆している。M-Enkニューロンは前視床下野、背内側核にも多く認められるが、これらの部位ではほとんどNOと共存しなかった。

一方Dyn-Bについては、従来より視索上核や室傍核の大細胞領域に多量に存在する下垂体後葉へ投射する神経内分泌性ニューロンに発現することが知られており、一部のものがvasopressinと共存し、また一部のものがoxytocinと共存しているとされる²⁵⁾。NOとDyn-Bとの共存もこの大細胞領域では非常に高率(37-84%)であり、NOがDyn-Bと共に視床下部-下垂体後葉系の神経内分泌機能に関与していることを示唆するものといえよう。事実、下垂体後葉にはvasopressin, oxytocin, Dyn-BのみならずNOS免疫陽性終末が密に分布しており、この部位でdynorphinニューロン神経終末から放出されたNOが、血管を拡張させたり、oxytocin, vasopressin等の放出を調節している可能性が考えられる²⁶⁾²⁷⁾。また前室周囲核(PeA)や室傍核小細胞領域での共存も高率で、下垂体後葉系以外にも正中隆起外層を介する視床下部-下垂体前葉系にNOとDyn-Bが機能的に相互に関連し合っている可能性も高いと思われる。しかし同様に正中隆起外層に投射するニューロンの分布する弓状核での共存は非常に低率であり、重要な意味を持たないと考えられた。

Swansonら²⁸⁾は室傍核をその細胞構築から複数の領域に分類しており、その各々の領域について投射部位を検討している。それによると、背側領域(PaDP)は主に脊髓へ投射しており、腹側領域(PaVP)は脊髓、迷走神経背側核、下垂体のいずれかに、内側領域(PaMP)は主に下垂体へ投射するが一部は脊髓や迷走神経背側核へも投射、外側大細胞領域(PaLM)はほとんど全て下垂体へと投射するという。従って、NOとDyn-Bとの共存率を投射部位から検討すると、主に下垂体に投射する外側大細胞領域と内側領域で各々37%、27%と比較的高値であることから下垂体へ投射するDyn-B含有細胞のうち約1/3はNOを発現しているといえる。主に脊髓に投射する細胞よりなる背側領域は8.4%と低値であり、脊髓へ投射する細胞ではあまり共存しないと言える。一方、脳幹あるいは下垂体のいずれかに投射する細胞の混在する腹側領域にDyn-B/NADPH-dの共存が55%も認められたことは、脳幹へ投射する細胞の比較的多くのものがNOを発現していることを示唆している。

今回の実験により、NOはオピオイドペプチドのなかでもenkephalinニューロン系には少数発現し、dynorphinニューロン系に高頻度に発現することが示唆された。NOが実際にどのような様式でenkephalinやdynorphinの合成分泌に関与しているのか、またそれが生体内でどのような意義を持つのかは今後の課題であり、他の視床下部一下垂体系のホルモンとの関連も含めて更に検討する必要がある。

結 語

ラット視床下部enkephalinおよびdynorphinニューロン系におけるNOSの発現を、免疫組織化学とNADPH-d組織化学を同一切片に適用することにより検索した。NADPH-d活性の発現率はM-Enk陽性細胞では室傍核小細胞部の8.5%を最高に、弓状核7.6%、腹内側核6.1%、前視床下野3.2%と低かったが、Dyn-B陽性細胞では、室傍核腹側小細胞領域55.5%、視索上核50.5%をはじめとする多くの領域で高値を示した。この結果から、視床下部においてはNOSは少数のenkephalinニューロン系および多数のdynorphinニューロン系に発現することが明らかとなり、NOの神経内分泌への関与が注目される。

謝 辞

稿を終えるにあたり、本論文の御校閲を賜りました京都府立医科大学麻醉学教室田中義文教授ならびに第二解剖学教室井端泰彦教授に深謝致します。また、本研究を御指導して頂きました京都府立医科大学第二解剖学教室岡村 均助教授に感謝致します。

略 語 — 覧

AH:anterior hypothalamic area (前視床下野), Arc:arcuate nucleus (弓状核), DMH:dorsomedial hypothalamic nucleus (背内側核), f:fornix (脳弓), ic:internal capsule (内包), LH:lateral hypothalamic area (外側視床下野), ME:median eminence (正中隆起), mt:mammillothalamic tract (乳頭視床束), oc:optic chiasma (視交叉), ot:optic tract (視索), PaAP:paraventricular hypothalamic nucleus;anterior parvocellular part (室傍核前小細胞領域), PaDP:paraventricular hypothalamic nucleus;dorsal parvocellular part (室傍核背側小細胞領域), PaLM:paraventricular hypothalamic nucleus;lateral magnocellular part (室傍核外側大細胞領域), PaMP:paraventricular hypothalamic nucleus;median parvocellular part (室傍核内側小細胞領域), PaP:paraventricular hypothalamic nucleus;parvocellular part (室傍核小細胞領域), PaPe:paraventricular hypothalamic nucleus;periventricular part (室傍核室周囲領域), PaPo:paraventricular hypothalamic nucleus;posterior part (室傍核後領域), PaVP:paraventricular hypothalamic nucleus;ventral parvocellular part (室傍核腹側小細胞領域), PeA:anterior periventricular hypothalamic nucleus (前室周囲核), Pef:perifornical area (脳弓周囲野), SCN:suprachiasmatic nucleus (視交叉上核), sm:stria medullaris thalami (視床髄条), SON:supraoptic nucleus (視索上核), SOR:supraoptic nucleus;retrochiasmatic part (視索上核視交叉後領域), TC:tuber cinereum (灰白隆起), VMH:ventromedial hypothalamic nucleus (腹内側核), ZI:zona incerta (不確帯)。

文 献

- 1) Snyder S.H. Nitric oxide: first in a new class of neurotransmitters? *Science*. 1992;257:24:494-496
- 2) Bredt D.S., Snyder S.H. Nitric oxide, a novel neuronal messenger. *Neuron*. 1992;8:3-11
- 3) Lowenstein C.J., Snyder S.H. Nitric oxide, a novel biologic messenger. *Cell*. 1992;70:705-707
- 4) Moncada S., Palmer R.M., Higgs E.A. Nitric oxide: physiology, pathology, and pharmacology. *Pharmacol Rev*. 1991;43:2:109-141
- 5) Bult H., Boeckxstaens G.E., Pelckmans P.A., Jordaens F.H., Van Maerke Y.M., Herman A.G. Nitric oxide as an inhibitory non-adrenergic non-cholinergic neurotransmitter. *Nature*. 1990;345:346-347
- 6) Vincent S.R., Kimura H. Histochemical mapping of nitric oxide synthase in the rat brain. *Neuroscience*. 1992;46:4:785-791
- 7) Bredt D.S., Hwang P.M., Snyder S.H. Localization of nitric oxide synthase indicating a neural role for nitric oxide. *Nature*. 1990;347:25:768-770
- 8) Rettori V., Gimeno M., Lyson K., McCann M. Nitric oxide mediates norepinephrine-induced prostaglandin E_2 release from the hypothalamus. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1992;89:11543-11546
- 9) Kato M. Involvement of nitric oxide in growth hormone (GH)-releasing hormone-induced GH secretion in rat pituitary cells. *Endocrinology*. 1992;131:5:2133-2138
- 10) Fallon J.H., Leslie F.M. Distribution of dynorphin and enkephalin peptides in the rat brain. *J Comp Neurol*. 1986;249:293-336
- 11) Petrusz P., Merchenthaler I., Maderdrut J.L. Distribution of enkephalin-containing neurons in the central nervous system. In: Bjorklund A., Hokfelt T., eds, *Handbook of Chemical Neuroanatomy*. Vol.4: GABA and Neuropeptides in the CNS, Part 1. Elsevier Science Publishers B.V., 1985;273-328
- 12) Khachaturian H., Lewis M.E., Watson S.J. Enkephalin systems in diencephalon and brainstem of the rat. *J Comp Neurol*. 1983;220:310-320
- 13) Watson S.J., Khachaturian H., Akil H., Coy D.H., Goldstein A. Comparison of the distribution of dynorphin systems and enkephalin systems in brain. *Science*. 1982;218:1134-1136
- 14) Micevych P., Elde R. Relationship between enkephalinergic neurons and the vasopressin-oxytocin neuroendocrine system of the cat: an immunohistochemical study. *J Comp Neurol*. 1980;190:135-146
- 15) Roth K., Weber E., Barchas J.D., Chang D., Chang J.K. Immunoreactive dynorphin-(1-8) and corticotropin-releasing factor in subpopulation of hypothalamic neurons. *Science*. 1983;219:189-191
- 16) Bicknell R.J., Chapman C., Leng G. Effects of opioid agonists and antagonists on oxytocin and vasopressin release in vitro. *Neuroendocrinology*. 1985;41:142-148
- 17) Summy-Long J.Y., Rosella-Dampman L.M., McLemore G.L., Koehler E. Kappa opiate receptors inhibit release of oxytocin from the magnocellular system during dehydration. *Neuroendocrinology*. 1990;51:376-384
- 18) Alm P., Larsson B., Ekblad E., Sundler F., Andersson K.E. Immunohistochemical localization of peripheral nitric oxide synthase-containing nerves using antibodies raised against synthesized C- and N-terminal fragments of a cloned enzyme from rat brain. *Acta Physiol Scand*. 1993;148:421-429
- 19) Palmer R.M., Ferrige A.G., Moncada S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature*. 1987;327:524-526
- 20) Sagar S.M., Ferriero D.M. NADPH Diaphorase activity in the posterior pituitary: relation to neuronal function. *Brain Res*. 1987;400:348-352
- 21) Calka J., Block C.H. Angiotensin-(1-7) and nitric oxide synthase in the hypothalamo-neurohypophysial system. *Brain Res Bull*. 1993;30:677-685
- 22) Scherer-Singler U., Vincent S.R., Kimura H., McGeer E.G. Demonstration of a unique population of neurons with NADPH-diaphorase histochemistry. *J Neurosci Meth*. 1983;9:229-234
- 23) Dawson T.M., Bredt D.S., Fotuhi M., Hwang P.M., Snyder S.H. Nitric oxide synthase and neuronal NADPH diaphorase are identical in brain and peripheral tissues. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1991;88:7797-7801
- 24) Hope B.T., Michael G.J., Knigge K.M., Vincent S.R. Neuronal NADPH diaphorase is a nitric oxide synthase. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1991;88:2811-2814

- 25) Meister B., Cortes R., Villar M.J., Schalling M., Hökfelt T. Peptides and transmitter enzymes in hypothalamic magnocellular neurons after administration of hyperosmotic stimuli: comparison between messenger RNA and peptide/protein levels. *Cell Tissue Res.* 1990;260:279-297
- 26) Summy-Long J.Y., Bui V., Mantz S., Koehler E., Weisz J., Kadekaro M. Central inhibition of nitric oxide synthase preferentially augments release of oxytocin during dehydration. *Neurosci Lett.* 1993;152:190-193
- 27) Yasin S., Costa A., Trainer P., Windle R., Forsling M.L., Grossman A. Nitric oxide modulates the release of vasopressin from rat hypothalamic explants. *Endocrinology.* 1993;133:1466-1469
- 28) Swanson L.W., Kuypers H.G.J.M. The paraventricular nucleus of the hypothalamus: cytoarchitectonic subdivisions and organization of projections to the pituitary, dorsal vagal complex, and spinal cord as demonstrated by retrograde fluorescence double-labeling methods. *J Comp Neurology.* 1980;194:555-570

(受付日: '94.3.31)

(採択日: '94.5.23)