

原 著

Inducible nitric oxide synthase (iNOS)の局在からみた

潰瘍性大腸炎における nitric oxide の関与

—免疫組織化学的検討—

東京女子医科大学 第二病理学（主任：笠島 武教授）

同 消化器内科（主任：林 直諒教授）

池 田 郁 雄

（受付 平成7年2月14日）

**A Study on the Distribution of Inducible Nitric Oxide Synthase Positive Cells
in the Ulcerative Colitis (UC) with Regard to the Relationship
between Nitric Oxide and UC: An Immunohistological Study****Ikuo IKEDA**

Department of Pathology (Director: Prof. Takeshi KASAJIMA),

Department of Gastroenterology (Director: Prof. Naoaki HAYASHI)

Tokyo Women's Medical College

It has been reported that biosynthesis of nitric oxide (NO) increases in the colon mucosa of patients with active ulcerative colitis (UC). It was suggested that NO might be one indicator for UC activity. For pathological and immunohistological analysis of the role of NO within the colon tissues, we prepared rabbit antibody to human inducible NO synthase (iNOS) and examined immunohistologically the distribution of iNOS-positive cells in UC tissue. Twelve tissue specimens affected with UC and six tissue specimens affected by ischemic colitis were obtained from surgical removal. The iNOS-positive neutrophils and macrophages were observed at the base of the ulcer in the active stage, but not in the regions distant from the ulcer in the UC specimens. The iNOS expression was virtually absent in the colon walls in the inactive stage. It was inferred that a large amount of NO produced by iNOS-positive neutrophils and macrophages in the vicinity of the ulcer, was stimulated by interleukin- 1β , tumor necrosis factor- α and endotoxin. From this distribution of iNOS, it is believed that NO damages affected mucosal tissues surrounding the ulcer.

In the tissues of colon walls in the active stage, the iNOS was detected in the vascular endothelium and smooth muscle cells. In the colon tissues in the inactive stage, as well, iNOS could be observed in the dilated vascular endothelium. On the other hand, iNOS expression was detected in cured portions, including the vascular endothelium. From this distribution of iNOS, it is suggested that NO protects tissues through the vessel, especially due to vascular dilation with increased cGMP, and also subsequent increase in the blood flow. On the final analysis, it is possible that NO damages tissues by increasing inflammatory activity while it repairs damaged tissues by increasing the local blood flow and cGMP.

はじめに

潰瘍性大腸炎 (ulcerative colitis, UC と略す) は原因不明の難治性疾患の一つとして、その原因の究明と治療法の開発が急務とされている。この疾患は、厚生省特定疾患に指定され、診断基準案が提示されている。このうち、病期は活動期と非活動期に分けられている。

UC の成因としては、細菌の関与^{1)~4)}、自己免疫等^{5)~10)}が指摘されているが、特定されていない。最近、UC の病態に一酸化窒素 (NO) の関与が注目されている。

特に、UC の活動期にはインターロイキン1 β (IL-1 β)、腫瘍壊死因子 (TNF- α)、インターフェロン γ (INF- γ) などのサイトカインやエンドトキシンが、血液中および組織中に増加することが知られている^{11)~14)}。これらの刺激により、マクロファージ、好中球、内皮細胞より大量に NO を発生する¹⁵⁾。NO は L-arginine を基質とし inducible type の NO 合成酵素 (iNOS) と constitutive type の NO 合成酵素 (cNOS) から生成されているが¹⁶⁾、炎症の場では主に iNOS を経由し NO が産生されている¹⁷⁾。炎症性細胞から放出された NO は種々のフリーラジカルを産生し、実質臓器を傷害するといわれている¹⁸⁾。

活動期 UC での NO の関与については、活動期 UC の患者の直腸粘膜で L-arginine の代謝産物である L-citrulline を測定し、間接的に一酸化窒素の生合成の増加を証明した報告が最初である¹⁹⁾。さらに、患者の血中 NO₂⁻、NO₃⁻濃度測定の結果と臨床病期分類から活動期の UC ではクローン病よりも、NO の関与がより強く示唆された²⁰⁾。しかし UC の病巣部で、どのような組織または細胞が NO 産生に関与しているのかを検討した報告は未だない。本研究では UC の病態とその進展に NO がどのように関わるかを検討するため、抗ヒト iNOS 抗体を作製し、UC 患者の腸管組織における iNOS の発現、分布について免疫組織学的に検討を行った。

対象および方法

1. 対象

免疫組織化学的検討には UC 12例 (手術標本11

例、病理解剖 1 例) を検討した。UC 手術標本は東京女子医科大学第二外科学教室の症例を用いた。病理解剖例と虚血性大腸炎例は、同大学第二病理学教室での症例を用いた。UC の症例は、大出血、腹膜炎、中毒性巨大結腸症や癌化等の診断で外科的切除された大腸である。病理組織学的特徴から、活動期の病態を示す部位と、非活動期の病態を示す部位の大腸組織を比較検討した。

なお対照に用いた非癌部組織13例 (大腸癌非癌部 7 例、虚血性大腸炎 6 例) は大腸癌患者の癌部から5cm 以上離れた非癌部大腸組織を用いた。

血漿中 NO₂⁻、NO₃⁻の測定は、生化学検査で炎症反応を測定した一環として、同大学消化器病センター内科入院中の患者のうち大腸生検所見と臨床所見から UC の活動期、非活動期の判定を行った 5 症例ごとに行った。

2. 方法

1) 血漿中 NO₂⁻、NO₃⁻の測定

NO の半減期は非常に短く、数秒で安定な最終生成物である NO₂⁻、NO₃⁻に酸化される。そのため、NO₂⁻、NO₃⁻を測定することで、NO の産生を間接的に調べた。血中 NO₂⁻、NO₃⁻濃度は患者血漿100 μ l に Griess 試薬100 μ l を混合し、室温で10分間静置し、吸光度計 (ファルマシア社製) で540nm の吸光度を測定した²⁰⁾。

2) 標本作製

手術標本および剖検標本を10%緩衝ホルマリンで約24時間固定し、パラフィンで包埋した。包埋組織から3 μ m の連続切片を作製し、hematoxylin-eosin (HE) 染色、elastica van Gieson (EVG) 染色を行い、形態観察を行った。UC 手術標本上で、肛門側端で潰瘍形成がみられる部位を活動部、口側端でびらんや潰瘍形成のみられない部位を非活動部とした。非活動部位との比較で活動部位では潰瘍形成により表層の粘膜が剝離しているため、表層の粘膜を除いた間質組織を比較検討した。

3) 抗ヒト iNOS 抗体作製

抗ヒト iNOS 抗体は、ヒト iNOS²¹⁾ の C 末端側の14アミノ酸をペプチドとして合成し、抗体作製キット (PIERCE 社製) を用い keyhole limpet hemocyanin と結合し、これを抗原として New

Zealand white rabbit (体重3kg) に1週間ごとに4回、背中と四肢の皮下に注射し免疫した。最終免疫7日後に耳静脈より血液を採取し、3,000rpmで30分間遠心分離した。この後、抗体精製カラムを用いIgGに精製し、これを抗ヒトiNOS抗体とした。抗体の検定はWestern blot法で確認を行った。

4) Western blot 法

陽性例として、UC活動部位の患者の直腸粘膜生検標本1例を用いた。

Western blotは大腸粘膜細胞溶解成分(soluble form) 20 μ lにSDS solution 10 μ lを加え100°Cで4分間インキュベイトした後、acrylamide gelに注入し、200V、20mAで1時間電気泳動装置(アトー社製)で泳動を行った。次に、ウェスタン転写装置(マリソル社製)にて50V、200mAで4時間通電し、ニトロセルロース膜へ転写した。5%スキムミルクで1時間ブロッキングした後、1,000倍希釈抗ヒトiNOS抗体中にニトロセルロース膜を10時間反応させた後、0.01mol/l 燐酸緩衝食塩水pH 7.2 (PBS)で洗浄した。1,000倍希釈の二次抗体(アルカリフォスファターゼ標識ヤギ抗ウサギ抗体) 30 μ lを加え、1時間拡散し、アルカリホスファターゼ(ALP)で発色した²²⁾。

5) 免疫組織化学的検討

iNOS陽性細胞の種類を同定するため抗ヒトiNOS抗体(ウサギ, ポリクロナール, $\times 200$, 東京女子医科大学第二病理学教室製)と共に、Tリンパ球の抗体としてCD3抗体(ウサギ, ポリクロナール, $\times 200$, ダコジャパン製), Bリンパ球の抗体としてL-26抗体(マウス, モノクロナール, $\times 100$, ダコジャパン製)や、マクロファージ系細胞を認識する抗体、すなわち、DAKO-CD68抗体(マウス, モノクロナール, $\times 100$, ダコジャパン製)²³⁾, Mac387抗体(マウス, モノクロナール, $\times 100$, ダコジャパン製), Lysozyme抗体(ウサギ, ポリクロナール, $\times 300$, ダコジャパン製), LN-5抗体(マウス, モノクロナール, $\times 1$, ニチレイ製)²⁴⁾, 樹状細胞を認識するS-100タンパク(ウサギ, ポリクロナール, $\times 300$, ダコジャパン製)を一次抗体として用いた。

切片を脱パラフィン後、内因性ペルオキシダーゼ活性を0.3%過酸化水素/メタノールで4°C, 30分間処理した。なお、DAKO-CD68抗体, Mac387抗体の反応には脱パラフィン後、プロテアーゼKで10分間前処理を行った後、PBSで充分洗浄した(10分 \times 5回)。次に、10%ヤギ血漿で10分間非特異的反応をブロックした後、1% bovine serum albumin (BSA)で希釈した一次抗体を滴下し、4°Cで10時間反応させた。それぞれ一次抗体で反応させた後、PBSで充分洗浄した。間接法にて行うため、ペルオキシダーゼ標識二次抗体はヒツジ抗マウス免疫グロブリンFab'(100倍, Amersham Life Science社製)ないし、ヤギ抗ウサギ免疫グロブリンFab'(200倍, 医学生物学研究所製)を、それぞれ1%BSAで希釈したものを用いた。ペルオキシダーゼ標識二次抗体を1時間室温で反応させた後、PBSで充分洗浄した。その上で、0.05% (w/v) 3,3'-ジアミノベンジジン四塩酸塩を溶解した0.05M トリス塩酸緩衝液(pH 7.5)に0.003%過酸化水素を加えた発色液で発色した。ヘマトキシリンで核染色を行い、脱水、封入を行った。なお、陰性コントロールとして一次抗体の代わりに、家兎正常血漿とPBSのみを用いた。また、抗原として用いた合成ペプチドによる吸収試験も行った。

6) 統計的検討

細胞数は、高倍率(400倍)で検鏡し、腸管における間質の細胞1,000個中のiNOS陽性数を測定した。血管数は1視野(200倍)での数と、陽性血管数の割合とした。各数値はmean \pm SEで表した。Fisher's protected least significant differenceの検定を用い、5%未満のときに有意差ありとした¹⁷⁾。

結 果

1. 血漿中NO₂⁻, NO₃⁻濃度

生検標本で活動部位、非活動部位と確認された症例各5例ずつの血漿中NO₂⁻, NO₃⁻濃度を測定した。

UCの活動期の患者血漿では、循環血液中のNO₂⁻, NO₃⁻濃度が非活動期の患者血漿に比べ有意に高値であった(p<0.05)。UCの活動性とNO₂⁻,

NO_3^- 値に相関がみられた (図1)。

2. HE 標本での観察

活動部位は、肛門側の大腸で、好中球、リンパ球、形質細胞やマクロファージ等の細胞浸潤と腺

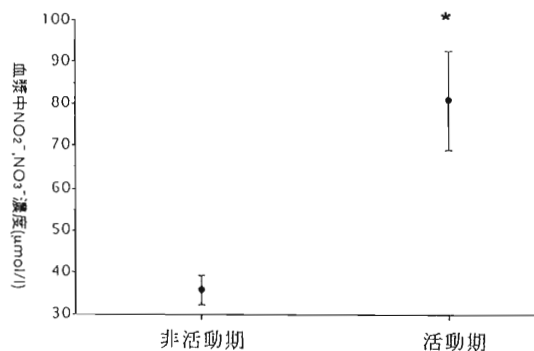


図1 Ulcerative colitis (UC) 患者の血漿中 NO_2^- , NO_3^- 濃度：非活動期と活動期の比較

*p<0.05

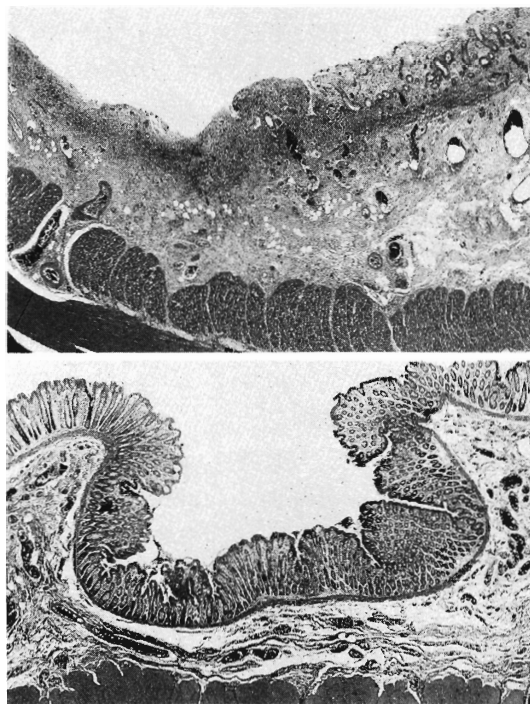


図2 UC 活動部 (上) と UC 非活動部 (下) の HE 標本

UC 活動部では潰瘍形成があり表層に crypt abscess の形成がみられる (40倍)。UC 非活動部では表層粘膜は保たれている。炎症性細胞浸潤は強くない (40倍)。

管の減少があり、びらんおよび粘膜下層までの潰瘍の形成 (U1-II) がみられ、粘膜筋板の肥厚、粘膜下層の線維化がみられた (図2上)。

非活動部位は、口側の大腸で、潰瘍の形成がみられず、炎症性細胞浸潤の減少がみられ、再生上皮と杯細胞が出現していた。

正常部位は、大腸粘膜の癌部から5cm 以上離れた非癌部を用いた。腺管の構造異型がなく、好中球、リンパ球等の炎症性細胞浸潤は殆ど認められなかった (図2下)。

UC と異なった炎症疾患として虚血性大腸炎 (ischemic colitis) の組織を用いた。同部位の組織変化は、表層粘膜は保たれているが、粘膜下層以下に、小血管の増生・拡張と共に浮腫と出血が認められた。

3. Western blot 法による大腸組織中 iNOS の証明

活動期 UC 潰瘍形成部の直腸粘膜生検組織を用いた Western blotting では、130kD に band を認めた (図3)。対照として用いた大腸癌手術標本の非癌部組織では band を認めなかった。分子量130 kD に band がみられ、iNOS²⁵⁾の特異性が確認された。鑑別するものとして constitutive NO synthase には neuronal NO synthase (nNOS)²⁶⁾, endothelial NO synthase (eNOS)²⁷⁾がある。我々が用いたヒト iNOS の C 末端側14アミノ酸は nNOS および eNOS に同じアミノ酸配列は認めなかった。nNOS は分子量が155kD と、iNOS (130

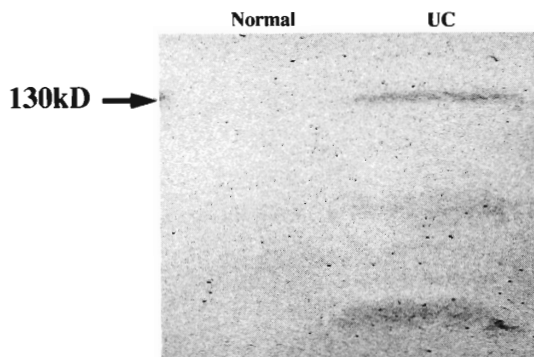


図3 Western blot

UC 活動部の直腸組織では、130kD にバンドが認められた。正常コントロール例ではバンドは認められない。

kD) に比べ大きく、Western blotting にて155kD にバンドを認めなかった。

4. iNOS の分布と同定, 検出率

この抗体を用い免疫組織学的検索で iNOS の分布と細胞種類の同定, 検出率を検討した。

検索した手術標本11例中全例に iNOS 陽性細胞がみられた。iNOS は胞体内に diffuse に認められ cytosol に一致した。

家兎正常血漿および PBS を一次抗体の代わりに用いた染色および吸収試験などの対照試験を行ったが、陰性であった。

UC 患者の活動部位の潰瘍底または潰瘍周囲を中心に iNOS 陽性細胞が集簇して認められた (図 4 上)。陰窩膿瘍中の好中球と、その周囲にあるマクロファージ様の明るい胞体を持った大型の細胞と線維芽細胞様の紡錘形の細胞の大部分に iNOS

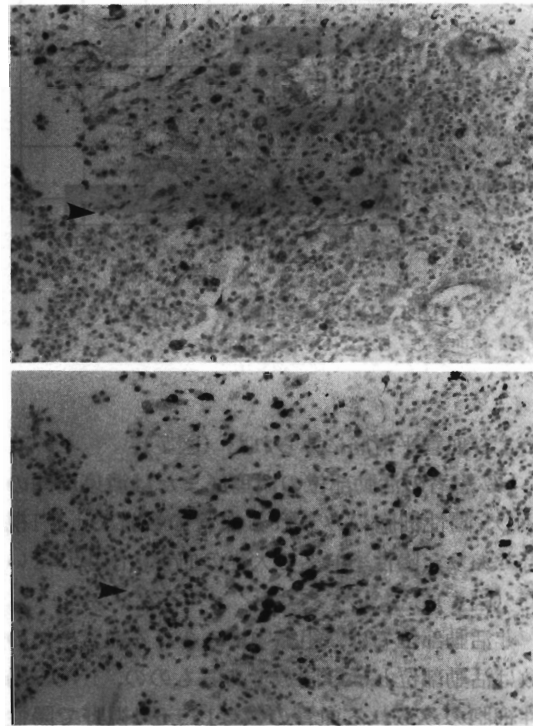


図4 UC活動部(上)で左方の矢印は潰瘍面をさしている。潰瘍部を中心に inducible nitric oxide synthase (iNOS) 陽性細胞が認められる(100倍)。同部位の連続切片(下)で左方の矢印は潰瘍面をさしている。CD68陽性細胞も潰瘍部を中心に認められる(100倍)。

の発現がみられた。腺管上皮に覆われている部位の間質には、マクロファージ様の明るい胞体を持った少数の大型細胞中に iNOS の発現がみられた。iNOS 陽性の細胞の数は $450 \pm 30/1,000$ であり、計測した細胞全体の約半数を占めていた (図

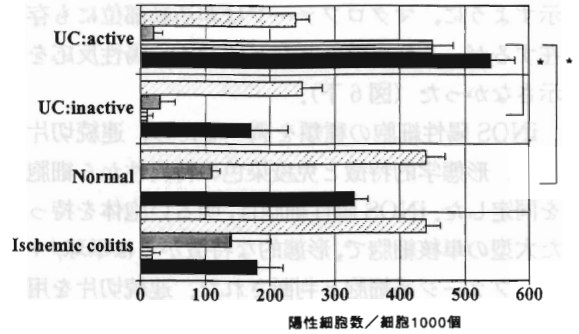


図5 UC活動部, UC非活動部, normal, ischemic colitis における iNOS, CD68, LN-5, CD3の陽性細胞数の比較

* $p < 0.01$, ■ CD68, ▨ iNOS, □ LN5, ▤ CD3.

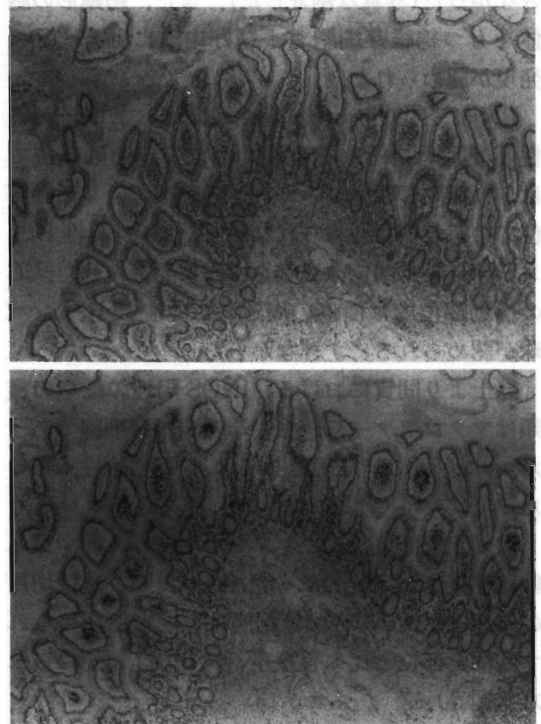


図6 UC非活動部(上): iNOS 陽性細胞はほとんど認められない(40倍)。同部位の連続切片(下): CD68 陽性細胞が表層を中心に認められる(40倍)。

5).

非活動部位では、マクロファージ様の明るい胞体を持った大型の細胞を主体に少数の iNOS 陽性細胞がみられた。iNOS 陽性細胞の数は $10 \pm 5 / 1,000$ と極端に減少していた (図 6 上)。両者には $p < 0.01$ で、有意差が認められた。しかし、図 5 に示すように、マクロファージは非活動部位にも存在するが、これらのほとんどは iNOS 陽性反応を示さなかった (図 6 下)。

iNOS 陽性細胞の種類を調べるため、連続切片上で、形態学的特徴と免疫染色の特異性から細胞を同定した。iNOS 陽性細胞は、明るい胞体を持った大型の単核細胞で、形態的な特徴からは単球/マクロファージ系細胞と判断された。連続切片を用いた免疫染色でも iNOS 陽性細胞 (図 4 上) は DAKO-CD68 抗体 (図 4 下)、Mac387 抗体、lysozyme 抗体、LN-5 抗体など単球/マクロファージ系細胞を表現する抗体に対する反応が陽性であり、CD3 および L-26 が陰性でリンパ球の性状を示さなかった (写真は割愛した)。また、紡錘形の胞体をもつ線維芽細胞および好中球にも iNOS の発現が認められた。

LN-5、S100 protein 陽性組織球および CD3 陽性 T 細胞は、それぞれ活動部位と非活動部位では、ほぼ同じ頻度にみられ、活動部位、非活動部位での有意差は認められなかった。L-26 陽性 B リンパ球は正常部位の濾胞を中心に認められた。UC の活動部位では潰瘍の周辺にごく少数 B リンパ球が認められるにすぎなかった。

以上より間質における、iNOS 陽性の細胞の種類はマクロファージ、好中球と線維芽細胞であった。リンパ球、神経線維などは、iNOS 陰性であった。

次に正常部位では、マクロファージ、好中球と線維芽細胞が比較的多く認められたが、連続切片の同部位に、iNOS 陽性細胞はほとんど認められず、活動部位と比べ有意差 ($p < 0.01$) が認められた (図 5)。

5. 血管内皮および血管平滑筋

血管内皮および血管平滑筋 (図 7, 8) について検討を行った。iNOS 陽性細胞は、血管内皮細胞

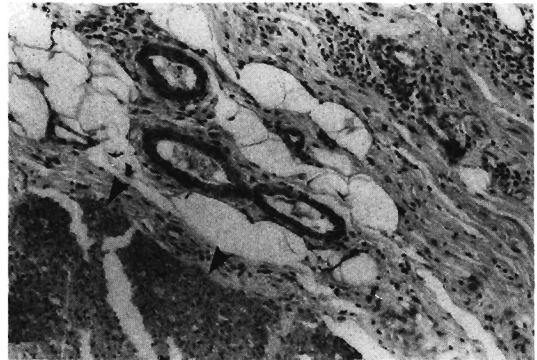


図 7 UC 活動部で左下方の矢印が示す大腸固有筋層に iNOS が弱く発現している。中心部の血管内皮および血管平滑筋に iNOS の発現が認められる (40 倍)。

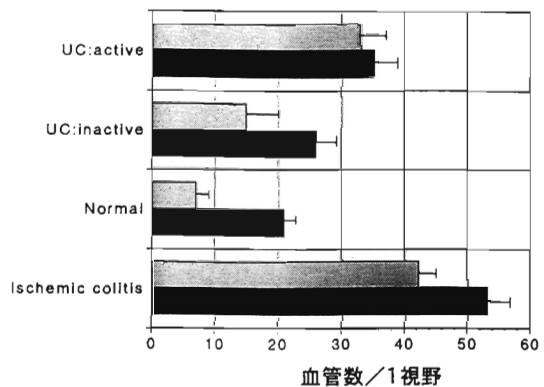


図 8 iNOS 陽性血管数と総血管数

■ 総血管数, ▨ iNOS 陽性血管数。

および血管平滑筋にみられた (図 7)。

UC 患者の活動部位の潰瘍底または潰瘍周囲の iNOS 陽性細胞のみられる血管の数は $33 \pm 4 / 1$ 視野であり、陽性率 94% で大半の血管に出現していた (図 8)。

非活動部位では、組織中にみられる血管全体の数は活動部位とほぼ同数であるものの、iNOS 陽性細胞のみられる血管の数は $15 \pm 5 / 1$ 視野で陽性率は 60% に低下していた。次に、正常部位では、iNOS 陽性細胞の血管の数は $7 \pm 2 / 1$ 視野で、陽性率は 30% である。

このことより iNOS 陽性の血管数は、活動部位に増加しているといえる。

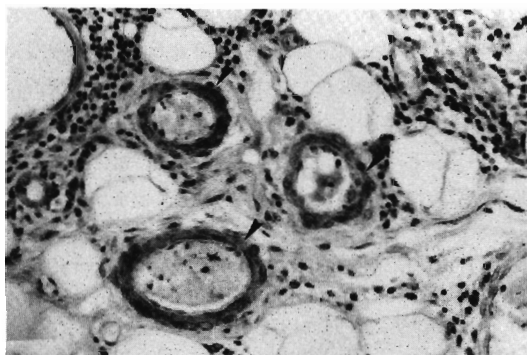


図9 UC活動部で中心部の矢印で示した血管内皮および血管平滑筋にiNOSの発現が認められる(100倍)。

UC患者の活動部位の潰瘍周囲の消化管の固有筋層全体にiNOSが弱陽性に発現した(図7矢印)。非活動部位も固有筋層はiNOSが弱陽性であった。正常部位での消化管平滑筋にはほとんど発現がみられなかった。

6. 他の病態として ischemic colitis での検討

Ischemic colitis におけるiNOS陽性細胞と他のマーカーとの比較検討を行った。

浮腫状変化のみられる粘膜下層のマクロファージ、好中球と線維芽細胞にiNOS発現が高頻度に認められた。粘膜下層での増生・拡張した毛細血管の大部分に、iNOS発現が認められた。しかし、表層粘膜はiNOS発現がほとんど認められなかった。

考 察

NOは、一酸化窒素合成酵素(NOS)により、基質であるL-arginineがL-citrullineに代謝される際に産生される¹⁶⁾。NOSは、cNOSとiNOSに大別される¹⁶⁾。血管内皮、小脳が代表的な発現部位であるcNOSは細胞内に常に存在し活性発現には、アゴニストを必要とし短時間作用する。これに対し、マクロファージ、白血球が代表的な発現部位であるiNOSは、生理的状态では殆ど存在しない。IL-1 β 、TNF- α 、INF- γ などのサイトカインやリポポリサッカライド等の刺激により細胞が活性化されると細胞質内にiNOSが合成される²⁸⁾。これらのサイトカインの刺激を受けている

ときには、主にiNOSを経由しNOが発生される²⁹⁾。

発生したNOは、周囲のH₂Oと反応し、数秒でNO₂⁻、NO₃⁻の形となり安定化する。そのため、これまでは代謝産物であるNO₂⁻、NO₃⁻やL-citrullineを測定し、間接的な方法でNOの生成が示されてきた¹⁹⁾。これらを用い測定した結果、活動期の患者血漿では、非活動期の患者血漿に比べ有意に高く、UCの活動性とNO₂⁻、NO₃⁻値に相関がみられた。これはNO産生増加が血漿中に反映していると考えられる。

酵素組織学的検討では、NADPH-diaphoraseでNOSの局在は解明されつつあるが³⁰⁾、恒常的に存在するcNOSも検出するため、大部分のNOを生成しているiNOSの分布はわかっていない。ヒトにおいてUCでのiNOSの分布、局在を示した報告は著者が文献上収集したものでは皆無であり、そのため、我々はヒトの抗iNOS抗体を作製し、本研究で初めて免疫組織学的に局在を示した。

iNOSのWestern blottingでは、130kDにbandを認めた。鑑別するものとしてnNOSとeNOSがある。我々が用いたヒトiNOSのC末端側14アミノ酸はnNOSおよびeNOSと同じアミノ酸配列は認めなかった。nNOSは分子量が155kDであり、Western blottingで155kDにbandを認めなかった。また、iNOSは神経繊維に発現されなかった。eNOSは血管内皮のみに発現し細胞質顆粒に局在するといわれているが、iNOSでは血管内皮だけでなく、血管平滑筋、マクロファージや白血球に認められ、iNOSは胞体内にdiffuseに認められcytosolに一致した。以上からiNOSの特異性が確認された。

UCの活動部位の潰瘍部に多数のiNOS陽性細胞がみられ、それは形態的特徴および種々の抗血清を用いた免疫組織化学的検討により、マクロファージ、線維芽細胞および好中球であることが示された。

一方、非活動部位の腸管には、iNOS陽性細胞が著明に減少していた。CD68陽性細胞は、活動部位に比べ、非活動部位で減少していたが存在は認められた。CD68は、主にマクロファージ、線維芽細胞

胞で陽性になることから、非活動部位では活動部位と同様にマクロファージ、線維芽細胞が存在するが、iNOSは殆ど発現してはいないと考えられた。

これらのことから、UCの活動性とiNOS発現との相関が示唆された。UCの活動部位の潰瘍部に多数のiNOS陽性細胞がみられる理由として、潰瘍周囲に集簇してくるマクロファージや好中球がIL-1 β やTNF- α 等を産生し、これらの刺激により大量のiNOSが誘導されるためと考えられる。その結果、局所で産生されるNOが周囲の正常組織にも傷害を起こす可能性が示唆される。

炎症性腸疾患モデルであるtrinitrobenzene sulfonic acid大腸炎ラットにおいてNO合成阻害剤が炎症を軽減すること³¹⁾、また、iNOSの活性を抑制することが報告されているステロイド剤が、UC患者の腸管の炎症の抑制に有効であることから、NOが組織傷害的に働くことが示唆されている。しかし、ステロイド剤の長期投与は重篤な副作用の発現が問題となるため、今後、より特異的なiNOSの阻害剤がUCの治療薬になる可能性が考えられる。

血管では、活動部位の潰瘍部にみられるマクロファージ、好中球等のiNOS陽性細胞の分布と異なり、活動部位のみならず、非活動部位にも拡張した血管にiNOSの発現が認められた。正常と思われる部位でも、血管に低頻度ではあるが、iNOS陽性細胞が認められた。この分布よりNOが血管に作用し、NOのセカンドメッセンジャーcGMPを介して血管平滑筋を弛緩させることから血流を増やし³²⁾組織に対する酸素の供給が増加し、組織へ保護的に作用をしているのではないかと推測される。

以上より、UCにおけるNOの発現は、一方で炎症の活動性を高めて組織傷害的に作用していると考えられるが、他方で局所における血流を増加させ組織修復的に作用していると考えられる。

稿を終えるに当たり、懇切な御指導を賜りました本学第二病理学教室西川俊郎助教授、石山 茂先生、消化器病センター内科光永 篤助手、長廻 紘助教授、

飯塚文瑛助手、第三外科学教室小篠 栄講師、標本を提供して下さった第二外科学教室亀岡信悟助教授に深謝いたします。また、仕事を支えて下さった深沢哲雄主任技師に感謝いたします。御校閲をしていただきました消化器病センター内科林 直諒教授と第二病理学教室笠島 武教授に感謝の意を表します。

文 献

- 1) **Watt J, Marcus R**: Experimental ulcerative disease of the colon. *Methods Achiev Exp Pathol* 7: 56-71, 1976
- 2) **Vander WKJ, Winkler KC**: The faecal flora in ulcerative colitis. *J Med Microbiol* 8: 491-501, 1975
- 3) **Keighly MRB, Arabi Y, Dimock F**: Influence of inflammatory bowel disease on intestinal microflora. *Gut* 19: 1099-1104, 1976
- 4) **Dickinson RJ, Varian SA, Cooke EM**: Increased invasive properties in patients with ulcerative colitis. *Gut* 21: 787-792, 1980
- 5) **Bookman MA, Bull DM**: Characteristics of isolated intestinal mucosal lymphoid cells in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 77: 503-510, 1980
- 6) **Bland PW, Richens ER, Lloyd JV**: Isolation and purification of human large bowel mucosal lymphoid cells: Effect of separation technique on functional characteristics. *Gut* 20: 1037-1046, 1979
- 7) **Perlman P, Broberger G**: In vitro studies of ulcerative colitis. II. Cytotoxic action of white blood cells from patients on human fetal colon cells. *J Exp Med* 117: 717-733, 1963
- 8) **Kemler BJ, Alpert E**: Inflammatory bowel disease: Study of cell-mediated cytotoxicity for isolated human colonic epithelial cells. *Gut* 21: 353-359, 1980
- 9) **Kirsner JB, Shorter RG**: *Inflammatory Bowel Disease* 2nd ed. Lea & Febiger, Philadelphia (1975)
- 10) **Lipkin M, Bertio JR**: Cell proliferation kinetics in the gastrointestinal tract of man. Cell renewal in colon and rectum. *J Clin Invest* 42: 767-784, 1963
- 11) **Aiki K**: A study of endotoxemia in ulcerative colitis and Crohn's disease, a clinical study. *Acta Med Okayama* 32: 147-158, 1978
- 12) **Gardiner KR, Barclay GR, McCaigue MD**: Endotoxin, tumor necrosis factor and anti-core glycolipid antibodies in inflammatory bowel disease. *Br J Surg* 78: 1488A, 1991
- 13) **MacDonald TT, Hutching P, Choy MI et al**:

- Tumor necrosis factor and interferon-gamma production measured at the single level in normal and inflamed human intestine. *Clin Exp Immunol* 81 : 301-305, 1990
- 14) **Ligumsky M, Simon PL, Karmeli F et al** : Role of interleukin 1 in inflammatory bowel disease during active disease. *Gut* 31 : 686-689, 1990
 - 15) **Moncada S, Palmer RMJ, Higgs EA** : Nitric oxide : Physiology, and pharmacology, *J Pharmacol Exp Ther* 243 : 109-142, 1991
 - 16) **Lancaster RJ** : Nitric oxide in cells. *Am Sci* 80 : 248-259, 1992
 - 17) **Salter M, Knowles GR, Moncada S** : Widespread tissue distribution and changes in activity of Ca^{2+} -dependent and Ca^{2+} -independent nitric oxide synthases. *FEBS Lett* 291 : 145-149, 1992
 - 18) **Grisham MB, Yamada T** : Neutrophils, nitrogen oxides, and inflammatory bowel disease. *Ann N Y Acad Sci* 664 : 103-115, 1992
 - 19) **Middleton SJ, Shorthouse M, Hunter JO** : Increased nitric oxide synthesis in ulcerative colitis. *Lancet* 341 : 465-466, 1993
 - 20) **Tran DD, Visser JJ, Meuwissen I** : Enhanced systemic nitric oxide production in inflammatory bowel disease. *Lancet* 341 : 1150, 1993
 - 21) **Sherman PA, Laubach EV, Wood RE** : Purification and cDNA sequence of an inducible nitric oxide synthase from a human tumor cell line. *Biochemistry* 32 : 11600-11605, 1993
 - 22) **Towbin HT, Staehelin T, Gordon J** : Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets : Procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA* 76 : 4350-4354, 1979
 - 23) **Pulford KAF, Rigney EM, Gatter KC** : KP1 : A new monoclonal antibody that detects a monocyte/macrophage associated antigen in routinely processed tissue sections. *J Clin Pathol* 42 : 414-421, 1989
 - 24) **Bhoopawt L, Turner RR, Epstein LA** : Immunohistochemical characterization of two new monoclonal antibodies reactive with human macrophage subsets and derived malignancies in B5-fixed, paraffin-embedded tissues. *Blood* 71 : 1079-1085, 1988
 - 25) **Baek KJ, Thiel BA, Stuehr DJ** : Macrophage nitric oxide synthase subunits. *J Biol Chem* 268 : 21120-21129, 1993
 - 26) **Bredt SD, Hwang MP, Snyder HS** : Cloned and expressed nitric oxide synthase structurally resembles cytochrome P-450 reductase. *Nature* 351 : 714-718, 1992
 - 27) **Marsden AP, Schappert TK, Michel T** : Molecular cloning and characterization of human endothelial nitric oxide synthase. *FEBS Lett* 307 : 287-293, 1992
 - 28) **Nathan C** : Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *FASEB J* 6 : 3051-3064, 1992
 - 29) **Hubert K, Victoria KB** : Nitric oxide : A pathogenetic factor in autoimmunity. *Immunol Today* 13 : 157-160, 1992
 - 30) **Bredt SD, Glatt EC, Snyder HS** : Nitric oxide synthase protein and mRNA are discretely localized in neuronal populations of the mammalian CNS together with NADPH diaphorase. *Neuron* 7 : 615-624, 1991
 - 31) **Miller JSM, Kakkis LJ, Clark AD** : Amelioration of chronic ileitis by nitric oxide synthase inhibition. *J Pharmacol Exp Ther* 264 : 11-16, 1993
 - 32) **Derrice P, Kubes P** : Nitric oxide donors reduce the rise in reperfusion-induced intestinal mucosal permeability. *Am J Physiol* 265 : G189-G195, 1993