

原 著

## 一酸化窒素 (NO) の中枢神経内での作用部位の検討

## —特に中枢性循環調節作用との関連について—

東京女子医科大学 医学部 第二内科学教室 (主任: 出村 博教授)

チカダ ナオコ イマキ トシヒロ ナルセ ミツヒデ デムラ ヒロシ  
近田 直子・今城 俊浩・成瀬 光栄・出村 博

(受付 平成10年11月13日)

**Analysis of the Sites of Action of Nitric Oxide (NO) in the Central Nervous System :  
Its Relationship to Central Regulation of Cardiovascular Function****Naoko CHIKADA, Toshihiro IMAKI, Mitsuhide NARUSE and Hiroshi DEMURA**

Department of Medicine II (Director: Prof. Hiroshi DEMURA)

Tokyo Women's Medical University, School of Medicine

Although nitric oxide (NO) is involved in regulation of the cardiovascular, neuroendocrine, and autonomic system via the central nervous system, its specific sites of action in the brain have not been determined. To clarify the effect of NO in the central nervous system, we injected NO-releasing compounds and NOS inhibitors into the brains of conscious, freely moving rats and measured its effect on mean arterial blood pressure (MAP) and heart rate (HR), as well as on expression of *c-fos* mRNA, an immediate-early gene used to identify neurons affected by environmental stimuli, and NADPH-diaphorase, an indicator of NOS activity. Intracerebroventricular (icv) administration of the NO donors, 1  $\mu$ mol of sodium nitroprusside (SNP), and NOC-18, caused a significant fall in MAP and HR. In contrast, the NOS inhibitor, N<sup>G</sup>-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME), induced a significant rise in MAP when administered either intravenously or intraventricularly. The centrally administered NO donors SNP and NOC-18 induced *c-fos* mRNA expression in several regions of the brain primarily involved in the baroreceptor response, as well as regions of the brain involved in the integration of autonomic, neuroendocrine, and behavioral responses. Most of the areas that expressed *c-fos* also stained for NADPH-d. These results suggest that NO acts directly in the brain to reduce the systemic blood pressure, and that the endogenous NO pathway may play a role in cardiovascular and autonomic regulation by modulating neuronal activity in discrete regions of the brain.

## 緒 言

一酸化窒素 (NO) は気体状の神経情報伝達物質で、血管拡張、腸管の弛緩、勃起、マクロファージの細胞毒性などの生理作用をもつ他、中枢神経系内ではシナプス可塑性や神経毒性に関与していることが知られている<sup>1)</sup>。NOは血管のトーンス

の調節に重要な役割を果たしており、血管内皮細胞由来血管弛緩因子 (EDRF) であると考えられているが、中枢神経組織内では神経情報伝達物質として作用していることが、近年になり明らかとなった。

NOは中枢神経内に作用して、循環調節、神経内

分泌調節, 自律神経調節などに重要な役割を果たしていることが知られている。NOは血管拡張作用など末梢組織での循環調節作用がまず注目されたため, NOが中枢にも作用して心血管系の調節に関与している可能性を示唆する報告は多い。

Cabreraらは, NO供与体であるsodium nitroprusside (SNP)やNO合成促進物質を脳室内に投与すると, 血圧が下降し, 逆にNO合成酵素(NO synthase: NOS)阻害剤であるN<sup>G</sup>-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME)を脳室内投与すると, 血圧が上昇することを報告している<sup>2)</sup>。

また, これらの薬物を, 孤束核(NTS), 腹外側延髄(RVLM, CVLM), 室傍核(PVN)などの脳の特定の部位に直接微量投与することにより, NOがこれらの部位に作用して, 血圧を調節していることも示されている<sup>3)</sup>。例えば, NO供与体であるSNPを孤束核へ投与すると, 血圧低下や徐脈を引き起こす一方<sup>4)~6)</sup>, NO合成酵素阻害剤を孤束核へ投与すると, 血圧の上昇と腎臓の交感神経活動の増加が生じる<sup>7)~9)</sup>。

また, NO供与体の視床下部への投与が, 血圧を下げる実験結果より, 視床下部もNOの作用部位ではないかと予想されている<sup>3)</sup>。しかし, NOの心血管作用に重要な役割を担っている脳の部位や, 神経回路に関しては, まだ不明の点が多く残されている。

近年, *fos*などのいわゆる最初期遺伝子(immediate early genes: IEGs)を神経細胞の活動の指標として用いる手法により, 中枢神経内での神経情報伝達物質の作用部位の同定がin vivoで比較的容易に行えるようになった<sup>10)~12)</sup>。これまで, corticotropin-releasing factor (CRF)<sup>13)14)</sup>,  $\beta$ -endorphin<sup>15)</sup>, angiotensin-II<sup>16)17)</sup>などの神経ペプチドの脳室内投与後の*c-fos* mRNAやFos蛋白の発現を解析することにより, これらの物質が中枢神経内で作用する神経核や, 神経回路網を同定できることが証明されている。

今回の研究の目的は, 中枢神経内でNOが心血管系にどのような作用を示すかを明らかにし, さらにNOが中枢神経内でどの部位に作用するかを同定することである。このため, まずNO供与体

とNO合成酵素阻害剤をラットの脳室内に投与し, 血圧と心拍数の変化を無麻酔無拘束の状態で記録した。NO供与体としてはSNPとNOC-18を用いた。SNPは, シアン化物を含有するため, 中枢投与では非特異的な毒性効果を引き起こす可能性もあることから, NOC-18を追加して用いた。NOC-18は, pH 7.4, 37°Cの条件で, 純粋なNO分子のみを遊離しその半減期は78分と長く<sup>18)19)</sup>, 他の代謝産物の産生を伴わないことから, NO分子そのものの作用を評価できる優れたNO供与体である<sup>20)</sup>。

次に, NOの脳内作用部位を同定するために, *c-fos*プローブを用いたin situ hybridizationを行い, NO供与体投与後の*c-fos* mRNAの脳内での発現の分布を解析した。更に, NOS活性の指標として用いられているNADPHジアホラーゼ(NADPH-d)染色を行い<sup>21)</sup>, *c-fos* mRNAとNOS活性の分布を比較し, 内因性のNOが直接*c-fos* mRNAの発現部位に働く可能性があるか否かを検討した。

## 対象および方法

### 1. 対象

実験には180~500gのWistar系雄ラットを用いた。以下のすべての実験は東京女子医科大学の動物実験倫理委員会の承認を得たうえで行った(96-23)。

各々の実験のおよそ2日前に, ペントバルビタール(50 mg/kg)麻酔下で, 既報の方法で右側脳室にポリエチレンガイドカニューレ(SP-45 polyethylene tube, 夏目製作所, 東京)を挿入した<sup>14)</sup>。また, ポリエチレンカテーテル(PE-50, Clay Adams, Parsippany, NJ)に医療用シリコンチューブ(Silastic medical tube: SH No. 1)を接続して作製した動脈カニューレを, 左内頸動脈から下大動脈に挿入し, カニューレのもう一方の先端を皮下トンネルを通してラットの頸部背側より外側に露出した<sup>22)</sup>。静脈内に薬物を投与する実験では, 左内頸動脈に動脈カニューレを挿入後, 左内頸静脈にカニューレ(小児用カテーテル3.6Fカネカメディックス, 東京)を挿入した。血栓による閉塞を予防するため, 動脈・静脈カニューレは, ヘパ

リン入り生理食塩水で毎日洗浄した。また、実験操作による非特異的なストレス反応を最小限にするため、毎日約4分間ラットを保持し、操作に慣れさせた。

実験当日、まず動脈カニューレを動脈測定用トランスデューサーとポリグラフ (RM-6100, 日本光電, 東京) に接続した<sup>22)</sup>。次に、10  $\mu$ l のマイクロシリンジ (Hamilton, Nevada, USA) に脳室内投与用チューブ (SP-10 polyethylene tube, 夏目製作所) をつなぎ、脳室ガイドカニューレに接続した<sup>15)</sup>。平均動脈圧 (MAP) が安定した後、1  $\mu$ mol の NOC-18 (同仁化学, 東京), SNP, L-NAME (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) を 5  $\mu$ l の生理食塩水に溶解し、1分間かけて脳室に投与した。溶液の逆流を防ぐため、さらに1分間チューブを脳室ガイドカニューレに接続したまま放置した。同量 (5  $\mu$ l) の生理食塩水を投与した群を対照とした。MAP と心拍数 (HR) は、脳室内投与後 30 分間、5 分毎に記録した。実験終了後、5  $\mu$ l のメチレンブルーをガイドカニューレを通して脳室内投与し、5 分後に断頭し、脳を冠状断で切断し、染色部位を検索した。側脳室、第 3 脳室、中脳水道、第 4 脳室すべてが染色されているラットのみを分析に用いた。

静脈カニューレを挿入したラット群には、L-NAME (185 mmol/kg) を 10 分間かけて静脈内投与し、血圧、心拍数を同様に記録した。

## 2. In situ hybridization

In situ hybridization は既報の方法で行った<sup>15)23)</sup>。NOC-18, SNP をラット脳室内に投与 30 分後、50 mg/kg のペントバルビタールで深麻酔し、0.1 M の硼酸緩衝液に溶解した 4% パラフォルムアルデヒド (pH 9.5) 溶液で経心臓的に灌流固定した。取り出した脳は、20% 蔗糖を加えた 4% パラフォルムアルデヒド液で 4°C 2 日間浸透固定した。脳は凍結し、クリオスタットで 20  $\mu$ m の厚さの脳切片を作製し、シラン処理をしたスライドガラス (Matsunami, 東京) にのせ、室温で一昼夜乾燥させた。

切片は、proteinase K (10 mg/ml, 37°C 30 分) で処理した後、アセチル化し、脱水した。真空乾燥

後、<sup>35</sup>S でラベルした *c-fos* cRNA プローブを含む hybridization 液 (10<sup>6</sup> cpm/ml, 10 mM dithiothreitol: DTT) 90  $\mu$ l をスライド上の切片が完全に覆われるように滴下し、カバーガラスで封入した後、65°C で一昼夜 incubation を行った。incubation 後カバーガラスをはずし、切片は 4×SSC (1×SSC: 15 mM trisodium citrate buffer, pH 7.0/0.15 M NaCl) で室温で洗浄した。更に切片を、RNAase A (20 mg/ml, 37°C 30 分) で処理し、0.1×SSC で 65°C 30 分間洗浄した。切片はアルコール脱水後、Kodak XAR-5 フィルムに 4°C で 7~14 日間露出し、その後、写真乳剤 (Kodak NTB 2 emulsion, 温水で 1:1 に溶解) に浸し、21~42 日間露出後、現像した。切片はチオニンで対比染色 (ニッスル染色) をした。また、*c-fos* mRNA を発現している神経核をより正確に同定するため、連続切片を in situ hybridization を行わずにニッスル染色した。

## 3. プローブラベリング

ラット *c-fos* cDNA (2 kb, Dr. Inder Verma より提供) の *Eco* RI fragment は、p-Bluescript SK-1 (Stratagene, La Jolla, CA) にサブクローニングし、*Bam* HI でリニアライズした。放射性 antisense cRNA は、36 mM Tris-HCl (pH 7.5), 6 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 mM spermidine, 8 mM DTT, 25 mM ATP/GTP/CTP, 5 mM unlabeled UTP, ( $\alpha$ -<sup>35</sup>S) UTP, 1 U RNAsin (Promega, Madison, WI, USA) に 0.1  $\mu$ g のプラスミドおよび T7 RNA polymerase を加え、60 分間 37°C で反応させた。sense probe は T3 RNA polymerase を用いて合成した。各々のプローブ (1.0×10<sup>8</sup> cpm/ml) はレジカラム (Nensorb 20, NEN, Wilmington, USA) で精製した<sup>15)</sup>。

## 4. NADPH-d 染色

In situ hybridization を行った切片に隣接した組織を用い、スライド 1 枚あたり 400  $\mu$ l の KPBS (0.02 M リン酸カリウム緩衝液; pH 7.4, 0.02 M K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.02 M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.9% NaCl)/0.3% Triton X-100 に 2 mg/ml NADPH (Sigma Chemical Co. 前出省略), 0.9 mg/ml nitroblue tetrazolium (Sigma Chemical Co.) を加えた溶液を、切片が完全に覆われるように滴下した<sup>24)</sup>。42°C で 2 時間イ

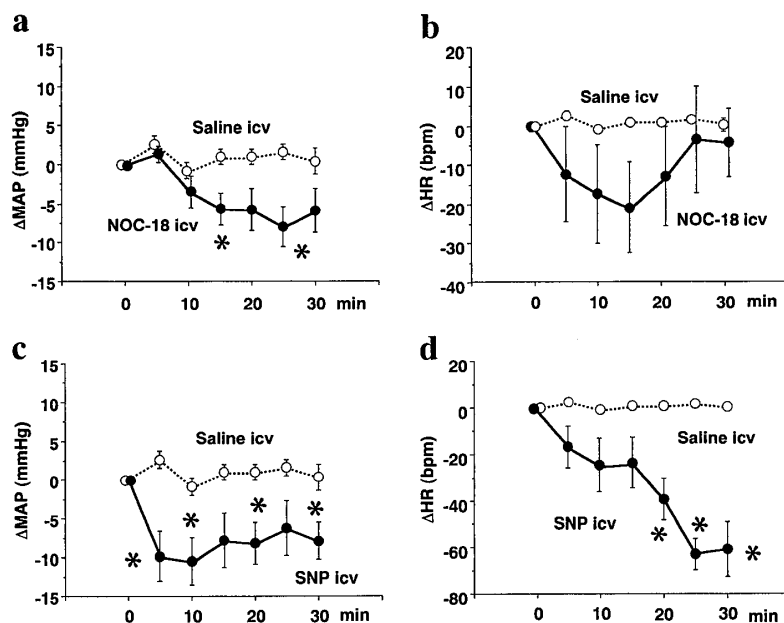


図1 NO 供与体  $1 \mu\text{mol}$  脳室内投与後の平均動脈血圧 ( $\Delta\text{MAP}$ ) と心拍数の変化 ( $\Delta\text{HR}$ )

NOC-18 (a, b), SNP (c, d) 投与後の  $\Delta\text{MAP}$  (a, c) と  $\Delta\text{HR}$  (b, d),

\* :  $p < 0.05$  vs 生理食塩水投与群.

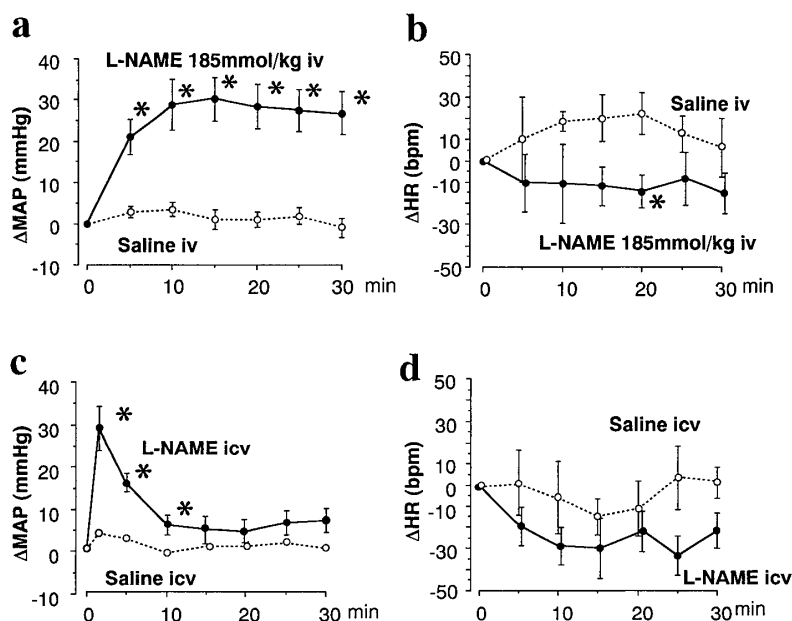


図2 L-NAME (185 mmol/kg) の静脈内投与 (a, b) と L-NAME  $1 \mu\text{mol}$  の脳室内投与後 (c, d) の  $\Delta\text{MAP}$  (a, c) と  $\Delta\text{HR}$  (b, d)

\* :  $p < 0.05$  vs 生理食塩水投与群.

ンキュベートした後、切片は蒸留水で洗浄し、エタノール脱水を行った。

## 5. 統計処理

結果はすべて平均値  $\pm$  SE で表した。有意差検定

は一元分散分析で行った後、Fisher の protected least significance difference で危険率 5% 以下の場合、有意差ありとみなした (Stat View 4.1)。

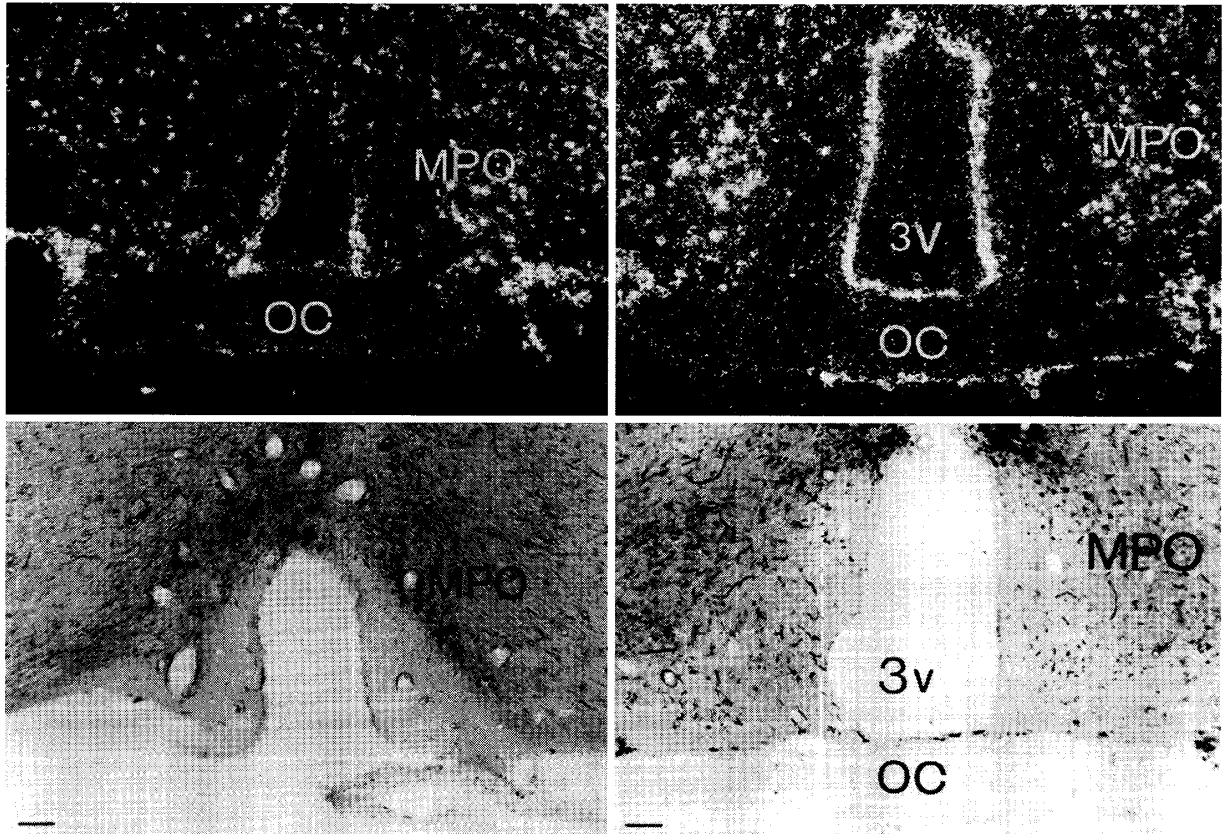


図3 視索前野(MPO)のレベルでのNOC-18脳室内投与後の*c-fos* mRNA発現の暗視野顕微鏡写真(上段)とNADPH-d染色(下段)  
*c-fos* mRNAはMPO全体に分布し、一部終板器官(OVLT)organum vasculosum of the lamina terminalis)近傍にも発現していると考えられる。また同部位にNADPH-d染色陽性の神経細胞体と神経線維が見られる。左図は視床下部の吻側寄り、右図はそれよりやや尾側寄りである。Bar = 100  $\mu$ m, 露出期間は4週間, 3v: 第3脳室, OC: 視交叉。

## 結 果

### 1. NO供与体投与後の平均動脈圧と心拍数の変化

NOC-18 (1  $\mu$ mol)の脳室内投与は、平均動脈圧(MAP)を徐々に減少させ(図1a)、同時に心拍数(HR)も減少させた(図1b)。MAPは15分後と25分後で、有意な減少が認められた。一方、HRは対照群と比較し、有意差は見られなかった。

もう一種のNO供与体であるSNP(1  $\mu$ mol)は、NOC-18よりも血圧降下作用はより強力であり、その効果も持続した。SNP投与後5分以内に急速にMAPが下降し、投与30分後においても血圧は前値まで回復しなかった。MAPは対照群と比較して、5、10、20、30分後で有意差が認められた(図1c)。SNP投与群では、HRも投与20~30分後ま

で有意に減少した(図1d)。

一方、NO合成阻害剤であるL-NAME(1  $\mu$ mol)の脳室内投与では、投与後5分以内に急峻にMAPは上昇したが、HRは有意な変化は認められなかった(図2c, d)。L-NAME(185 mmol/kg)の静脈内投与では血圧は有意に上昇したが、脳室内投与ほど急激な変化は認められなかった(図2a, b)。

### 2. NO供与体脳室内投与後の*c-fos* mRNAの脳内分布：NADPH-d染色との比較

生理食塩水投与群(対照群)の脳にはほとんど*c-fos* mRNAの発現は認められなかった。NOC-18とSNP投与群の間に*c-fos*の発現に差はなかったので、代表的な写真を図3~図9に示した。また、senseプローブでは有意なシグナルは検出されな

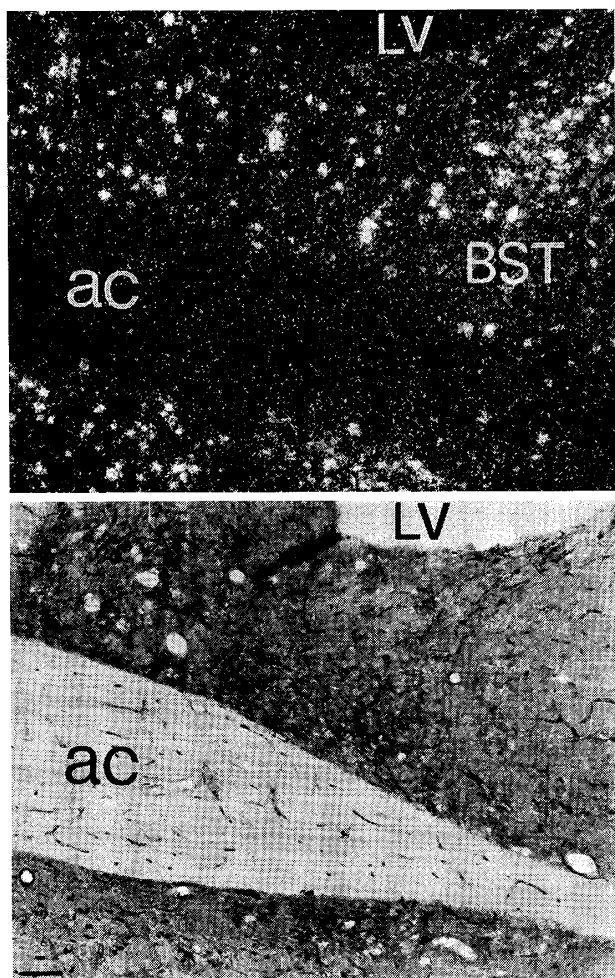


図4 視床下部前方冠状断における NOC-18 脳室内投与後の、分界条床核 (BST) での *c-fos* mRNA の分布 (上段): *c-fos* 陽性細胞が、背側から腹側の BST を通じて見られる。最も強く発現するニューロンは、側脳室 (LV) と前交連 (ac) との間 BST 背外側部 (dorsolateral BST) に見られた (下段): NADPH-d 陽性ニューロンは BST 背外側部に散在して認められる。Bar = 100  $\mu$ m.

かった。NADPH-d 染色で染まる程度は対照群と NOC-18 投与群あるいは SNP 投与群の間に差は認められなかった (図省略)。

NOC-18 投与後、視索前野 (MPO) 全般にわたって *c-fos* mRNA の発現増加が見られた (図3)。また、一部分終板器官 (OVL) 近傍にも *c-fos* mRNA 陽性細胞が見られた (図3)。MPO では、NADPH-d 陽性の神経細胞体と神経線維が散在していた (図3)。

分界条床核 (BST) では、特に背外側部位 (dorsolateral BST) に *c-fos* mRNA を発現する細胞が

多数認められた (図4)。NADPH-d 染色でも、BST のこの部位に中等度の陽性神経細胞が見られ、神経線維叢も若干認められた。脳弓下器官 (SFO) では、*c-fos* mRNA のシグナルは、全く認められなかった (図省略)。

視床下部では、NOC-18 脳室内投与後、室傍核 (PVN) の特に小細胞核群の内側部位に *c-fos* mRNA の著明な発現が見られた (図5)。更に大細胞核群や視索上核 (SON) にも、中等度の *c-fos* mRNA のシグナルが見られた。それに対し、NADPH-d 染色では、室傍核では大細胞核群の方が小細胞核群よりも陽性細胞が多く認められた。しかし小細胞核群でも一部 NADPH-d に染まる細胞があり、*c-fos* 陽性細胞も大細胞核群に少し認められ、両者は部分的ではあるが、共通した部位に発現していた。視索上核の神経細胞は NADPH-d に強く染色された (図5)。

扁桃核では、NOC-18 脳室内投与後、特に扁桃中心核 (CeA) で *c-fos* mRNA の発現が強く見られたが、NADPH-d 染色では、この部位はほとんど染まらなかった (図6)。むしろ内側核 (MeA) や、基底内側核 (BMA) の方が NADPH-d で強く染まった (図6)。

中脳と橋のレベルでは、NOC-18 脳室内投与後、青斑核 (LC) に *c-fos* mRNA の発現が見られた (図7)。これに対し、NADPH-d 染色ではこの部位には NOS 活性が全く認められなかった (図7)。

背側延髄では、SNP 脳室内投与後、孤束核 (NTS) のほぼ全体にわたって *c-fos* mRNA の発現が見られた。特に尾側の延髄では、*c-fos* mRNA の発現部位とほぼ同じ場所に強い NADPH-d 活性が認められた (図8)。終野 (AP) のレベルでは、*c-fos* mRNA は、特に孤束核交連部や孤束核内側部に強い発現が見られた。これらの部位では、NADPH-d 陽性線維は密に分布し、散在した NADPH-d 陽性神経細胞体と連絡していた。終野は、*c-fos* mRNA の分布が見られたが、NADPH-d では染まらなかった (図8)。

腹側延髄では、SNP 脳室内投与後、*c-fos* mRNA は、尾側の腹外側延髄 (CVLM) に発現が認められた (図9)。NADPH-d 染色では、この部位に散

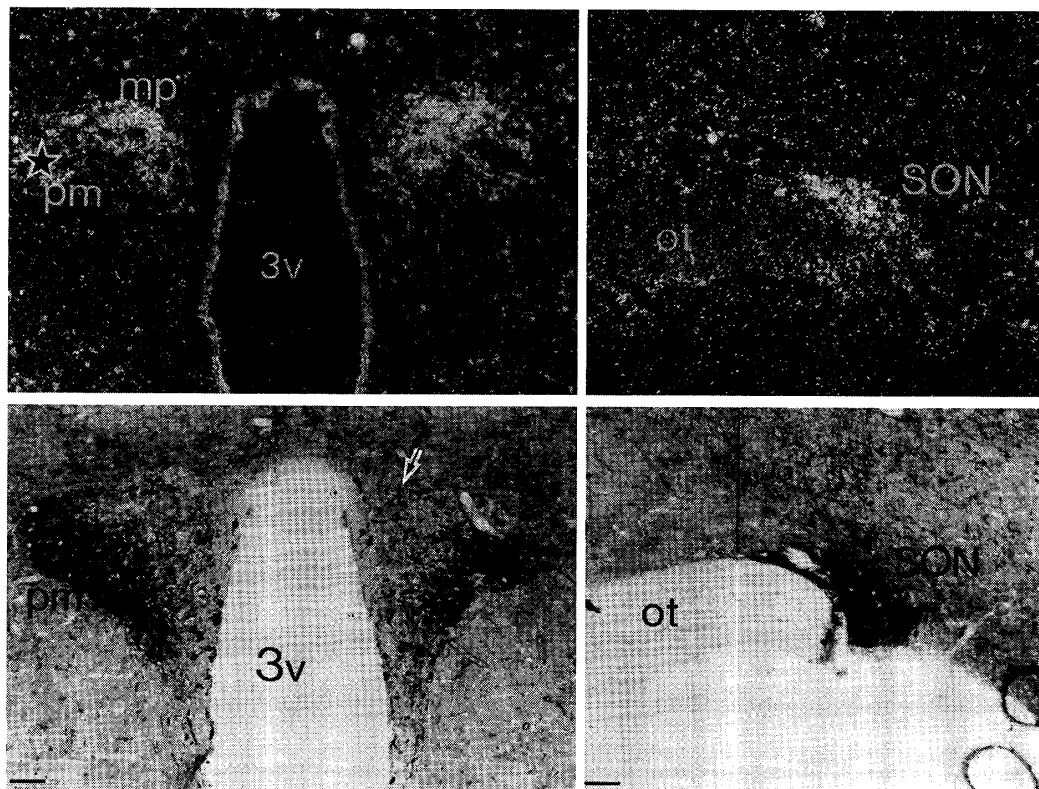


図5 NOC-18 脳室内投与後の室傍核 (PVN) (左) と視索上核 (SON) (右) 内の *c-fos* mRNA (上段) と NADPH-d 染色の分布 (下段)  
*c-fos* mRNA は主に内側小細胞核群 (mp) に発現しているが、後部大細胞核群 (pm) にも *c-fos* 発現が見られた(★). NADPH-d 陽性ニューロンは主に大細胞核群に分布し、小細胞核群の発現はそれより少なかった (矢印). 視索上核 (SON) では *c-fos* mRNA (右上) と NADPH-d 染色陽性細胞の分布 (右下) はほぼ同一であった. mp: 内側小細胞核群, pm: 後部大細胞核群, ot: 視索, Bar = 100  $\mu$ m.

在した神経細胞が陽性に染まっていた (図9). なお, NOC-18 投与群でも *c-fos* mRNA の発現の分布は同様であった.

### 考 察

NO は, 中枢神経系内において, 心血管系の調節に重要な役割を果たしていることが知られている. 本研究で我々は, SNP と NOC-18 という二種類の異なった NO 供与体の脳室内投与が, 血圧の下降と徐脈を引き起こす一方で, NO 合成阻害剤の L-NAME が血圧を上昇させることを示した. これらの結果は, NO が中枢神経に作用し, 降圧反応を引き起こすという従来報告と一致する<sup>2),4),7),25)</sup>. NO 合成阻害剤による血圧上昇は投与後5分以内という極めて早い時期に見られたため, 脳内で内因性に産生されている NO が血圧を常に下降させる方向に働いている可能性がある.

今回の *in situ hybridization* の実験結果は, 脳室内投与した NO 供与体が平均血圧を有意に低下させる量で, *c-fos* mRNA を脳内の特定の部位に発現させることを明らかにした. また, 無麻酔無拘束の条件下で, NO が中枢神経内で作用する一連の神経細胞群を同定することができた.

ある種の NO 供与体は, NO の遊離と関係のない非特異的効果を生じさせることがある<sup>20)</sup>. 今回の実験では, NO 供与体である NOC-18 と SNP の脳室内投与により, 心血管調節と関係のある脳の部位に *c-fos* の発現が認められ, かつ *c-fos* mRNA の分布は, NOC-18 投与群と SNP 投与群の間に相違は認められなかった. 従って今回の研究で見られた *c-fos* mRNA の発現はおそらく NO 自身によりもたらされたものと考えられる. 室傍核, 孤束核, 尾側腹外側延髄 (CVLM) 等に *c-fos*

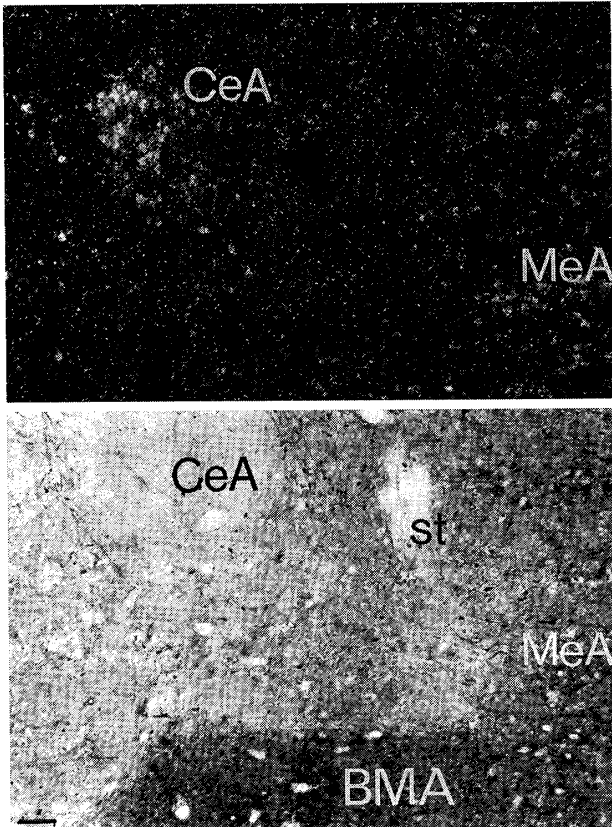


図6 NOC-18脳室内投与後の暗視野(上段)と明視野(下段)の顕微鏡写真における*c-fos* mRNAとNADPH-d染色陽性細胞の分布  
扁桃中心核(CeA)は*c-fos*プローブで強くラベルされたが(上段), NADPH-d染色では神経細胞も線維もほとんど染まらなかった(下段). 扁桃内側核(MeA)と扁桃基底内側核(BMA)はNADPH-dで強く染まった. st:分界条, Bar = 100  $\mu$ m.

mRNAの発現が誘導されたという今回の結果は, NOがこれらの部位に直接働き, 血圧を下降させたり, 交感神経系の活動を抑制するという従来の報告と一致している<sup>3)~5)7)26)</sup>. しかし, 脳の他の部位, 例えば視索前野/終板器官(MPO/OVLT), 分界条床核(BST), 視索上核(SON), 青斑核(LC)などが, NOの中樞神経作用に関連していることは今まで報告されておらず, 今回の研究ではじめて明らかになった事実である.

NOが*c-fos*遺伝子発現を導く分子生物学的メカニズムや, NOによる*c-fos*誘導の生理学的意義は明らかにされていない. NOは, 生体内では神経細胞の活動を抑制することが知られているが<sup>27)</sup>, 逆に神経細胞のカルシウムシグナルを増幅するこ

ともある<sup>28)</sup>. また, NOはある種の神経細胞由来の細胞株では, *c-fos*を含む最初期遺伝子(IEGs)の発現を刺激することが報告されている. 例えば, ラット褐色細胞腫由来のPC-12細胞や, 人の網膜芽細胞腫由来のY-79細胞では, SNPがサイクリックGMP(c-GMP)回路の刺激を通して*c-fos*や, *jun B*遺伝子の発現を誘導する<sup>29)</sup>. 更に, 線条体ニューロンにおいても, NOがプロテインキナーゼ依存性のc-GMPあるいはグアニレートサイクレス以外の経路を介して, *c-fos*や*zif/268*の発現を刺激しうることが最近明らかとなっている<sup>30)</sup>. また, NO合成阻害剤は, 拘束ストレス後の室傍核における*c-fos*の発現を減少させる<sup>31)</sup>.

以上のような研究報告と, NO供与体の脳室内投与が脳のさまざまな部位で*c-fos* mRNAの発現を誘導したという今回の実験結果とを合わせて考えると, NOが*c-fos*発現を刺激する物質であることが示唆される.

今回我々は, NOで賦活化される神経細胞群を*c-fos* mRNAの発現を指標として同定したが, この方法にはいくつかの潜在的な限界があげられる.

第一に, *c-fos*発現が認められた神経核の多く(視索前野/終板器官, 分界条床核, 室傍核, 青斑核, 終野/孤束核など)は, 脳室に隣接しているため, 脳室内投与したNO供与体が脳室系統を通じてこれらの部位に自由に拡散し, 直接神経細胞に働き*c-fos* mRNAの発現を誘導した可能性がある. 一方で, *fos*自身は二つ以上のシナプスを越えても発現しうるので<sup>32)</sup>, *c-fos* mRNA発現は別の脳の部位を通して間接的に誘導されるのかもしれない. 従って, 脳室に隣接した神経核での*c-fos*の発現がNOにより直接誘導されたものか, あるいは他の神経核を通して間接的に誘導されたものかは, 今回の実験方法では明らかにすることはできない. つまり, *c-fos*を指標とした手法では, NOの中樞投与によって影響をうけた一連の神経細胞や神経回路を同定できるが, NOが直接作用したか否かは明らかにできない欠点がある.

第二に, *c-fos*の発現の見られなかった領域がNOの中樞作用に関与していないとは言えない.



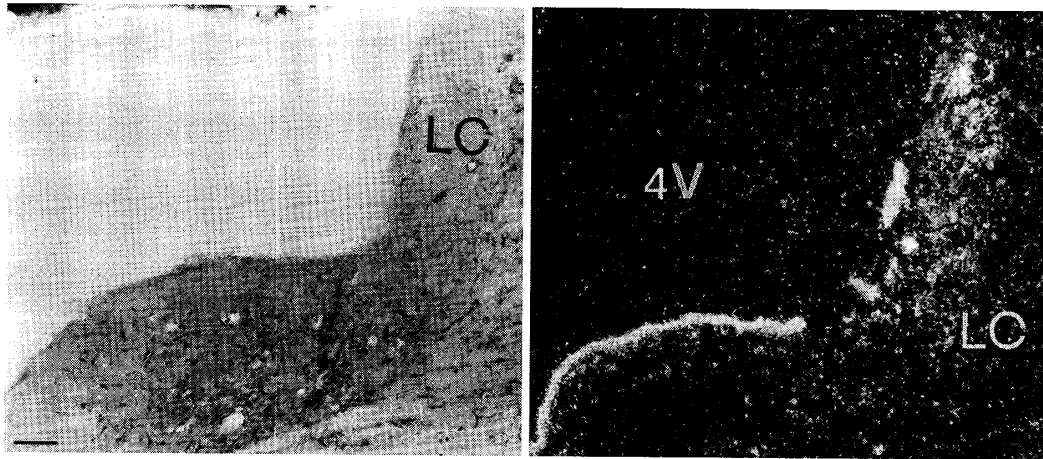


図7 NOC-18脳室内投与後の青斑核(LC)の*c-fos* mRNA発現(右)とNADPH-d染色の分布(左)  
*c-fos* mRNAはLCニューロンに強く発現したが(右), NADPH-d染色では神経細胞も神経線維も染まらなかった(左). Bar = 100  $\mu$ m.

例えば, 脳幹の圧受容体回路では神経活動を抑制する刺激伝達が重要であることが知られている<sup>33)</sup>. この場合には神経細胞の活動性はむしろ低下するため, *fos* の発現が起こらない可能性がある.

第三に, *c-fos* の発現とNOの特定の中枢作用とを結び付けることは不可能である. NOは中枢神経内でさまざまな役割を果たしており<sup>1)</sup>, NO供与体の脳室内投与後に*c-fos* mRNAが脳内で広く発現したことは, 心血管系, 自律神経系, 神経内分泌系も含めたNOの多彩な中枢作用を示唆するにすぎない.

我々は, 脳におけるNOS活性の指標として, NADPH-d染色を行ったが<sup>21) 34) 35)</sup>, その分布はこれまでの報告と一致している<sup>36) 37)</sup>. NO供与体の脳室内投与により*c-fos* mRNAが発現した部位はほとんどの場合, NADPH-dにも陽性に染色された. このような部位では内因性にNOが産生されることから, NOが直接作用している可能性がある. これとは対照的に, 青斑核(LC), 扁桃中心核(CeA), 終野(AP)などでは, NO供与体の脳室内投与後*c-fos* mRNAは発現したものの, NADPH-d陽性細胞や陽性神経終末はほとんど認められなかった. 一般的にNOは, 産生された細胞から約100  $\mu$ m程度拡散して, 隣接した細胞に影響を与えると考えられている<sup>38)</sup>. 従って,

NADPH-dに染まらない, 言い換えればNOS活性のない部位では内因性のNO産生はないと考えられ, NOは直接作用できないと考えられる.

ChanとSawchenkoは, 脱血やSNP静脈内投与により急激に全身血圧を低下させると, 脳内のさまざまな神経核にFos蛋白が発現したことを報告している<sup>39)</sup>. 平均血圧を30分以内に約50 mmHg低下させたとき, 延髄では1時間後, 橋では1.5時間後にFos蛋白の発現が誘導された. Krukoffらもまた, 平均血圧を45~50%下げることにより, 脳幹の神経細胞に多数の*c-fos*陽性細胞が発現することを報告した<sup>40)</sup>.

これに対し我々は, NO供与体脳室内投与後30分でさまざまな脳の部位に著明な*c-fos* mRNAの発現を検出したが, NOC-18の場合平均血圧は, 15分後と25分後のみ有意に下降し, その程度も対照群と比較し, わずか8 mmHgであった. 従って, 我々が観察した*c-fos*の発現が, NO供与体投与後の血圧低下による2次的な結果とは考えにくい. むしろ, *c-fos* mRNAの発現は, NO供与体自身の神経細胞に対する作用を反映していると思われる.

今回の研究で, *c-fos*の発現を認めた神経核のうち, 孤束核(NTS)と腹外側延髄(VLM)は, 圧受容体反射の一次中枢である. NTSは, 動脈圧受容体, 化学受容体, 心肺の受容体, 他の内臓の受

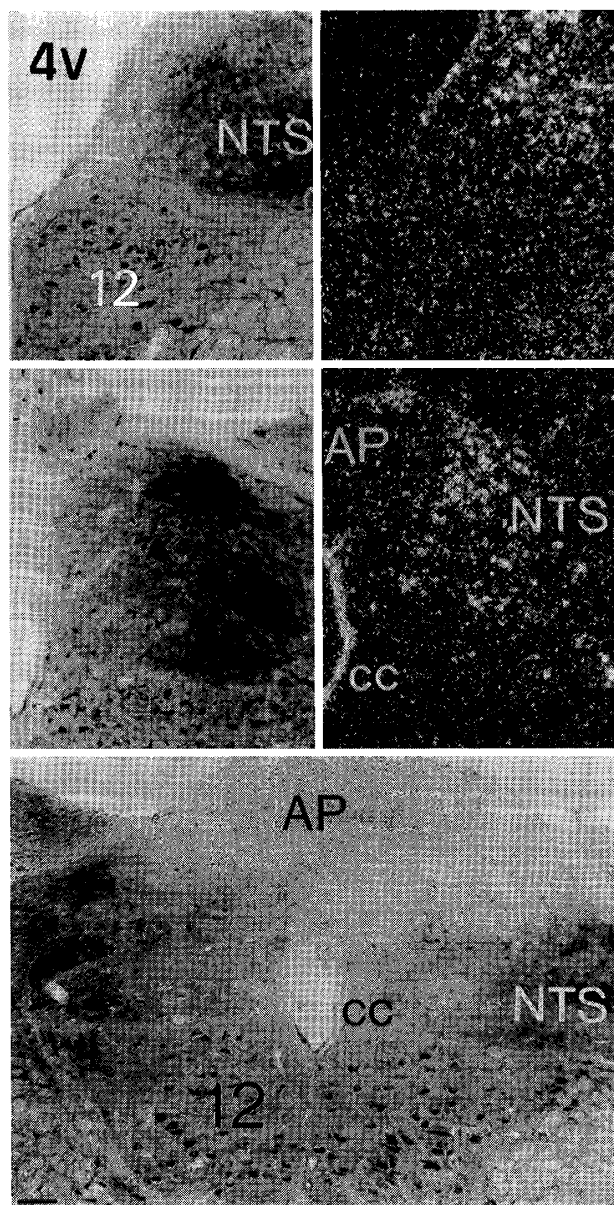


図8 SNP脳室内投与後の孤束核吻側寄り(上段), 終野(AP)レベルの孤束核尾側寄り(中段)における*c-fos* mRNA(右)とNADPH-d染色(左)の分布。*c-fos*およびNADPH-d染色は主に孤束核内側部で発現した。APは*c-fos*プローブで陽性にラベルされたが(中段右), NADPH-dでは染まらなかった(下段)。NTS: 孤束核, AP: 終野, 12: 舌下神経, cc: 中心管, 4v: 第4脳室, Bar = 100  $\mu$ m.

容体から登上してくる求心性線維が最初のシナプスを形成している部位で, 心血管系の自律神経調節に重要な役割を担っている<sup>41) 42)</sup>。NTSへのL-arginine (L-Arg)の微量投与は, 容量依存性の降圧や徐脈を引き起こし, 腎交感神経活動を抑制することが知られており, NTSではL-ArgはNOS

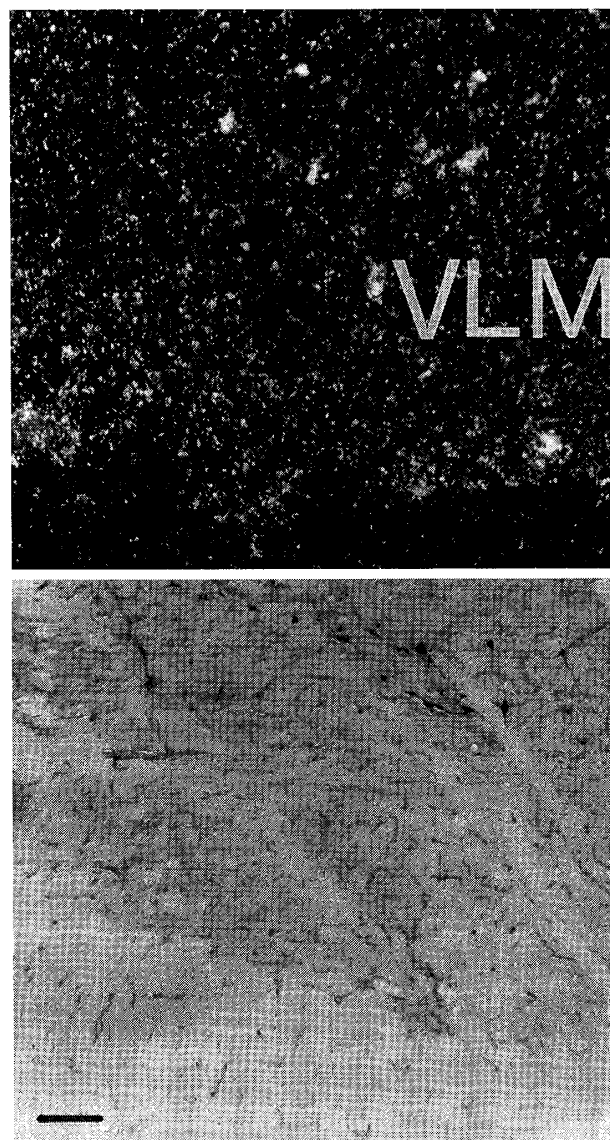


図9 SNP脳室内投与後の腹外側延髄(VLM)における*c-fos* mRNA(上段)とNADPH-d染色(下段)の分布  
Bar = 100  $\mu$ m.

の作用でNOに変換されることも示唆されている<sup>9)</sup>。さらに, Tagawaらは最近, NTSではc-GMPの増加を介して, NOが隣接したニューロンの神経活動を亢進させることを報告した<sup>26)</sup>。これとは逆に, N<sup>G</sup>-monomethyl-L-arginine (L-NMMA)をNTSに投与すると, グルタミン酸の降圧効果は減弱し, 血圧の上昇と, 腎交感神経活動の増加が認められた<sup>5)</sup>。

以上の結果から, NOはNTSニューロンを興奮させ, 心血管系の調節に寄与する可能性がある。

NTSの中でも内側部は、圧受容体からの神経投射が特に密に存在することが、生理学および解剖学的研究で明らかになっている<sup>43)~45)</sup>。今回の研究でも、*c-fos* mRNAはNTS内側部で最も顕著に誘導されており、これはNOがこの部位で心血管系の調節に重要な役割を果たしていることを裏付ける結果と考えられる。

終野 (AP) は、豊富な毛細管網が存在する脳室周囲器官であり、血液脳関門がほとんどないことから<sup>46)</sup>、末梢臓器や血管内皮細胞より分泌された種々の液性因子が作用する効果器と考えられている<sup>47)</sup>。NO 供与体の脳室内投与により、APに*fos*が誘導された今回の結果は、NOの中枢作用にAPが関与していることを示唆するかもしれない。しかし、APへのL-ArgあるいはL-NMMAの投与は血圧も心拍数も変化させなかったことから<sup>5)</sup>、NOの中枢性血圧調節作用に果たすAPの役割はNTSほど重要とは考えられない。我々の実験では、APはNADPH-dが全く染色されなかったため、NOがAPに直接働かず、他の脳の部位を介して間接的に作用している可能性が示唆される。Angiotensin IIの静脈内投与によってAPに*c-fos*の発現が誘導されたことから<sup>48)</sup>、*c-fos*の発現は、angiotensin IIのような他の因子によって仲介されているかもしれない。

腹外側延髄 (VLM) は血圧と血管トーンスの調節にきわめて重要な働きを示している。吻側の腹外側延髄 (RVLM) は交感神経興奮性ニューロンを含み<sup>49)~51)</sup>、一方、尾側の腹外側延髄 (CVLM) では交感神経抑制性神経が存在している<sup>51)52)</sup>。RVLMへのSNPの投与は、腎の交感神経活動を抑制し、血圧を降下させるが、CVLMへのSNPの投与は、交感神経抑制作用を阻止し、血圧を上昇させる<sup>27)</sup>。従って、NOはRVLMとCVLM双方に抑制的に働き、血圧調節に関与しているらしい。NO 供与体の投与により、CVLMで*c-fos* mRNAが発現した今回の結果は、NOがこの部位に作用し、血圧の維持に影響を与えていることを示唆するものである。

Angiotensin IIなどの昇圧物質をAV3V (the anteroventral third ventricle) 周囲に投与すると

著しく血圧が上昇する<sup>53)54)</sup>。NO 供与体の脳室内投与により、視索前野 (MPO) と終板器官 (OVLT) 近傍に*c-fos* mRNAの強い発現が見られた我々の結果は、この領域がNOの中枢性の心血管系調節に関係していることを示唆している。しかし、最近Cabreraらは、AV3V領域の破壊は、angiotensin IIによる昇圧反応を抑制するが、NOによる血圧の変化には何の効果も示さなかったと報告している<sup>25)</sup>。中等度のNOS活性が、この領域の神経細胞や線維に存在しているので、NOは心血管調節とは別の作用、例えば塩分摂取や飲水行為などに関与しているのかもしれない<sup>25)</sup>。

青斑核 (LC) は脳内で最大のノルアドレナリン作働性ニューロン含有神経核であり、その神経軸索は脳内に広範に投射しているが<sup>55)</sup>、LCの心血管系に対する役割は明らかとはなっていない。LCニューロンの発火頻度と血圧には逆の相関を認める報告がある一方で<sup>56)57)</sup>、両者には全く関連がなかったとの報告もある<sup>58)59)</sup>。また、降圧でも昇圧でも同様にLCでFos陽性細胞が発現したとの報告もされている<sup>40)</sup>。今回、NO 供与体の脳室内投与後、LCに*c-fos* mRNAが強く発現したにもかかわらず、NADPH-dは全く染まらなかった。従って、NOはLCニューロンに間接的に作用していると考えられる。

視床下部では、室傍核 (PVN) と視索上核 (SON) が主なNO産生部位である。PVNは、神経内分泌系と自律神経系双方の情報を統合する中心的な役割を担っている。今回の研究では、NO 供与体の脳室内投与後、PVNでは小細胞核群を中心として*c-fos* mRNAの発現が見られたが、大細胞核群にも一部分*c-fos* mRNAが誘導された。また、SONにも同様に*c-fos* mRNAの発現が見られた。

最近、拘束ストレスにより*c-fos*を発現するPVNのニューロンがNOS活性を持つことや<sup>37)</sup>、NO合成酵素阻害剤が拘束ストレスにより誘導されたFos蛋白のPVNでの発現を抑制することが報告されている<sup>31)</sup>。従って、ストレスにより亢進したPVNニューロンの活動性の調節に、NOが何らかの役割を果たしていることが示唆される。NO 供与体の脳室内投与後に*c-fos*を発現する細胞は、

PVNの小細胞核群の中央部に分布していたが、ここはCRFニューロンが密集しているため、NOがCRF分泌を調節することにより、下垂体-副腎系に作用する可能性がある。

一方、NADPH-d陽性ニューロンはむしろ主に大細胞核群に集積していることから、NOは大細胞核群に働き、神経下垂体の調節に関与していることも考えられる。従って、NOは視床下部-下垂体-副腎系および視床下部-下垂体後葉系の調節を通じて、体液の恒常性の調節に関与していることが示唆される。

PVN背側の小細胞核群(the autonomic zone)は脊髄へ軸索を投射し、交感神経節前運動ニューロンとシナプスを形成し、心血管系に影響を与える<sup>60</sup>。最近、Hatakeyamaらは、PVNのNADPH-d陽性ニューロンの一部が脊髄へ下行性に投射していることを報告した<sup>61</sup>。しかし現時点では、NOによる*c-fos* mRNAの発現が、PVNの神経内分泌ニューロンにおいてどのような役割を持つのかは明らかではない。

NO供与体の脳室内投与により扁桃中心核(CeA)のニューロンに*c-fos* mRNAの発現が見られた。CeAは情動刺激や自律神経反射に関係する重要な経路を構成していることから<sup>62) 63)</sup>、NOはこのような中枢作用を持つかもしれない。ただし、CeAはNADPH-dで全く染まらなかったため、NOが直接CeAで働いているとは考えにくい。

中等度の*c-fos* mRNAの発現が分界条床核の外背側部(dorsolateral BST)に見られた。BSTは、前交連の腹側部、外側部、背側部などに心血管系の調節に関与するニューロンを含んでいる<sup>64)~69)</sup>。最近、BSTの破壊が、著明な血圧上昇を引き起こすことが報告された<sup>70)</sup>。これらのデータはBSTが中枢性の心血管調節に関与していることを示唆している。今回の検討では、NADPH-d陽性細胞と陽性線維がBST外背側部に分布していたので、内因性NOがこの部位で神経情報伝達物質あるいは神経調節物質の一つとして働いている可能性がある。

今回の研究で我々は、*c-fos* mRNAの発現のパターンを観察することで、NO供与体の脳室内投

与によって作用を受けた一連の神経細胞群や、神経回路網を同定することができた。それらは、脳幹の神経核や自律神経、神経内分泌、情動反応などに重要な役割を演じている神経核であるが、心血管系と自律神経系反射を調節すると仮定されているほとんどすべての部位に発現していたことは興味深い。ただし今回の研究結果は、中枢神経系でNOの作用する特定の部位を精密に示したわけではなく、ニューロンからの内因性のNOの遊離を直接観察したわけではない。いずれにせよ、NO供与体の脳室内投与によってこれらの神経核が活性化されたことは、NOが直接あるいは間接的に、中枢神経内で神経情報伝達物質として働いていることを示唆する。

## 結 論

1) NO供与体脳室内投与後*c-fos*は心血管系・自律神経の調節に重要な働きをもつ部位(MPO, BST, PVN, SON, LC, AP, NTS, VLM)のみならず、神経内分泌反応(PVN, SON)や情動に関与する部位(CeA, BST)にも発現しており、NOが広範な中枢作用をもつことが示唆された。

2) *c-fos*とNOS活性が同時に認められた部位では内因性NOが神経情報伝達物質や調節物質として働いており、NOS活性が存在しない部位ではNOが間接的に神経活動を調節していることが考えられた。

ラットのnNOS cDNA、ラットの*c-fos* cDNAをご提供下さいました東京工業大学の広瀬先生、萩原先生、Salk InstituteのDr. Verma、ならびに貴重なご助言を賜った日本医科大学の芝崎保先生、今城純子先生、日本大学の久代登志男先生、麻上朋子先生に深謝いたします。

## 文 献

- 1) Schuman EM, Madison DV: Nitric oxide and synaptic function. *Annu Rev Neurosci* **17**: 153-183, 1994
- 2) Cabrera C, Bohr D: The role of nitric oxide in the central control of blood pressure. *Biochem Biophys Res Commun* **206**: 77-81, 1995
- 3) Horn T, Smith PM, McLaughlin BE et al: Nitric oxide actions in paraventricular nucleus: car-

- diovascular and neurochemical implications. *Am J Physiol* **266** : R 306-R 313, 1994
- 4) **Lewis SJ, Ohta H, Machado B et al** : Microinjection of S-nitrosocysteine into the nucleus tractus solitarius decreases arterial pressure and heart rate via activation of soluble guanylate cyclase. *Eur J Pharmacol* **202** : 135-136, 1991
  - 5) **Harada S, Tokunaga S, Momohara M et al** : Inhibition of nitric oxide formation in the nucleus tractus solitarius increases renal sympathetic nerve activity in rabbits. *Circ Res* **72** : 511-516, 1993
  - 6) **Tseng CJ, Liu HY, Lin HC et al** : Cardiovascular effects of nitric oxide in the brain stem nuclei of rats. *Hypertension* **27** : 36-42, 1996
  - 7) **Togashi H, Sakuma I, Yoshioka M et al** : A central nervous system action of nitric oxide in blood pressure regulation. *J Pharmacol Exp Ther* **262** : 343-347, 1992
  - 8) **Sakuma I, Togashi H, Yoshioka M et al** : N<sup>G</sup>-methyl-L-arginine, an inhibitor of L-arginine-derived nitric oxide synthesis, stimulates renal sympathetic nerve activity in vivo: A role for nitric oxide in the central regulation of sympathetic tone? *Circ Res* **70** : 607-611, 1992
  - 9) **Ma S, Abboud FM, Felder RB** : Effects of L-arginine-derived nitric oxide synthesis on neuronal activity in nucleus tractus solitarius. *Am J Physiol* **268** : R 487-R 491, 1995
  - 10) **Hunt SP, Pini A, Evan G** : Induction of *c-fos* like protein in spinal cord neurons following sensory stimulation. *Nature* **328** : 632-634, 1987
  - 11) **Ceccatelli S, Villar MJ, Goldstein M et al** : Expression of *c-fos* immunoreactivity in transmitter-characterized neurons after stress. *Proc Natl Acad Sci USA* **86** : 9569-9573, 1989
  - 12) **Sharp FR, Sagar SM, Hicks K et al** : *c-fos* mRNA, *Fos*, and *Fos*-related antigen induction by hypertonic saline and stress. *J Neurosci* **11** : 2321-2331, 1991
  - 13) **Arnord FJL, de Lucas Bueno M, Shiers H et al** : Expression of *c-fos* in regions of the basal limbic forebrain following intracerebroventricular corticotropin-releasing factor in unstressed or stressed male rats. *Neuroscience* **51** : 377-390, 1992
  - 14) **Imaki T, Shibasaki T, Demura H et al** : Intracerebroventricular administration of corticotropin-releasing factor induces *c-fos* mRNA expression in brain regions related to stress responses: comparison with pattern of *c-fos* mRNA induction after stress. *Brain Res* **616** : 114-125, 1993
  - 15) **Wang X-Q, Imaki T, Shibasaki T et al** : Intracerebroventricular administration of  $\beta$ -endorphin increases the expression of *c-fos* and of corticotropin-releasing factor messenger ribonucleic acid in the paraventricular nucleus of the rat. *Brain Res* **707** : 189-195, 1996
  - 16) **Herbert J, Forsling MJ, Howes SR et al** : Regional expression of *c-fos* antigen in the basal forebrain following intraventricular infusions of angiotensin and its modulation by drinking either water or saline. *Neuroscience* **51** : 867-882, 1992
  - 17) **Lebrun CJ, Blume A, Herdegen T et al** : Angiotensin II induces a complex activation of transcription factors in the rat brain: expression of Fos, Jun and Krox proteins. *Neuroscience* **65** : 93-99, 1995
  - 18) **Hrabie JA, Klose JR, Wink DA et al** : New nitric oxide-releasing zwitterions derived from polimines. *J Org Chem* **58** : 1472-1476, 1993
  - 19) **Katayama Y** : NOC. *Dojin News* **69** : 21, 1994
  - 20) **Shibuta S, Mashimo T, Ohara A et al** : Intracerebroventricular administration of a nitric oxide-releasing compound, NOC-18, produces thermal hyperalgesia in rats. *Neurosci Lett* **187** : 103-106, 1995
  - 21) **Dawson TM, Brecht DS, Fotuhi M et al** : Nitric oxide synthase and neuronal NADPH diaphorase are identical in brain and peripheral tissues. *Proc Natl Acad Sci USA* **88** : 7797-7801, 1991
  - 22) **Tomiyama H, Kushiro T, Abeta H et al** : Kinins contribute to the improvement of insulin sensitivity during treatment with angiotensin converting enzyme inhibitor. *Hypertension* **23** : 450-455, 1994
  - 23) **Imaki T, Shibasaki T, Demura H et al** : Early induction of *c-fos* precedes increased expression of corticotropin-releasing factor messenger ribonucleic acid in the paraventricular nucleus after immobilization stress. *Endocrinology* **131** : 240-246, 1992
  - 24) **O'Shea RD, Gundlach AL** : Food or water deprivation modulate nitric oxide synthase (NOS) activity and gene expression in rat hypothalamic neurones: correlation with neurosecretory activity? *J Neuroendocrinol* **8** : 417-425, 1996
  - 25) **Cabrera CL, Bealer SL, Bohr DF** : Central depressor action of nitric oxide is deficient in genetic hypertension. *Am J Hypertens* **9** : 237-241, 1996
  - 26) **Tagawa T, Imaizumi T, Harada S et al** : Nitric oxide influences neuronal activity in the nucleus

- tractus solitarius of rat brainstem slices. *Circ Res* **75** : 70–76, 1994
- 27) **Shapoval LN, Sagach VF, Pobegailo LS** : Nitric oxide influences ventrolateral medullary mechanisms of vasomotor control in the cat. *Neurosci Lett* **132** : 47–50, 1991
  - 28) **Peunova N, Enikolopov G** : Amplification of calcium-induced gene transcription by nitric oxide in neuronal cells. *Nature* **364** : 450–453, 1993
  - 29) **Haby C, Lisovski F, Aunis D et al** : Stimulation of the cyclic GMP pathway by NO induces expression of the immediate early genes *c-fos* and *junB* in PC 12 cells. *J Neurochem* **62** : 496–501, 1994
  - 30) **Morris BJ** : Stimulation of immediate early gene expression in striatal neurons by nitric oxide. *J Biol Chem* **270** : 24740–24744, 1995
  - 31) **Amir S, Rackover M, Funk D** : Blockers of nitric oxide synthase inhibit stress activation of *c-fos* expression in neurons of the hypothalamic paraventricular nucleus in the rat. *Neuroscience* **77** : 623–627, 1997
  - 32) **Morgan JI, Curran T** : Stimulus-transcription coupling in the nervous system: involvement of the inducible proto-oncogenes *fos* and *jun*. *Annu Rev Neurosci* **14** : 421–451, 1991
  - 33) **Kumada M, Terui N, Kuwaki T** : Arterial baroreceptor reflex: its central and peripheral neural mechanisms. *Prog Neurobiol* **35** : 331–361, 1990
  - 34) **Matsumoto T, Nakane M, Pollock JS et al** : A correlation between soluble brain nitric oxide synthase and NADPH-diaphorase activity is only seen after exposure of the tissue to fixative. *Neurosci Lett* **155** : 61–64, 1993
  - 35) **Norris PJ, Charles IG, Scorer CA** : Studies on the localization and expression of nitric oxide synthase using histochemical techniques. *Histochem J* **27** : 745–756, 1995
  - 36) **Vincent SR, Kimura H** : Histochemical mapping of nitric oxide synthase in the rat brain. *Neuroscience* **46** : 755–784, 1992
  - 37) **Krukoff TL, Khalili P** : Stress-induced activation of nitric oxide-producing neurons in the rat brain. *J Comp Neurol* **377** : 509–519, 1997
  - 38) **Wood J, Garthwaite J** : Models of the diffusional spread of nitric oxide: implications for neural nitric oxide signalling and its pharmacological properties. *Neuropharmacology* **33** : 1235–1244, 1994
  - 39) **Chan RKW, Sawchenko PE** : Spatially and temporally differentiated patterns of *c-fos* expression in brainstem catecholaminergic cell groups induced by cardiovascular challenges in the rat. *J Comp Neurol* **348** : 433–460, 1994
  - 40) **Krukoff TL, MacTavish D, Harris KH et al** : Changes in blood volume and pressure induce *c-fos* expression in brainstem neurons that project to the paraventricular nucleus of the hypothalamus. *Mol Brain Res* **34** : 99–108, 1995
  - 41) **Loewy AD** : Central autonomic pathways. *In* Central Regulation of Autonomic Functions (Loewy AD, Spyer KM eds). pp88–103, Oxford, New York (1990)
  - 42) **Spyer KM** : The central nervous organization of reflex circulatory control. *In* Central Regulation of Autonomic Functions (Loewy AD, Spyer KM eds). pp168–188, Oxford, New York (1990)
  - 43) **Ciriello J** : Brainstem projections of aortic baroreceptor afferent fibers in the rat. *Neurosci Lett* **36** : 37–42, 1983
  - 44) **Mendelowitz D, Yang M, Andresen MC et al** : Localization and retention in vitro of fluorescently labeled aortic baroreceptor terminals on neurons from the nucleus tractus solitarius. *Brain Res* **581** : 339–343, 1992
  - 45) **Sapru HN, Gonzalez E, Krieger J** : Aortic nerve stimulation in the rat: cardiovascular and respiratory responses. *Brain Res Bull* **6** : 393–398, 1981
  - 46) **Dempsey EW** : Neural and vascular ultrastructure of the area postrema in the rat. *J Comp Neurol* **150** : 177–200, 1973
  - 47) **Gehlert DR, Speth RC, Wamsley JK** : Distribution of (<sup>125</sup>I) angiotensin II binding sites in the rat brain: a quantitative autoradiographic study. *Neuroscience* **18** : 837–856, 1986
  - 48) **McKinley MJ, Badoer E, Oldfield BJ** : Intravenous angiotensin II induces Fos-immunoreactivity in circumventricular organs of the lamina terminalis. *Brain Res* **594** : 295–300, 1992
  - 49) **Amendt K, Czachurski J, Dembowski K et al** : Bulbospinal projections to the intermedialateral cell column; a neuroanatomical study. *J Auton Nerv Syst* **1** : 103–107, 1979
  - 50) **Barman SM, Gebber GL** : Axonal projection patterns of ventrolateral medullospinal sympatho-excitatory neurons. *J Neurophysiol* **53** : 1551–1566, 1985
  - 51) **Willette RN, Barcas PP, Krieger AJ et al** : Vasopressor and depressor areas in the rat medulla. Identification by microinjection of L-glutamate. *Neuropharmacology* **22** : 1071–1079, 1983
  - 52) **Blessing WW** : Depressor neurons in rabbit caudal medulla act via GABA receptors in rostral medulla. *Am J Physiol* **254** : H686–H692, 1988

- 53) **Buggy J, Johnson AK** : Angiotensin-induced thirst: effects of third ventricle obstruction and periventricular ablation. *Brain Res* **149** : 117–129, 1978
- 54) **Brody MJ, Johnson AK** : Role of the anteroventral third ventricle region in fluid and electrolyte balance, arterial pressure regulation, and hypertension. *In* *Frontiers in Neuroendocrinology Vol 6* (Martini L, Ganong WF eds). pp249–292, Raven, New York (1980)
- 55) **Foote SL, Bloom FE, Aston-Jones G** : Nucleus locus coeruleus: new evidence of anatomical and physiological specificity. *Physiol Rev* **63** : 844–914, 1983
- 56) **Elam MT, Yao T, Svensson TH** : Regulation of locus coeruleus neurons and splanchnic, sympathetic nerves by cardiovascular afferents. *Brain Res* **290** : 281–287, 1984
- 57) **Olpe HR, Berecek K, Jones RSG et al** : Reduced activity of locus coeruleus neurons in hypertensive rats. *Neurosci Lett* **61** : 25–29, 1985
- 58) **Guyenet PG, Byrum CE** : Comparative effects of sciatic nerve stimulation, blood pressure, and morphine on the activity of A5 and A6 pontine noradrenergic neurons. *Brain Res* **327** : 191–201, 1985
- 59) **Valentino RJ, Martin DL, Suzuki M** : Dissociation of locus coeruleus activity and blood pressure. Effects of clonidine and corticotropin-releasing factor. *Neuropharmacology* **25** : 603–610, 1986
- 60) **Sawchenko PE, Swanson LW** : Organization of CRF immunoreactive cells and fibers in the rat brain: immunohistochemical studies. *In* *Corticotropin-Releasing Factor: Basic and Clinical Studies of a Neuropeptide* (DeSouza EB, Nemeroff CB eds), pp29–51, CRC Uniscience, Boca Raton (1990)
- 61) **Hatakeyama S, Kawai Y, Ueyama T et al** : Nitric oxide synthase-containing magnocellular neurons of the rat hypothalamus synthesize oxytocin and vasopressin and express *Fos* following stress stimuli. *J Chem Neuroanat* **11** : 243–256, 1996
- 62) **Blanchard DC, Blanchard RJ** : Innate and conditioned reactions to threat in rats with amygdaloid lesions. *J Comp Physiol Psychol* **81** : 281–290, 1972
- 63) **Reis DJ, Ledoux JE** : Some central neural mechanisms governing resting and behaviorally coupled control of blood pressure. *Circulation* **76** (Suppl I) : 1-2–1-9, 1987
- 64) **Giancola SB, Roder S, Ciriello J** : Contribution of caudal ventrolateral medulla to the cardiovascular responses elicited by activation of bed nucleus of the stria terminalis. *Brain Res* **606** : 162–166, 1993
- 65) **Wilkinson MF, Pittman QJ** : Changes in arterial blood pressure alter activity of electrophysiologically identified single units of the bed nucleus of the stria terminalis. *Neuroscience* **64** : 835–844, 1995
- 66) **Ricardo JA, Koh ET** : Anatomical evidence of direct projections from the nucleus of the solitary tract to the hypothalamus, amygdala, and other forebrain structures in the rat. *Brain Res* **153** : 1–26, 1978
- 67) **van der Kooy D, Koda LY, McGinty JF et al** : The organization of projections from the cortex, amygdala, and hypothalamus to the nucleus of the solitary tract in rat. *J Comp Neurol* **224** : 1–24, 1984
- 68) **Herbert H, Moga MM, Saper CB** : Connections of the parabrachial nucleus with the nucleus of the solitary tract and the medullary reticular formation in the rat. *J Comp Neurol* **293** : 540–580, 1990
- 69) **Krukoff TL, Plochocka-Zulinska D** : Changes in gene expression of neuronal nitric oxide synthase (nNOS) in hypothalamus and brainstem of adult rats with spontaneous hypertension. *Soc Neurosci Abstr* **22** : 853, 1996
- 70) **Earle ML, Pittman QJ** : Involvement of the PVN and BST in 1 K 1 C hypertension in the rat. *Brain Res* **669** : 41–47, 1995