

原 著

## ラット培養網膜神経節細胞における 一酸化窒素合成酵素阻害剤の細胞保護効果

大蔵省印刷局東京病院 眼科

(指導：東京女子医科大学 医学部 眼科学 堀 貞夫教授)

コセキ ヨシユキ  
小関 義之

(受付 平成13年1月10日)

### The Protective Effects of a Nitric Oxide Synthase Inhibitor in Rat Cultured Retinal Ganglion Cells

Yoshiyuki KOSEKI

Ophthalmology, Tokyo Hospital Printing Bureau, Ministry of Finance

(Director: Prof. Sadao HORI, Department of Ophthalmology,

Tokyo Women's Medical University, School of Medicine)

Nitric oxide may mediate excitotoxic and ischemic effects on central neurons. This study investigated the effect of a nitric oxide synthase (NOS) inhibitor on the survival of cultured rat retinal ganglion cells (RGCs) subjected to hypoxia and excitotoxicity. Dissociated RGCs from neonatal rats were plated on an anti-glial fibrillary acidic protein positive glial cell monolayer after they were retrogradely labeled with the fluorescent marker DiI. The glial cell monolayer is bNOS positive and iNOS negative immunohistochemically. Two days after dissociation, they were treated with graded concentrations of the NOS inhibitor N $\omega$ -nitro-L-arginine (NA), and exposed to hypoxia for from 1 to 24 hours or to excitatory amino acids. The number of surviving RGCs were counted under fluorescein microscopy after a 24-hour recovery period, and were expressed as a percentage of RGCs surviving compared to a control group. The survival rate of cultured RGCs exposed to hypoxia increased in a dose-dependent fashion with NA. The time course of the survival rate of RGC cultures pretreated with NA showed a better survival rate. The survival rate of the cultured RGCs exposed to excitatory amino acid was lower than that of the RGCs pretreated with NA. A NOS inhibitor provides partial protection of RGCs against hypoxia and excitotoxicity in cell culture. The results in this model suggest that protection is conferred at the cellular level.

#### 緒 言

緑内障は網膜神経節細胞を障害し、臨床的には視神経乳頭の陥凹の拡大と網膜神経線維束の欠損を特徴とし、視野の欠損を生じる。これは組織学

的には篩状板での軸索のねじれや虚血による網膜障害が原因として関与していると考えられている<sup>1)~3)</sup>。また、虚血による網膜障害によって起こる網膜神経節細胞死に興奮性アミノ酸が原因となっ

ているという報告<sup>4)</sup>や N-methyl D-aspartate (NMDA) 受容体の拮抗剤が虚血障害から網膜を保護したという報告がある<sup>5)</sup>。

一酸化窒素は中枢神経系で重要な伝達物質であることが明らかになってきた。ラット脳皮質細胞で NMDA などとその受容体に結合すると、カルシウムイオンが細胞内に流入し、カルモジュリンと結合することで神経型一酸化窒素合成酵素が活性化し、細胞内一酸化窒素の濃度が上昇する<sup>6)</sup>。このことは、一酸化窒素は興奮性アミノ酸や虚血による神経障害に関与している可能性を示している。中大脳動脈を閉塞させた動物モデルで、一酸化窒素合成酵素抑制剤を腹腔内投与すると、脳梗塞の範囲が減少したとの報告がある<sup>7,8)</sup>。また、培養脳皮質細胞で、一酸化窒素合成酵素抑制剤がグルタミン酸による神経毒性に拮抗したという報告もある<sup>9)</sup>。網膜神経節細胞においても、一酸化窒素合成酵素阻害剤が虚血や興奮性アミノ酸による神経細胞毒性を抑制する可能性がある。

我々は、グリア細胞上に網膜神経節細胞を培養することにより、網膜神経節細胞の長期生存を可能とした<sup>10)</sup>。この培養系を用いて、様々な観点から neuron-glia interaction の研究を行ってきた。そのなかで、神経膠細胞上に培養した網膜神経節細胞は、虚血負荷や興奮性アミノ酸毒性に対して濃度依存性に生存率が低下することが明らかとなった<sup>11)</sup>。今回、この培養系を用い、一酸化窒素合成酵素阻害剤が虚血や興奮性アミノ酸による細胞毒性に及ぼす効果を検討した。

## 対象および方法

### 1. 対象

実験には Sprague-Dawley ラット (日本チャールズ・リバー, 東京) を用いた。動物実験にあたっては東京女子医科大学動物実験倫理委員会規程 (許可番号 97-27, 98-6, 99-21, 00-74) に従った。

### 2. 方法

#### 1) 網膜神経節細胞の逆行性標識

生後 5~7 日の Sprague-Dawley ラットを氷上で 10 分間放置することで麻酔した。顕微鏡下で横静脈洞のやや後方の皮膚を小切開し、上丘に 1,1'-dioctadecyl-3, 3', 3'-tetramethylindocarbocyanine

perchlorate (DiI; DiI 2.5ml/ml 100% エチルアルコール) を 1 $\mu$ l 注入し、網膜神経節細胞を逆行性に標識した<sup>12)</sup>。

#### 2) 網膜細胞浮遊液の作製

網膜神経節細胞は、DiI を注入後 2 日目の生後 5~7 日の Sprague-Dawley ラットの網膜から Liefer らの方法<sup>13)</sup>に従って分離した。すなわち、ラットを麻酔薬 (ペントバルビタール塩) 過剰投与した後、断頭により屠殺した。眼球を摘出し、ペニシリン 100U/ml とストレプトマイシン 100  $\mu$ g/ml を加えた HBSS (Hank's balanced salt solution) 中で顕微鏡を用い、角膜を切開し水晶体・硝子体を除去した後、網膜を小スパーテルで傷つけないように摘出した。4 眼分の網膜をパパイン (260U/ml)・DL-システイン (0.2mg/ml)・ウシ血清アルブミン (0.2ml/ml) 含有 HBSS 10ml 中で 37 $^{\circ}$ C 40 分間消化させた。消化させた網膜を HBSS で洗浄した後、Dulbecco 改変 Eagle medium (DMEM) 4ml に移し細胞浮遊液を作製した。後述のラット脳皮質星状膠細胞を単層培養してある 35 mm シャーレに 1.5ml の培養液 (DMEM にグルタミン 580mg/L・グルコース 1000mg/L・5% ラット血清・ペニシリン 100U/ml・ストレプトマイシン 100 $\mu$ g/ml) を入れ、それに細胞浮遊液 0.2ml (約 3 $\times$ 10<sup>6</sup> 個の網膜細胞) を滴下した。網膜細胞は温度 37 $^{\circ}$ C・湿度 100% の 5%CO<sub>2</sub> を維持した炭酸ガスインキュベーターで培養し、培養液は 3 日毎に交換した。

#### 3) 神経膠細胞単層培養の作製

神経細胞を長期間生存させるためには星状膠細胞などの神経支持細胞上で培養する必要がある<sup>10,11)</sup>。脳皮質星状膠細胞は McCaffery らの方法<sup>14)</sup>により生後 1~2 日のラットの大脳半球を用いた。断頭の後、大脳半球を摘出し、ペニシリン 100U/ml・ストレプトマイシン 100 $\mu$ g/ml 含有 HBSS 中に浸した。顕微鏡下で髄膜を除去し、1~2mm<sup>3</sup> 角に切断し、0.25% トリプシン含有 HBSS 中で 37 $^{\circ}$ C 40 分間インキュベートし消化させた。組織を HBSS で洗浄した後、6ml の培養液中に移し、18G 針で吸い込み粉碎させた。この組織液を 75 cm<sup>2</sup> の培養フラスコに移し、インキュベーター (温

度 37°C, 湿度 100%, 空気に 5%CO<sub>2</sub> を混合) で培養した。培養液には DMEM にグルタミン 580mg/L・グルコース 4500mg/L・10% ウシ胎児血清・ペニシリン 100U/ml・ストレプトマイシン 100 µg/ml を混合し, 3 日毎に交換した。

初代培養 1~2 週間後, 培養容器壁に間隙なく細胞層を形成した所で, ペトリ皿に継代した。トリプシン処理で細胞浮遊液とし, 細胞密度を約 1.2~2.0×10<sup>5</sup> 個/ml になるように希釈した。この細胞浮遊液をペトリ皿に 1ml 入れ培養した。培養した細胞は免疫組織学的に抗 GFAP (anti-gliial fibrillary acidic protein) 抗体に染色されることで脳皮質星状膠細胞と同定した。

#### 4) 一酸化窒素合成酵素の同定

この培養系に関与する一酸化窒素合成酵素のアイソフォームの同定を試みた。構成型一酸化窒素合成酵素には monoclonal anti-brain nitric oxide synthase (bNOS; Sigma, USA), 誘導型一酸化窒素合成酵素には anti-inducible nitric oxide synthase (iNOS; Sigma, USA) を用いた。

培養細胞を 5% ヤギ血清含有 HBSS で洗浄した後, pH7.4 に調整した過ヨウ素酸含有 PBS に移した。内因性ペルオキシダーゼ活性を抑制するために 3% ペルオキシダーゼで 5 分間反応させてから, リン酸緩衝液に移し, 一次抗体 (bNOS 1: 3000, iNOS 1: 10000) を室温で 60 分間反応させた。リン酸緩衝液で洗浄した後, ビオチン化二次抗体を室温で 20 分間反応させた。リン酸緩衝液で洗浄した後, アビジン・ビオチンペルオキシダーゼ複合体と 20 分間反応させた。洗浄の後, 顕微鏡で観察した。マウス血清を negative control, vimentin (Sigma, USA) を positive control とした。

#### 5) 一酸化窒素合成酵素阻害剤の効果

一酸化窒素合成酵素阻害剤の効果をみるために, まず培養後 2 日目の網膜神経節細胞を用い, 一酸化窒素合成酵素阻害剤で前処置した後に虚血負荷および興奮性アミノ酸負荷に晒した。それぞれの方法は以下の通りである。

##### (1) 一酸化窒素合成酵素阻害剤の前処置

網膜神経節細胞を, 一酸化窒素合成酵素の選択的阻害剤である N $\omega$ -nitro-L-arginine (NA) で処理

した。0~5mM の NA で 6 時間処理した後, 虚血負荷および興奮性アミノ酸負荷を行った。

##### (2) 虚血負荷

網膜神経節細胞を虚血状態に暴露した。虚血状態は, 無酸素ガス (95%N<sub>2</sub>-5%CO<sub>2</sub>) を密閉した容器内に 1~24 時間灌流させて低酸素状態を維持した。培養液の酸素分圧は酸素感受性金属電極 (Diamond General, USA) を用いて測定した。酸素分圧は容器を密閉した後 30 分間で安定した。容器内の温度は温水を循環させ 37°C に維持した。低酸素状態にした後, 培養皿をインキュベーターに戻して, 低酸素負荷による遅発性神経細胞死の影響を考慮してさらに 24 時間培養してから観察した。

##### (3) 興奮性アミノ酸負荷

網膜神経節細胞に, 興奮性アミノ酸のグルタミン酸と NMDA を負荷した。NMDA チャンネルに対する膜電位依存性の特異的ブロックを防ぐために Mg イオンを除いた培養液に興奮性アミノ酸濃度が 100µM となるように調整した。対照となる細胞にはアミノ酸を除いた培養液を用いた。低酸素負荷と同様に遅発性神経細胞死の影響を考慮してさらに 24 時間培養してから観察した。

##### 6) 細胞の生死の判定

網膜神経節細胞の生存率は, 死細胞を染色するトリパンブルーに染色されず培養皿の底部に付着しているかどうかで判定した。生存している網膜神経節細胞の数は, 位相差顕微鏡下 200 倍の倍率で培養皿をそれぞれ 30 視野をカウントした。虚血や興奮性アミノ酸処理をしなかった対照も同様に行った。結果は, 対照と比較した生存率を平均±標準偏差 (n=培養皿の数) で表した。統計処理は Student's t-test を用いた。

## 結 果

### 1. 網膜神経節細胞の標識

網膜神経節細胞は, DiI を注入後 2 日目の網膜の伸展標本で DiI で染色された細胞として確認された (図 1)。DiI は細胞の形質膜や細胞質顆粒を染めた。神経膠細胞単層培養上で標識した網膜神経節細胞を 1 週間培養した後でも, DiI が細胞質内に顆粒状に染色されているのが確認できた (図 2)。網膜神経節細胞浮遊液中の網膜神経節細胞の割

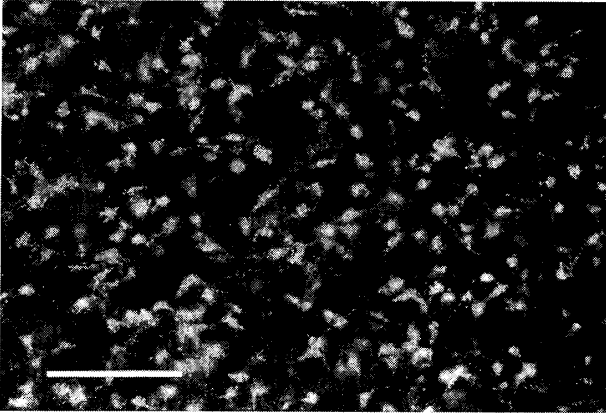


図1 DiI注入後2日目の網膜の伸展標本  
網膜神経節細胞は上丘より注入されたDiIで逆行性に  
標識されていた。(×250, Bar=100μm)

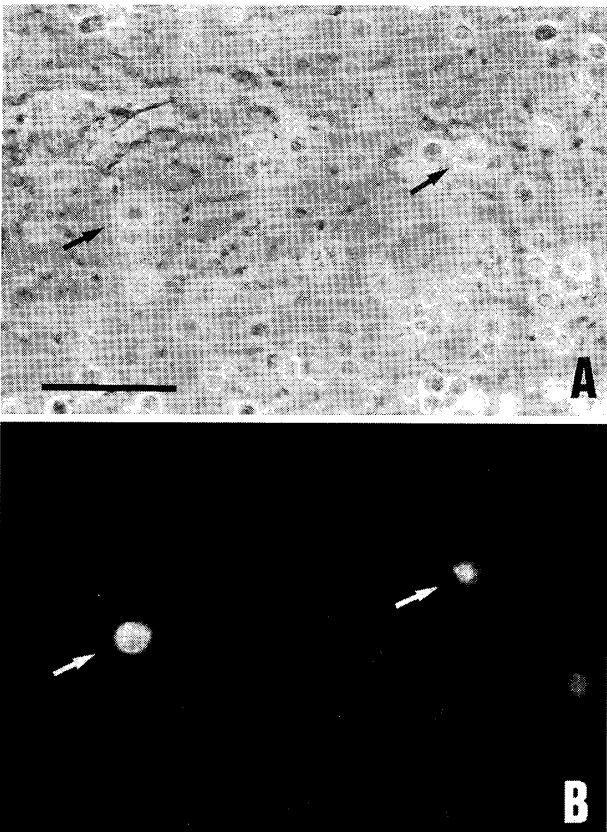


図2 DiIで標識された網膜神経節細胞培養  
培養開始後2日目の網膜神経節細胞(矢印)を位相差  
顕微鏡(A)・蛍光顕微鏡(B)下で同様の場所を撮影  
した。(×400, Bar=50μm)

合は約200分の1個であった。

## 2. 生存率 (図3)

網膜神経節細胞は脳皮質星状膠細胞上で長期間

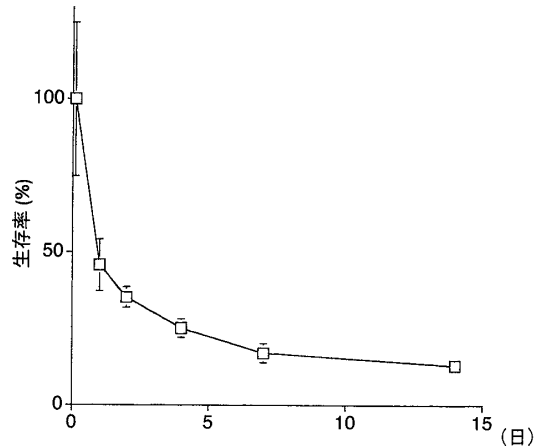


図3 神経膠細胞単層培養での網膜神経節細胞の生存率

培養後2時間の網膜神経節細胞数を100%として示した。網膜神経節細胞の生存率は経時的に減少を示した。(n=10, 各培養で30視野の網膜神経節細胞総数を測定した)

生存が可能であった。網膜神経節細胞は単層培養なしでは2~3日以上生存しなかった。培養後2日目では培養後2時間を100%とすると網膜神経節細胞は $35.3 \pm 3.4\%$ に減少していた。生存率は4日目で $25.1 \pm 1.6\%$ 、7日目で $17.4 \pm 3.2\%$ であった。

## 3. 一酸化窒素合成酵素の同定 (図4)

脳皮質星状膠細胞の単層培養は免疫組織学的に抗bNOS抗体には陽性を示し、抗iNOS抗体、negative controlであるマウス血清には陰性を示した。

## 4. 虚血に対する一酸化窒素合成酵素阻害剤の効果

種々の濃度のNA(0, 1, 10, 100, 1000, 5000μM)で前処置した網膜神経節細胞を、低酸素(O<sub>2</sub>濃度2%以下)状態で6時間培養した。NAを加えず低酸素処置したものの生存率は、低酸素処置しなかったものを対照として $31.0 \pm 3.1\%$ であった。NAを加えると濃度依存性に生存率は上昇し、NA濃度が100μMで $61.4 \pm 9.3\%$ と最もよい生存率を示した。ただし、100μM以上NA濃度をあげても生存率は改善しなかった(図5)。

虚血負荷時にNA100μMで前処置した網膜神経節細胞の生存率は $30.1 \pm 3.1\%$ で、NAで前処置しなかった生存率 $11.0 \pm 2.3\%$ に比べ改善し、統計

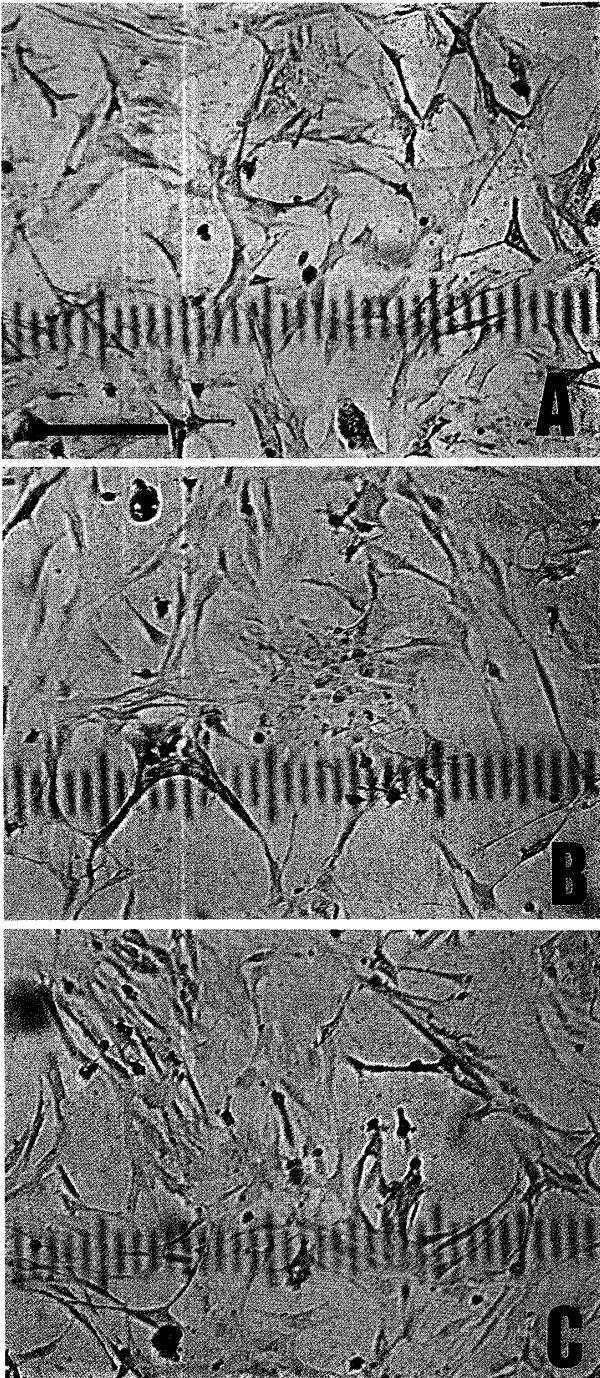


図4 脳皮質星状細胞単層培養の免疫組織学的染色  
抗 bNOS 抗体 (A) では陽性反応を認めたが、抗 iNOS  
抗体 (B)、マウス血清 (C) では染色されなかった。(Bar  
=50 $\mu$ m)

学的に有意差 ( $p < 0.01$ ) を認めた (図6)。

#### 5. 興奮性アミノ酸に対する一酸化窒素合成酵素阻害剤の効果 (図6)

NA を 100 $\mu$ M 6 時間前処置した網膜神経節細胞を、2 種類の興奮性アミノ酸(グルタミン酸 100

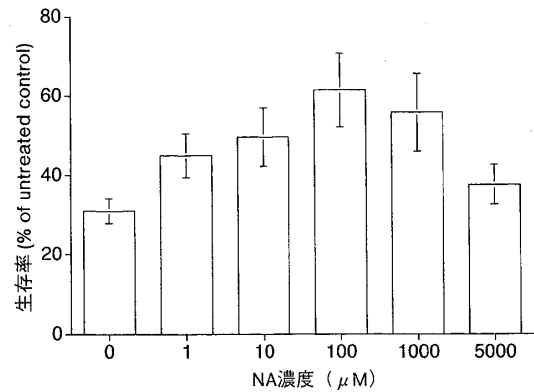


図5 虚血負荷時に一酸化窒素合成酵素阻害剤濃度による網膜神経節細胞の生存率

網膜神経節細胞を NA (1, 10, 100, 1000, 5000 $\mu$ M) で前処置した。生存率は未処置のものを対照として表した。NA 濃度 100 $\mu$ M で最もよい生存率を示した。(n=15, 各培養で 30 視野の網膜神経節細胞数を測定した)

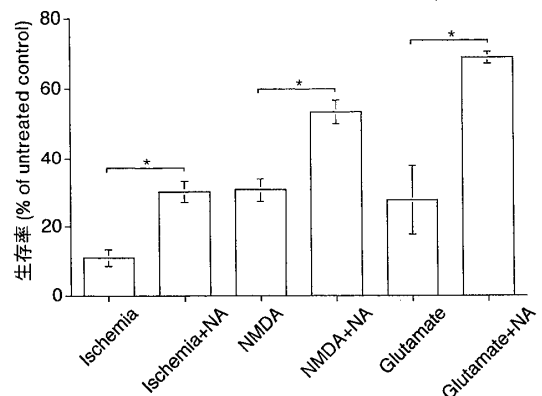


図6 虚血負荷, 興奮性神経毒性に対する一酸化窒素合成酵素阻害剤の効果

NA 濃度 100 $\mu$ M で前処置した網膜神経節細胞と未処置のものを虚血負荷 ( $O_2$  濃度 2% 以下, 24 時間)・興奮性アミノ酸 (グルタミン酸 100 $\mu$ M・NMDA 100 $\mu$ M) で負荷した。培養後 2 時間のものを 100% とした。NA で前処置したものは有意に生存率が改善した ( $p < 0.01$ )。 (n=14, 各培養で 30 視野の網膜神経節細胞数を測定した)

$\mu$ M・NMDA 100 $\mu$ M) で処理した。興奮性アミノ酸負荷した生存率は NMDA 30.6 $\pm$ 3.3%, グルタミン酸 27.7 $\pm$ 10.0% で、NA で前処置したものはそれぞれ 53.3 $\pm$ 3.3%, 68.8 $\pm$ 1.6% と統計学的に有意 ( $p < 0.01$ ) に生存率が改善した。

## 考 察

培養海馬細胞は、虚血・低糖分負荷で興奮性アミノ酸を放出するが、初期の虚血により大量の興奮性アミノ酸が放出され、その後再灌流の際にさらに多くの興奮性アミノ酸が放出されることが報告されている<sup>15)</sup>。このシナプス間で放出されるグルタミン酸やアスパラギン酸などの興奮性アミノ酸の放出は、虚血性神経障害を招いていると推察されている<sup>16)</sup>。本実験においても虚血負荷や興奮性アミノ酸負荷で容量依存性に網膜神経節細胞の生存率の減少が認められた。

ラットの脳神経組織でグルタミン酸により NMDA 受容体を活性化させると、細胞内の一酸化窒素濃度が上昇することが知られている<sup>9)</sup>。Viga らは一酸化窒素が虚血の初期には細胞保護的に働き、再灌流時また再灌流後には細胞を障害させる可能性を示した<sup>17)</sup>。一酸化窒素合成酵素を含む神経細胞は nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) で選択的に染色される<sup>18)</sup>。一酸化窒素合成酵素は免疫細胞化学的に、また NADPH は組織化学的に、網膜の内境界膜に沿ったアマクリン細胞中に同定されている<sup>19)</sup>。アマクリン細胞で産生された一酸化窒素は網膜神経節細胞に拡散し、可溶性のグアニル酸シクラーゼを活性化させる<sup>20)</sup>。網膜神経節細胞中の cyclic GMP レベルはグアニル酸シクラーゼによって上昇し、cyclic nucleotide-gated non-selective cation channels を活性化させカルシウムイオンを流入させる<sup>21)</sup>。

今回の実験では培地として脳皮質星状膠細胞を単層培養したものをを用いたが、星状膠細胞に一酸化窒素合成酵素が存在する<sup>22)</sup>。この培地における一酸化窒素合成酵素を免疫組織学的に同定したところ、アイソフォームは抗 bNOS 抗体陽性、抗 iNOS 抗体陰性であった。bNOS はカルシウムイオン依存性酵素であり、この培養系における虚血および興奮性アミノ酸障害にもカルシウムイオンチャンネルが関与していると考えられる。

一酸化窒素合成酵素阻害剤として知られている物質はいくつかあるが、実験によく用いられているのは NA と N<sup>G</sup>-monomethyl-L-arginine (MMA)

である。両方ともその阻害効果にアイソフォーム間の特異性はほとんどない。NA は MMA より小脳切片で NMDA 負荷による cGMP 生成量を抑制したとの報告<sup>23)</sup>があり、今回は一酸化窒素合成酵素阻害剤として NA を使用した。

Nowicki らは、ハツカネズミの in vivo モデルで一酸化窒素合成酵素阻害剤が脳虚血を改善させ、その効果は NMDA 受容体拮抗剤の MK-801 より大きいことを報告している<sup>7,8)</sup>。in vitro では、脳皮質細胞培養系でも NA が虚血障害を軽減することが示され、NA の効果は L-arginine の濃度に反比例し、arginine を除去した培養液は NMDA による細胞死を予防すると報告されている<sup>24)</sup>。我々の実験でも、NA は培養網膜神経節細胞においても虚血および興奮性アミノ酸毒性を軽減させることが示された。

虚血および興奮性アミノ酸毒性を軽減する機序として、East らは、NA はグアニル酸シクラーゼ活性化を抑制し NMDA による cGMP の上昇を抑えることを示した<sup>22)</sup>。我々の実験でも網膜神経節細胞の生存率が上昇したことは、一酸化窒素合成酵素阻害剤が培地であるグリア細胞中の一酸化窒素合成酵素の活性を押さえ、cGMP の産生を減少させ、網膜神経節細胞へのカルシウムイオンの流入を阻止したためと考えられる。

また、Vige ら<sup>17)</sup>は NA の神経保護作用は低濃度の時にしか認められないことを示したが、我々の実験でも同様に NA は 100 $\mu$ M までは濃度依存性に保護効果があるが、それ以上の濃度では、逆に障害作用を示した。

一酸化窒素合成酵素の機能は多岐にわたり、まだ完全に解明されていないが、中枢神経系での虚血や興奮性アミノ酸による障害に重要な役割を果たしていることは間違いない<sup>15)</sup>。今回の実験で、網膜の虚血や興奮性細胞毒性においても同様に一酸化窒素が関連していることが示された。

## 結 論

一酸化窒素合成酵素阻害剤の神経保護作用の機序は不明な点が多いが、今回の結果より、一酸化窒素合成酵素阻害剤を前処置することで生存率の改善したことより、虚血や興奮性アミノ酸による

神経毒性による神経細胞死には一酸化窒素が関与することが示された。

#### 文 献

- 1) **Caprioli J, Sears M, Miller JM**: Patterns of early visual field loss in open-angle glaucoma. *Am J Ophthalmol* **103**: 512-517, 1987
- 2) **Drance SM, Douglas GR, Airaksinen PJ et al**: Diffuse visual field loss in chronic open-angle and low-tension glaucoma. *Am J Ophthalmol* **104**: 557-580, 1987
- 3) **Yamazaki Y, Lakowski R, Drance SM**: A comparison of the blue color mechanisms in high-and low-tension glaucoma. *Ophthalmology* **96**: 12-15, 1989
- 4) **Yoon YH, Marmor MF**: Dextromethorphan protects retina against ischemic injury in vivo. *Arch Ophthalmol* **107**: 409-411, 1989
- 5) **Zeevalk GD, Nicklaus WJ**: Chemically induced hypoglycemia and anoxia: Relationship to glutamate receptor-mediated toxicity in retina. *J Pharmacol Exp Ther* **253**: 1285-1292, 1990
- 6) **Garthwaite J**: Glutamate, nitric oxide and cell-cell signalling in the nervous system. *Trends Neurosci* **14**: 60-67, 1991
- 7) **Nowicki JP, Duval D, Poignet H et al**: Nitric oxide mediates neuronal death after focal cerebral ischemia in the mouse. *Eur J Pharmacol* **204**: 339-340, 1991
- 8) **Carreau A, Duval D, Poignet H et al**: Neuroprotective efficacy of N<sup>ω</sup>-nitro-L-arginine after focal cerebral ischemia in the mouse and inhibition of cortical nitric oxide synthase. *Eur J Pharmacol* **256**: 241-249, 1994
- 9) **Dawson VL, Dawson TM, London ED et al**: Nitric oxide mediates glutamate neurotoxicity in primary cortical cultures. *Proc Natl Acad Sci USA* **88**: 6368-6371, 1991
- 10) **Takahashi N, Cummins D, Caprioli J**: Rat retinal ganglion cells in culture. *Exp Eye Res* **53**: 565-572, 1991
- 11) **Kitano S, Morgan J, Caprioli J**: Hypoxic and excitotoxic damage to cultured rat retinal ganglion cells. *Exp Eye Res* **63**: 105-112, 1996
- 12) **Barnstable CJ, Drager VC**: Thy-1 antigen: A ganglion cell specific marker in rodent retina. *Neuroscience* **11**: 847-855, 1984
- 13) **Liefer D, Lipton SA, Barnstable CJ et al**: Monoclonal antibody to Thy-1 enhances regeneration of processes by rat retinal ganglion cells in culture. *Science* **224**: 303-306, 1984
- 14) **McCaffery CA, Raju TR, Bennet MR**: Effects of cultured astroglia on the survival of neonatal rat retinal ganglion cells in vitro. *Dev Biol* **104**: 441-448, 1984
- 15) **Choi DW, Maulucci-Gedde M, Kriegstein AR**: Glutamate neurotoxicity in cortical cell culture. *J Neurosci* **7**(2) : 357-368, 1987
- 16) **Olney JW, Price M, Salles PK et al**: MK-801 powerfully protects against N-methyl-D-aspartate neurotoxicity. *Eur J Pharmacol* **141**: 357-361, 1987
- 17) **Vige X, Carreau A, Scatton B et al**: Antagonism by N<sup>ε</sup>-nitro-L-arginine of L-glutamate-induced neurotoxicity in cultured neonatal rat cortical neurons, prolonged application enhances neuroprotective efficacy. *Neuroscience* **55**: 893-901, 1993
- 18) **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
- 19) **Sagar SM**: NADPH-diaphorase reactive neurons of the rabbit retina: differential sensitivity to excitotoxins and unusual morphologic features. *J Comp Neurol* **300**: 309-319, 1990
- 20) **Knowles RG, Palacios M, Palmer RMJ et al**: Formation of nitric oxide from L-arginine in the central nervous system: A transduction mechanism for stimulation of the soluble guanylate cyclase. *Proc Natl Acad Sci USA* **86**: 5159-5162, 1989
- 21) **Ahmad I, Leinders-Zufall T, Kocsis JD et al**: Retinal ganglion cells express a cGMP-gated cation conductance activatable by nitric oxide donors. *Neuron* **12**: 155-165, 1994
- 22) **Murphy S, Simmons ML, Agullo L et al**: Synthesis of nitric oxide in CNS glial cells. *Trends Neurol Sci* **16**(8) : 323-328, 1993
- 23) **East SJ, Garghwaite J**: Nanomolar N<sup>ε</sup>-nitroarginine inhibits NMDA-induced cyclic GMP formation in rat cerebellum. *Eur J Pharmacol* **184**: 311-313, 1990
- 24) **Tamura Y, Sato Y, Akaike A et al**: Mechanisms of cholecystokinin-induced protection of cultured cortical neurons against N-methyl-D-aspartate receptor-mediated glutamate cytotoxicity. *Brain Res* **592**: 317-325, 1992