

シンポジウム

東洋医学の新たな展開—基礎と臨床から—
神経細胞傷害に対する漢方薬治療の可能性

¹⁾東洋医学研究所, ²⁾(株)ツムラ 薬理研究所

ゴトウ カズヒロ ヤマウラ ヒサシ シラサカ リユウコウ オヤマ ツトム
後藤 和宏¹⁾²⁾・山浦 常¹⁾・白坂 龍曠¹⁾・尾山 力²⁾

(受付 平成5年1月28日)

Inhibition of Neuronal Damage by the Japanese Herbal Medicine

Kazuhiro GOTO¹⁾²⁾, Hisashi YAMAURA¹⁾, Ryukoh SHIRASAKA¹⁾ and Tsutomu OYAMA²⁾

¹⁾Basic Laboratory Institute of Oriental Medicine, ²⁾Tsumura Research Institute for Pharmacology

The effects of TJ-960, a Japanese Herbal medicine, were studied on neuronal damage in rat hippocampus caused by cobalt-induced seizures or ischemia. Continuous oral administration of TJ-960 from one month prior to the cobalt application showed almost complete protection against neuron loss in the hippocampal CA1 subfield as well as the edema induced by cobalt focus. TJ-960 also inhibited EEG changes in the contralateral cortex following application of cobalt. Morphological and EEG changes of the hippocampus following 10 min of forebrain ischemia were prevented by treatment with TJ-960 from one week prior to ischemia. In rat, treated with TJ-960 only post-ischemia, inhibition of the EEG changes were also observed. In another experiment, the effect of cycloheximide on delayed neuronal death in the hippocampus was morphologically studied in rats subjected to 10 min ischemia. Since it was reported that TJ-960 inhibited intracellular protein changes during pentylentetrazol-induced bursting activity. Neuronal damage of CA1 neurons was dramatically decreased by the lasting inhibition of protein synthesis through consecutive administration of cycloheximide. Cycloheximide, which was administered once within the first 24 h of recirculation, showed protective action on ischemic cell necrosis and its most potent effect was observed when injected at 12 h of post-ischemia. These findings suggest that TJ-960 protects against neuronal degeneration in epileptics or ischemia and the mechanism for the cerebral protective effect of TJ-960 may be due to its inhibitory action on the synthesis of the abnormal protein(s) initiated by excessive excitatory amino acid.

はじめに

中枢神経系の機能を司る神経細胞がもはや新生能力を失っている成熟脳では、神経細胞の脱落がそのまま特定中枢機能の損失を意味し、残存細胞による代償は僅かに期待できるとしても、患者に生涯の後遺症を余儀なくさせることは誰しも認識するところである。

脳虚血や酸欠などにより神経細胞は容易に死に至るが必ずしも脳内全ての神経細胞が一様に傷害を被るわけではなく、選択的に傷害を受け易い細胞群が存在することは古くから指摘されていた。

既に19世紀末には、てんかん患者の脳において海馬の一定領域に限局した病変が認められるとの報告がなされ^{1)~3)}、後にその部位(CA1とCA4)は虚血に対しても特に脆弱であることが判明している⁴⁾。海馬CA1領域の錐体細胞は、その脆弱性や記憶や学習の形成における重要な役割が明らかにされているばかりでなく⁵⁾⁶⁾、短時間の虚血により、病変の完成までに3~4日を要する“遅発性神経細胞壊死”⁷⁾⁸⁾を起こすことから強い関心が寄せられている。

近年、部位特異的な選択的脆弱性の原因が、単

なるエネルギー代謝障害ではなく、普段は重要な神経伝達物質として働いている興奮性アミノ酸の無秩序な放出にあることが明らかにされて以来^{9)~11)}、過剰な興奮性アミノ酸が神経細胞に対して示す毒作用は、虚血性やてんかん性脳障害にとどまらず種々の神経変性疾患の発現や進展との広い関わりにおいて注目を集め、機構解明の精力的な研究が展開されてきた。しかし、海馬 CA1細胞のようにエネルギー代謝や電気生理学的活動からみる限り一度は傷害から立ち直ったかに見える神経細胞が^{12)~14)}、何故一斉に崩壊するのかという疑問は今もって解決されていないのが現状であり、神経細胞傷害に対する有効な治療法を開発するためには、過剰な興奮性アミノ酸に曝された後の神経細胞内で如何なる出来事が進行しているのかを明らかにすることが必須と考えられる。そうした解析を進める上からも海馬に発生する神経細胞傷害は興味深い病態である。

ここでは、我々が研究している漢方薬の中から、興奮性アミノ酸暴露による神経細胞壊死機構の一端を明らかにするに至った方剤を取り上げ、神経細胞傷害に対する漢方薬治療の可能性について述べたい。本研究で用いた小柴胡湯合桂枝加芍薬湯(TJ-960)は、相見により臨床的に抗てんかん作用を示す処方として見出された漢方薬である。本方剤の作用機序については未だ充分な解明が進んでいるとは言い難いが、一般的に抗てんかん薬のスクリーニングで行われる電撃や pentylenetetrazole (PTZ), strychnine を用いた痙攣誘発試験に対しては無効であるにも拘わらず¹⁵⁾、EI マウスやネコ扁桃核 kindling などのてんかんモデル実験系では明らかな効果が認められることなどから¹⁶⁾¹⁷⁾、既存の抗てんかん薬とはその機序を異にすると考えられている。

1. コバルト焦点てんかんモデルにおける海馬神経細胞傷害¹⁸⁾¹⁹⁾

痙攣を頻発する重篤なてんかん患者では海馬神経細胞が脱落し、認知機能にも障害が認められることが知られている。従来より、こうした神経細胞の壊死は、全身痙攣に伴って脳虚血が繰り返し引き起こされた結果と考えられてきた²⁰⁾。ここで

は、持続的な異常脳波の出現を特徴とするコバルト焦点性のてんかんモデルを用い、海馬に発生する傷害を皮質脳波の変化と併せて経時的に観察すると共に、TJ-960の効果を検討した。

焦点性てんかんモデルは、ラット左大脳皮質硬膜上に金属コバルト粉末(50mg)を散布することにより作製した。

コバルト散布4日目頃より対側の皮質脳波にスパイク状の異常波が混じり始め、脳波の異常がピークとなる8~12日後頃には jerks などを頻繁に起こした。一部には全身痙攣に発展する例もみられた(Fig. 1A)。その後、痙攣の発現は次第に減少したが、脳波の異常は約1カ月間持続した。海馬には未だ痙攣が発現していない頃よりてんかん発作性の神経細胞傷害と思われる変化が両側性に発生した。即ち、コバルト散布4日目既に神経細胞は細胞内浮腫の病理像を呈しており、その数も次第に減少した(Fig. 2)。少なくとも本モデ

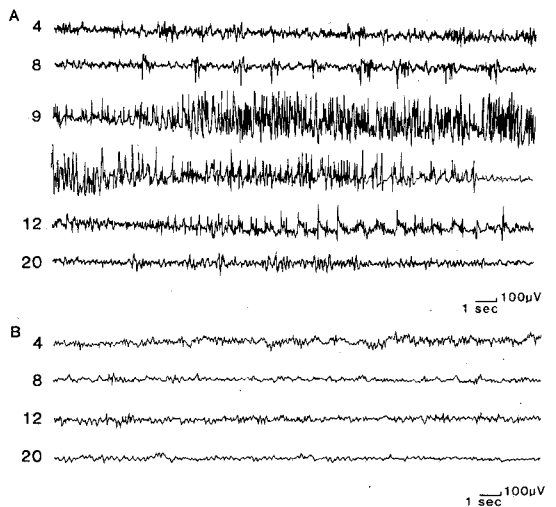


Fig. 1 Typical EEG changes induced by cobalt application to the cerebral cortex and their normalization by TJ-960.

A : EEG changes in the contralateral cortex with cobalt application. B : normalization of EEG with one month prior administration of TJ-960. Numbers on the left indicate days after cobalt application. Note the complete inhibitory effects of TJ-960 on EEG changes. (With permission from Sugaya et al¹⁹⁾)

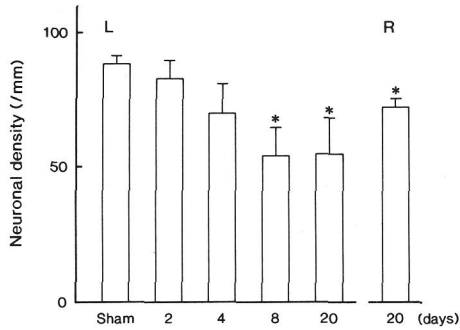


Fig. 2 Changes in the neuronal density of the hippocampal CA1 subfield following cobalt application.

Each column represents mean \pm S.E.M., $n=5$. * $p < 0.05$ compared with the sham-operated group. Numbers below columns indicate days after cobalt application. L: left (cobalt applied side), R: right (contralateral side to cobalt application). (Data modified from Sugaya et al¹⁸⁾)

ルにおいて認められた神経細胞傷害は虚血に起因しておらず、異常な興奮が遠隔領域から伝播することにより海馬に神経細胞壊死が生じ得る可能性を示したものとして興味を持たれる。

TJ-960 (1g/kg, p.o.) の1日2回投与により、異常脳波の出現は7例中5例で抑制され (Fig. 1B)、海馬神経細胞の変性、脱落もほぼ完全に保護されたが (Fig. 3, 4)、本実験において TJ-960が

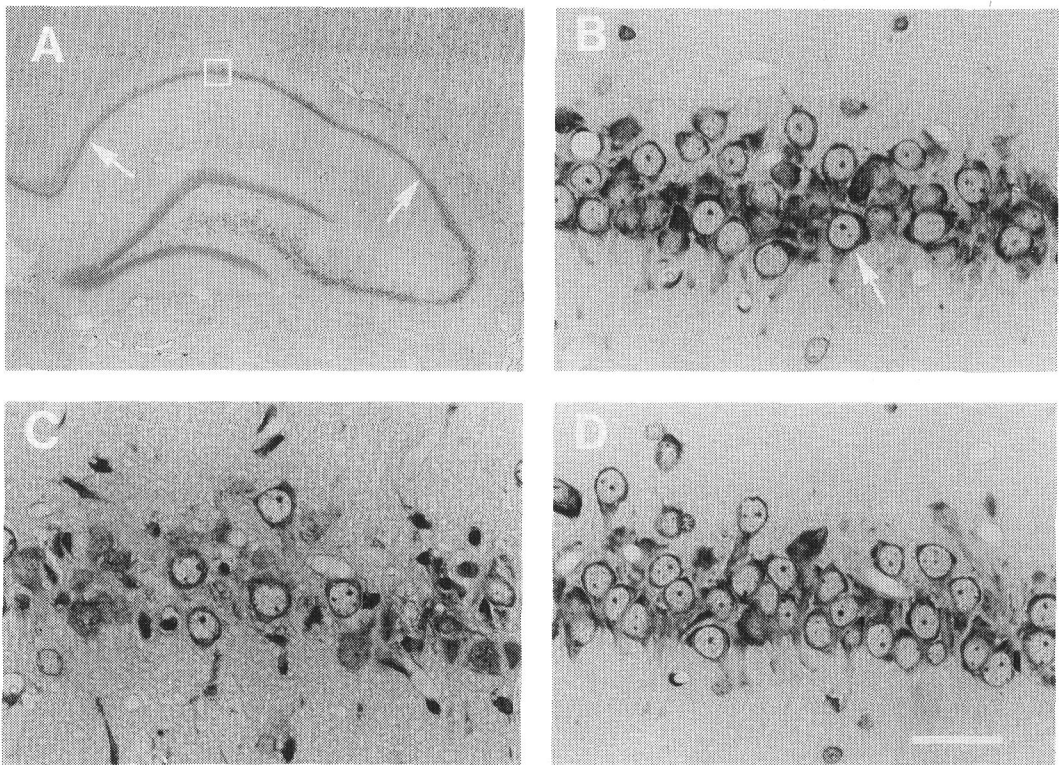


Fig. 3 Representative histological changes in the CA1 subfield of the hippocampus 20 days after cobalt application to the ipsilateral cortex.

A: normal hippocampus. The number of intact pyramidal cells was counted in the CA1 area indicated between arrows. B: higher magnification of squared area of A. Arrow shows standard cell type for counting. C: Distilled water-treated rat hippocampus. Pyramidal cells are mostly degenerated. D: TJ-960-treated rat hippocampus. Pyramidal cells are well preserved. Bar: 30 μ m (Date modified from Sugaya et al¹⁹⁾)

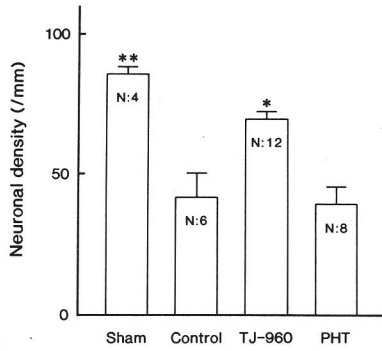


Fig. 4 Neuronal density in the CA1 subfield of the left hippocampi 20 days after application of cobalt and the effects of TJ-960 and phenytoin (PHT).

TJ-960 (2g/kg/day, p.o.) or phenytoin (100mg/kg/day, p.o.) were treated from one month prior to cobalt application to the left cerebral cortex. Each column represents mean±S.E.M., numbers of animal used in each group are shown in the columns. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ compared with the control group. (With permission from Sugaya et al¹⁹⁾)

効果を示すには予めコバルト散布の1カ月前から投与を続けることが必要であり、コバルト処理後から投与を開始しても作用は認められなかった。Phenytoin (50mg/kg, p.o. 1日2回)を同様に1カ月間処置してもこれらの傷害は抑制されなかつ

たことから、TJ-960は既存の抗てんかん薬とは作用機序を異にし、正常細胞に対しても異常な興奮を起こし難くするような変化を生じさせる可能性が考えられた。

Sham operation

10 min ischemia

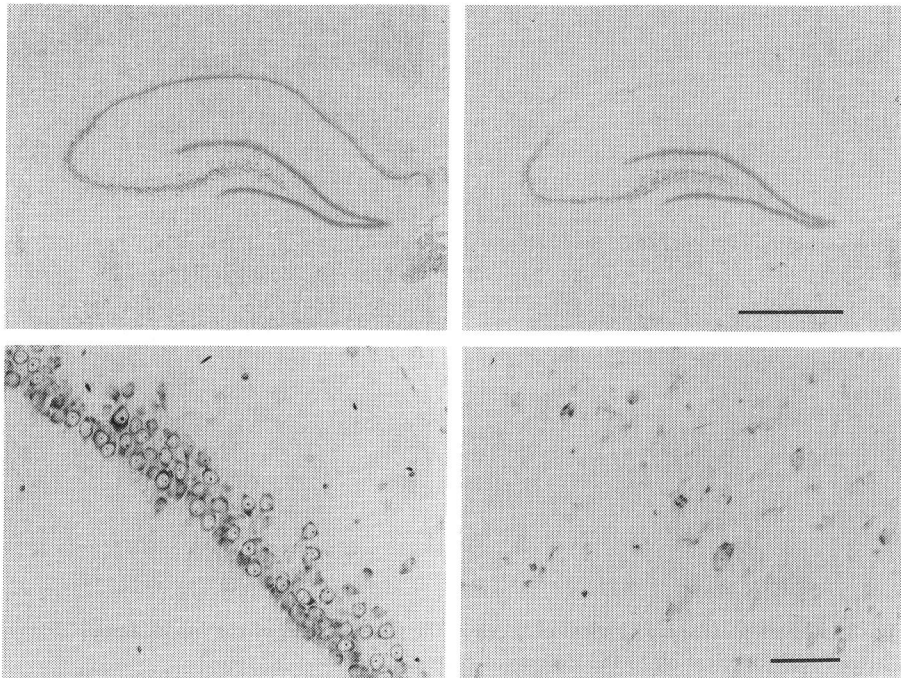


Fig. 5 Representative histological changes in hippocampal CA1 subfield of the rat 3 days after 10 min period of forebrain ischemia.

Almost all pyramidal neurons disappeared. Bars: 1,000 (top) and 50 μ m (Bottom).

2. 虚血性海馬神経細胞傷害²¹⁾

上記の結果により, TJ-960を用いて興奮性アミノ酸誘発の神経細胞傷害を阻止し得る可能性が示唆されたことから, 虚血性海馬神経細胞傷害への応用を試みた。

Pulsinelli and Brierleyの方法²²⁾に従って作製したラット4血管閉塞モデルを用い, 10分間の前脳虚血を負荷すると, 虚血48時間後には偽手術群の73%に相当するCA1細胞を数えることができたにも拘わらず, 72時間目以降の観察では殆どの神経細胞が壊死, 脱落しており (Fig. 5), CA1細胞の機能を反映することが示されている¹³⁾²³⁾海馬 θ 波の振幅も著明に減少した (Fig. 6)。

虚血7日前から TJ-960 (1g/kg, p.o.) を1日2回投与された動物では, 病理学的観察において遅発性神経細胞壊死の発現が抑制されており (Fig. 7), 脳波学的にも形態的に保たれたCA1細胞が本

来の働きを保持していることが確認された。脳波変化を指標とした検討に際し, 虚血後から投与を開始した場合の TJ-960の作用について検討を加えたところ, 本モデルに対しては虚血後からの投与によっても神経細胞保護作用を示すことが見出された (Table)。

既に, グルタミン酸拮抗薬や抗てんかん薬など遅発性神経細胞壊死を保護する薬物は幾つか知られているが, その一方で, これら単に傷害の開始を抑制するに過ぎない薬物では, 虚血後投与による効果は殆ど期待できないことが明らかにされている^{24)~26)}。従って, TJ-960は虚血によって興奮性アミノ酸が過剰に放出された以降の神経細胞傷害過程に何らかの修飾を加えているものと推測された。本方剤については, 痙攣誘発薬である PTZ を神経細胞に処置した際に認められる異常タンパクの産生を抑制することが報告されており²⁷⁾²⁸⁾, 虚

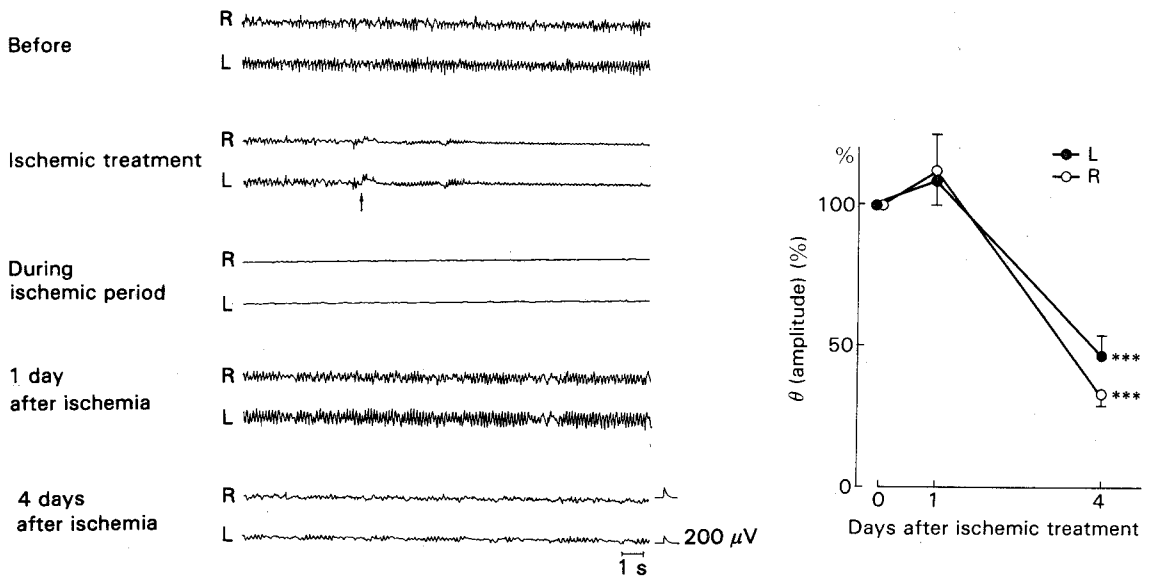


Fig. 6 Changes in the theta wave activity recorded from hippocampal formation of rats subjected to 10 min forebrain ischemia.

The EEG became isoelectric within 1 min of ischemia in all animals that unresponsive and lost their righting reflex. The EEG remained isoelectric throughout the ischemic period, but 1 day afterward no alteration in hippocampal EEG was observed. After 4 days of recirculation, however, the theta wave activity was drastically reduced. Percentage theta amplitude was calculated as the ratio of (4 days after ischemia)/(pre-ischemia). Each point represents mean \pm S.E.M., $n=10$. *** $p < 0.001$ compared with the pre-ischemia amplitude. L: EEG from the left hippocampi, R: EEG from the right hippocampi. (With permission from Sugimoto et al²¹⁾)

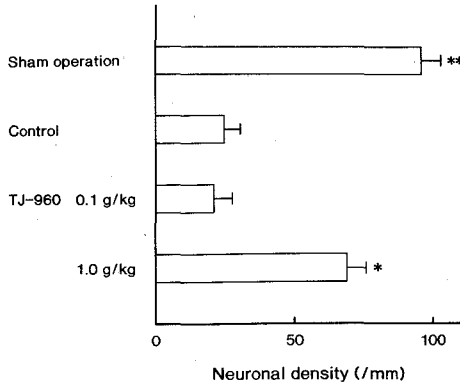


Fig. 7 Protective effect of TJ-960 on ischemia-induced delayed neuronal death in hippocampal CA1 subfield of rats.

TJ-960 was orally administered twice a day for 11 days. On day 8, forebrain ischemia for 10 min was produced by occlusion of 4 major arteries to the brain. The animals were perfusion-fixed on 4 days of post-ischemic survival. Each column represents mean \pm S.E.M., $n=4-8$. * $p<0.05$, ** $p<0.01$ compared with the control group. (Data modified from Sugimoto et al²¹⁾)

Table Protection by pre-or post-treatment of TJ-960 against changes in amplitude of hippocampal theta waves 4 days after 10 min period of fore-brain ischemia in rats

Treatment	N	θ amplitude (%)
Sham-operation	4	110.8 \pm 14.7**
Control (pre)	4	41.3 \pm 14.3
TJ-960 (pre)	8	112.0 \pm 11.7**
Control (post)	5	45.8 \pm 6.6
TJ-960 (post)	8	79.4 \pm 10.9*

Values are mean \pm S.E.M.

TJ-960 (1g/kg, p.o.) was administered twice a day.

* $p<0.05$, ** $p<0.01$ compared with the control group.

(Data modified from Sugimoto et al²¹⁾)

血によって引き起こされるタンパクの質的、量的変化を是正した結果として保護作用を示した可能性も考えられたことから、次に遅発性神経細胞壊死に及ぼすタンパク合成阻害薬の影響について検討した。

3. 遅発性神経細胞壊死に対する cycloheximide の保護作用²⁹⁾

実験には、上記検討と同様にラット 4 血管閉塞

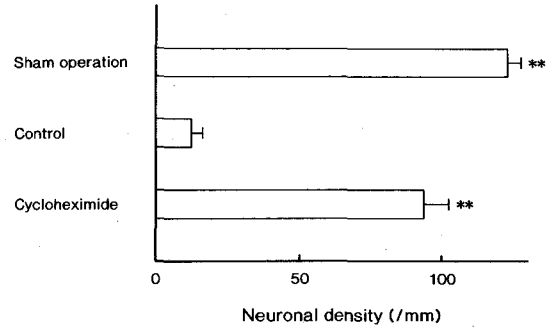


Fig. 8 Protection by consecutive administration of cycloheximide against hippocampal delayed neuronal death at 3 days of post-ischemia in rats subjected to 10 min forebrain ischemia.

Cycloheximide was subcutaneously injected just after recirculation at a dose of 2mg/kg, followed by 1mg/kg every 12 h being at 18 h of post-ischemia. Each column represents mean \pm S.E.M., $n=9-10$. ** $p<0.01$ compared with the saline-treated group. (With permission from Goto et al²⁹⁾)

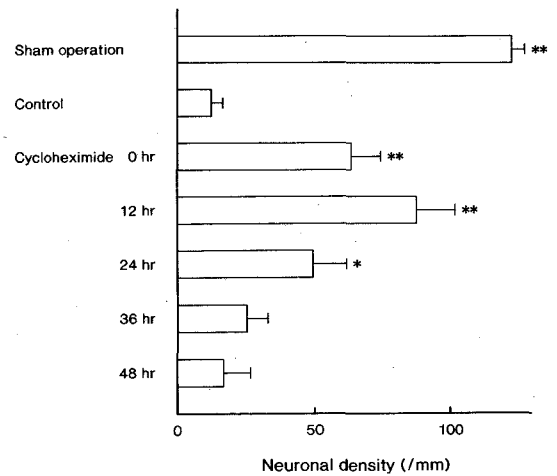


Fig. 9 Protection by single administration of cycloheximide (3mg/kg, s.c.) against hippocampal delayed neuronal death at 3 days of post-ischemia in rats subjected to 10 min fore-brain ischemia.

Cycloheximide was administered at various times of post-ischemia. Each column represents mean \pm S.E.M., $n=9-11$. * $p<0.05$, ** $p<0.01$ compared with the saline-treated group. (With permission from Goto et al²⁹⁾)

モデルを用い、10分間の前脳虚血を負荷した。Cycloheximide を虚血直後に2mg/kg、さらにその18時間後から1mg/kg を12時間毎に皮下投与すると海馬の神経細胞傷害は著明に抑制された (Fig. 8)。3mg/kg を虚血後からの時間間隔を変えて単回投与した検討では、虚血12時間後の投与に最も強い効果が認められた (Fig. 9)。虚血12時間後に投与した emetine (10mg/kg, s.c.) や anisomycin (50mg/kg, s.c.) によっても同様の保護作用が認められたことから、CA1細胞の遅発性神経細胞壊死は、虚血後から産生が開始される細胞傷害性タンパクによって引き起こされている可能性が強く疑われた。さらに、cycloheximide によって保護された海馬 CA1領域における細胞数の変化を虚血後3週間まで検討したところ、虚血後7日目以降に壊死を起こす細胞はみられず、虚血後12時間頃に起こる一過性の異常タンパク産生を抑制すれば、長期的な神経細胞の予後改善が期待できるものと考えられた。

考察とまとめ

海馬の神経細胞以外にも、小脳の Purkinje 細胞や被殻背外側、大脳皮質3、5層などの神経細胞は虚血など対して高い感受性を示すことが知られている⁹⁾。この事実は逆に、脳のかなりの部分は従来考えられていたほど弱くないことも意味しており、選択的脆弱性の機構が解明されれば、脳神経細胞傷害の治療は飛躍的な発展を遂げる可能性がある。選択的脆弱性を示す細胞群の損傷がグルタミン酸をはじめとする興奮性アミノ酸により引き起こされている点に関しては今や疑う余地がないと考えられるが、虚血中シナプス間隙に放出された多量の興奮性アミノ酸も血流が再開すると速やかに虚血前の濃度に復することが示されており³⁰⁾、その後ある時間を経て観察される病変は、興奮性アミノ酸が増加している間に何らかの細胞内反応が始まった結果と考えなければならない。

虚血に比較的抵抗性を示す神経細胞が一度障害されたタンパク合成能を早期に回復するのに対して、海馬 CA1細胞では壊死に至るまで回復が認められないことから、生存に必要なタンパクの産生障害が神経細胞壊死の直接的原因ではないかとす

る仮説は^{31)~33)}、これまで多くの支持を受けていた。しかし、タンパク合成能の障害が細胞壊死の原因だとすれば、持続的にタンパク合成を阻害すると比較的虚血に強い部位にも傷害が発現したはずである。逆に cycloheximide の連続投与によって CA1領域における遅発性神経細胞壊死が著明に抑制されることが示された上記の実験結果は、これまでの仮説を覆すと共に、TJ-960が異常タンパクの産生に対する是正に基づいて神経細胞傷害を抑制している可能性を示唆するものと考えられた。

虚血によって殆どタンパク合成能を失ったかに見える CA1細胞も、RNA 合成能は虚血後早期に回復し³²⁾、ストレスタンパクなど少数のタンパクを盛んに作り出している³⁴⁾。従って、遺伝情報に基づいて自らタンパクを産生し死に至る機構を CA1細胞が潜在的に持つならば、虚血などを切っ掛けとして programmed cell death を起こす可能性もあり得る。能動的な神経細胞壊死の存在は発生学分野では広く知られており^{35)~37)}、機構的にはさほど特殊性はない。ただ、ここで問題になるのは、発生上不用になったり死ぬべき細胞が除去されているのではなく、学習や記憶の形成に重要な役割を担い、個体の生存にとって存在していた方が遙かに都合が良いと考えられる神経細胞が、どうやら過度の興奮性アミノ酸暴露を引金としてその機構が誤って作動した結果、壊死しているらしいことである。Cycloheximide の保護作用が虚血直後よりも12時間後の投与でより顕著に認められ、その頃に起こる一過性のタンパク産生を抑制すれば長期的にも神経細胞の予後改善がみられたことから、細胞傷害性タンパクの産生に関わる mRNA の転写、即ち遺伝情報の読みだし異常は、興奮性アミノ酸に曝された直後のみ起こっていると推測される。

一方、コバルト散布による焦点性てんかんモデルでは、これらの異常が持続していると考えられ、虚血性神経細胞傷害においては虚血後からの投与によっても TJ-960 の効果が認められたにも拘わらず、てんかん発作性の傷害を抑制するためには長期間の前投与を必要とした一因となっているの

かもしれない。コバルト誘発によるてんかんモデルでは、既に異常タンパクの存在が捕えられており、コバルト処理1週間後に増加していたタンパクを大脳皮質に注入すると、てんかん性の発作を再現し得ることも示されている³⁸⁾。従って、TJ-960が直接的にRNAやタンパクの合成を抑制する薬物ならば、コバルト処理後から投与を開始しても連続投与によって産生を絶たれた異常タンパクは次第に消失し、神経細胞傷害は改善されたはずである。本方剤の毒性の低さからみても、異常タンパクの産生に対する抑制作用は、何らかの調節機構を介した結果と考えざるを得ない。

理論的には、タンパクレベルの異常を抑えれば興奮性アミノ酸による神経細胞の傷害を効果的に阻止できることを明らかにした。しかし、実際の治療を考えた場合、RNAやタンパクの合成阻害薬といった極めて毒性の強い化合物を臨床の場に応用することは高い危険性を伴う。機序的には解明すべき点が多く残されているとはいえ、既存の薬物には望み得なかった、傷害が進行し始めた後の治療を可能とするかもしれない漢方薬の存在意義は大きいものとする。有効性と安全性が確認されている方剤を用いて神経細胞傷害の進展を食い止める治療は、今後積極的に試みられても良いのではないだろうか。

本研究の一部は、科学技術庁委託研究により行われた。

文 献

- 1) **Bouchet C, Cazauvieilh**: De l'épilepsie considérée dans ses rapports avec l'aliénation mentale. *Arch Gen Med* 9: 510-542, 1825
- 2) **Sommer W**: Erkrankung des Ammonshorns als ätiologisches Moment der Epilepsie. *Arch Psychiatry* 10: 631-675, 1880
- 3) **Bratz E**: Ammonshornbefunde der Epileptischen. *Arch Psychiat* 31: 820-836, 1899
- 4) **Brierley JB, Graham DI**: Hypoxia and vascular disorders of the central nervous system. *In Greenfield's Neuropathology*. 4th ed (Adams JH, Corsellis JAN, Duchon LW eds) pp125-207, Edward Arnold, London (1984)
- 5) **Volpe BT, Pulsinelli WA, Tribuna J et al**: Behavioral performance of rats following transient forebrain ischemia. *Stroke* 15: 558-562,

1984

- 6) **Zola-Morgan S, Squire LR, Amaral DG**: Human amnesia and the medial temporal region: Enduring memory impairment following a bilateral lesion limited to field CA1 of the hippocampus. *J Neurosci* 6: 2950-2967, 1986
- 7) **Kirino T**: Delayed neuronal death in the gerbil hippocampus following ischemia. *Brain Res* 239: 57-69, 1982
- 8) **Pulsinelli WA, Brierley JB, Plum F**: Temporal profile of neuronal damage in a model of transient forebrain ischemia. *Ann Neurol* 11: 491-498, 1982
- 9) **Wieloch T**: Neurochemical correlates to selective neuronal vulnerability. *In Progress in Brain Research*, Vol. 63 (Kogure K, Hossmann K-A, Siesjö BK et al eds) pp69-85, Elsevier, Amsterdam (1985)
- 10) **Onodera H, Sato G, Kogure K**: Lesions to Schaffer collaterals prevent ischemic death of CA1 pyramidal cells. *Neurosci Lett* 68: 169-174, 1986
- 11) **Johansen FF, Jørgensen MB, Diemer NH**: Ischemic CA-1 pyramidal cell loss is prevented by preischemic colchicine destruction of dentate gyrus granule cells. *Brain Res* 377: 344-347, 1986
- 12) **Suzuki R, Yamaguchi T, Li C-L et al**: The effects of 5-minute ischemia in Mongolian gerbils: II. Changes of spontaneous neuronal activity in cerebral cortex and CA1 sector of hippocampus. *Acta Neuropath (Berl)* 60: 217-222, 1983
- 13) **Monmaur P, Thomson MA, M'Harzi M**: Temporal changes in hippocampal theta activity following twenty minutes of forebrain ischemia in the chronic rat. *Brain Res* 378: 262-273, 1986
- 14) **Arai H, Passonneau JV, Lust WD**: Energy metabolism in delayed neuronal death of CA1 neurons of the hippocampus following transient ischemia in the gerbil. *Metabol Brain Dis* 1: 263-278, 1986
- 15) **Ishige A, Takeda S, Tsuda T et al**: General pharmacology of 'Tsumura' Shoshaikoto-go-keishikashakuyaku extract, TJ-960 (1) effects on the central nervous system. *Pharmacometrics* 33: 59-66, 1987
- 16) **Sugaya E, Ishige A, Sekiguchi K et al**: Inhibitory effect of a mixture of herbal drugs (TJ-960, SK) on pentylentetrazol-induced convulsions in E1 mice. *Epilepsy Res* 2: 337-339, 1988
- 17) **Iizuka S, Ishige A, Sekeguchi K et al**: Effect of Sho-saiko-to-go-keishi-ka-shakuyaku-to

- (TJ-960) on generalized seizure in amygdaloid kindled cats. *In* Recent Advances in the Pharmacology of Kampo (Japanese Herbal) Medicines (Hosoya E, Yamamura Y eds) pp62-68, Excerpta Medica, Tokyo (1988)
- 18) **Sugaya E, Ishige A, Sekiguchi K et al**: Damage of hippocampal neurons caused by cobalt focus in the cerebral cortex of rats. *Brain Res* 459 : 196-199, 1988
 - 19) **Sugaya E, Ishige A, Sekiguchi K et al**: Protective effects of TJ-960 herbal mixture on hippocampal neuron damage induced by cobalt focus in the cerebral cortex of rats. *J Ethnopharmacol* 34 : 13-19, 1991
 - 20) **Dam AM**: Hippocampal neuron loss in epilepsy and after experimental seizures. *Acta Neurol Scand* 66 : 601-642, 1982
 - 21) **Sugimoto A, Ishige A, Sudo K et al**: Protective effect of Shosaiko-to-go-keishi-kashakuyaku-to (TJ-960) against cerebral ischemia. *In* Recent Advances in the Pharmacology of Kampo (Japanese Herbal) Medicines (Hosoya E, Yamamura Y eds) pp112-119, Excerpta Medica, Tokyo (1988)
 - 22) **Pulsinelli WA, Brierley JB**: A new model of bilateral hemispheric ischemia in the unanesthetized rat. *Stroke* 10 : 267-272, 1979
 - 23) **Monmaur P, Allix M, Schoevaert-Brossault D et al**: Effects of transient cerebral ischemia on the hippocampal dentate theta (θ) profile in the acute rat: A study 4-5 months following recirculation. *Brain Res* 508 : 124-134, 1990
 - 24) **Kirino T, Tamura A, Sano K**: A reversible type of neuronal injury following ischemia in the gerbil hippocampus. *Stroke* 17 : 455-459, 1986
 - 25) **Swan JH, Evans MC, Meldrum BS**: Long-term development of selective neuronal loss and the mechanism of protection by 2-amino-7-phosphonoheptanoate in a rat model of incomplete forebrain ischaemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 8 : 64-78, 1988
 - 26) **Sternau LL, Lust WD, Ricci AJ et al**: Role for γ -aminobutyric acid in selective vulnerability in gerbils. *Stroke* 20 : 281-287, 1989
 - 27) **Sugaya E, Takagi T, Kajiwara K et al**: Effect of Sho-saiko-to-go-keishi-kashakuyaku-to (TJ-960) on ionic channels of the neuronal membrane. *In* Recent Advances in the Pharmacology of Kampo (Japanese Herbal) Medicines (Hosoya E, Yamamura Y eds) pp82-96, Excerpta Medica, Tokyo (1988)
 - 28) **Uyemura K, Tanaka S, Wang Y et al**: Effect of Sho-saiko-to-go-keishi-kashakuyaku-to (TJ-960) on pentylenetetrazol-induced protein changes in primary cultured cerebral cortical neurons. *In* Recent Advances in the Pharmacology of Kampo (Japanese Herbal) Medicines (Hosoya E, Yamamura Y eds) pp97-101, Excerpta Medica, Tokyo (1988)
 - 29) **Goto K, Ishige A, Sekiguchi K et al**: Effects of cycloheximide on delayed neuronal death in rat hippocampus. *Brain Res* 534 : 299-302, 1990
 - 30) **Benveniste H, Drejer J, Schousboe A et al**: Elevation of the extracellular concentrations of glutamate and aspartate in rat hippocampus during transient cerebral ischemia monitored by intracerebral microdialysis. *J Neurochem* 43 : 1369-1374, 1984
 - 31) **Thilmann R, Xie Y, Kleihues P et al**: Persistent inhibition of protein synthesis precedes delayed neuronal death in postischemic gerbil hippocampus. *Acta Neuropath (Berl)* 71 : 88-93, 1986
 - 32) **Kogure K, Tanaka J, Araki T**: The mechanism of ischemia-induced brain cell injury. The membrane theory. *Neurochem Pathol* 9 : 145-170, 1988
 - 33) **Xie Y, Seo K, Hossmann K-A**: Effect of barbiturate treatment on post-ischemic protein biosynthesis in gerbil brain. *J Neurol Sci* 92 : 317-328, 1989
 - 34) **Kiessling M, Dienel GA, Jacewicz M et al**: Protein synthesis in postischemic rat brain: A two-dimensional electrophoretic analysis. *J Cereb Blood Flow Metab* 6 : 642-649, 1986
 - 35) **Truman JW**: Cell death in invertebrate nervous systems. *Annu Rev Neurosci* 7 : 171-188, 1984
 - 36) **Fahrbach SE, Truman JW**: Mechanisms for programmed cell death in the nervous system of a moth. *In* Selective Neuronal Death (Bock G, O'Connor M eds) pp65-81, John Wiley and Sons, New York (1987)
 - 37) **Martin DP, Schmidt RE, DiStefano PS et al**: Inhibitors of protein synthesis and RNA synthesis prevent neuronal death caused by nerve growth factor deprivation. *J Cell Biol* 106 : 829-844, 1988
 - 38) **Onozuka M, Imai S**: Induction of epileptic seizure activity by a specific protein from cobalt-induced epileptogenic cortex of rats. *Brain Res* 507 : 143-145, 1990