

---

---

原 著

---

---

NMDA 型グルタミン酸受容体  $\epsilon$  1 サブユニットは  
虚血性脊髄神経細胞死機構の主要な因子である

新潟大学大学院医歯学総合研究科

呼吸循環外科学分野

(主任: 林 純一教授)

島田 晃治

**Spinal Cord Injury by Transient Ischemia is Reduced in Mice Deficient  
in the  $\epsilon$  1 (NR 2 A) Subunit of NMDA Receptor Channel**

**Koji SHIMADA**

*Division of Thoracic and Cardiovascular Surgery,*

*Niigata University Graduate School of*

*Medical and Dental Science*

*(Director: Prof. Jun-ichi HAYASHI)*

**Abstract**

The role of glutamate neurotoxicity in spinal cord has been advocated but still remains controversial. In spinal cord, as well as other central nervous system tissues, glutamate receptors are thought to participate in neuronal cell death by transient ischemia, but it is not clear which subtype of glutamate receptor channels acts in the mechanism of excitotoxicity. To elucidate the involvement of glutamate receptors, especially NMDA receptors, in spinal cord ischemic injury, we used mutant mice deficient in the  $\epsilon$  1 (NR 2 A) subunit of NMDA receptor. The mutant mice were subjected to transient spinal cord ischemia by clamping aortic arch and left subclavian artery and examined for 48 hours after ischemia. Their motor dysfunction and histopathological damage were significantly milder compared

---

**Reprint requests to:** Koji SHIMADA  
Division of Thoracic and Cardiovascular  
Surgery Niigata University Graduate School  
of Medical and Dental Science  
1-757 Asahimachi-dori,  
Niigata 951-8510 Japan

別刷請求先: 〒951-8510 新潟市旭町通り1-757  
新潟大学大学院医歯学総合研究科呼吸循環外科学分野  
島田 晃治

with wild type mice. These results indicate that NMDA receptors which contain  $\epsilon$  1 subunit play important role in the mechanism of neurotoxicity in spinal cord.

**Key words:** NMDA receptor channel, glutamate,  $\epsilon$  1 subunit, neurotoxicity, spinal cord ischemia

## はじめに

胸腹部大動脈瘤の手術において、脊髄の一過性虚血による対麻痺は大きな合併症として未だ重大な問題となっている。虚血性の神経細胞死の機序に関しては、近年様々な研究が行われてきており、虚血によっておこるグルタミン酸受容体 (GluR) の過剰な活性化がこの神経細胞死の主要な原因であり、いわゆる「興奮性細胞死」の鍵となる分子として注目されている<sup>1)</sup>。すなわち、過剰なグルタミン酸受容体の活性化が細胞内Caイオン濃度の上昇をもたらし、Caイオン依存性の細胞内酵素の活性化により神経細胞のネクロシスやアポトーシスを誘導すると考えられている。グルタミン酸受容体はNMDA型、AMPA型、kinate型の3種類のサブタイプに分類されているが、そのうちNMDA型グルタミン酸受容体 (NMDA受容体) は高いCaイオン透過性を持ち、細胞外Caイオンの細胞内への流入の重要な経路の1つであり、3種類のグルタミン酸受容体のうち最も神経細胞死の機構に関与しているという<sup>2)</sup>。NMDA受容体の阻害剤が虚血から脊髄の障害を保護するという報告もこの考えを支持している<sup>8)15)</sup>。一方で $\alpha$ 2サブユニットを含まないAMPA型グルタミン酸受容体もまたCaイオン透過性を持ち、Caイオンの細胞内流入経路の1つとなりうると考えられている。AMPA型受容体の阻害剤もまた神経保護作用があると報告されている<sup>16)</sup>。しかしながら、それぞれのグルタミン酸受容体サブタイプが脊髄における虚血性の神経細胞死にどのように関わっているか未だ詳細は不明である。

NMDA受容体はGluR $\epsilon$  (NR2)サブユニットとGluR $\zeta$  (NR1)サブユニットの複合体によって構成されている。 $\zeta$ サブユニットはグリシンの結合部位であり、 $\epsilon$ 1-4 (NR2A-D)サブユニットはグルタミン酸の結合部位を構成する<sup>7)11)</sup>。中

枢神経系において $\zeta$ サブユニットは広範囲に発現分布しているが $\epsilon$ サブユニットはそれぞれ独特の発現分布を示す<sup>18)19)</sup>。脊髄においては $\epsilon$ 1及び $\zeta$ 1サブユニットが主に発現していることから本研究ではGluR $\epsilon$ 1サブユニットのノックアウトマウスを用いて、脊髄虚血モデルにより虚血性脊髄神経の障害におけるNMDA受容体の関与を検討することとした。

脊髄虚血の動物実験モデルマウス・ラット・ウサギなどの様々な種で作製され報告されている<sup>6)10)20)</sup>。これらの動物の中でマウスは血管系の解剖が人間と非常によく似ており、胸腹部の大血管の手術時と同様の病態を再現することが可能である。またマウスは遺伝子操作が容易であり遺伝子改変により、その遺伝子産物である分子の生体内での生理活性の検討に適している。本研究ではマウス脊髄虚血モデルを高い再現性で確立し、 $\epsilon$ 1ノックアウトマウスを用いて虚血性脊髄障害の分子機構の解明を試みた。

## 材料と方法

### 実験動物

実験動物は野生型マウスとしてC57BL/6を用いた。GluR $\epsilon$ 1サブユニット欠損マウスはジーンターゲットングを用いて相同組み換えを利用して作製されたものを用いた<sup>9)</sup>。なおこのマウスは12代のバッククロスにより遺伝子背景はC57BL/6と同様となっている。

### ウエスタンブロット解析

野生型及びノックアウトマウスを麻酔下に犠牲死させ直ちにそれぞれの脊髄を摘出し、10倍量の緩衝液 (10mM tris-Cl, pH 7.2, 5mM EDTA, 0.32% スクロース) でホモゲナイズ後700×gで10分間遠心し、上清のpostnuclear fraction

を試料とした。Lowry 法で蛋白濃度を測定し、各サンプル50 $\mu$ g を7% SDS-PAGE で分離した。Electro-blot 法でニトロセルロースフィルターに転写し、ブロッキング (5% スキムミルクで室温で1時間振盪)、一次抗体反応 ( $\epsilon$  1 サブユニット抗体は1 $\mu$ g/ml, NSE 抗体は1 $\mu$ g/ml)、二次抗体反応 (ペルオキシダーゼ標識抗ウサギ IgG 抗体 (Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, England) を4000倍希釈し、1時間インキュベート) させ ECL (Amersham Pharmacia Biotech) にて発色させ X 線フィルムに感光させた。

#### 免疫組織化学

ペントバルビタール (100mg/kg) による麻酔下に動物を、4% パラホルムアルデヒドにより灌流固定し、脊髄を摘出しパラフィンに包埋後5 $\mu$ m の水平断切片を作製しスライドガラスに貼付した。脱パラフィン後切片を1mg/ml ペプシン-PBS で37 $^{\circ}$ C, 11分間インキュベートした<sup>5)</sup>。PBS で洗浄した後、ブロッキング (10% 正常ヤギ血清, 室温30分間)、一次抗体反応 ( $\epsilon$  1 サブユニット抗体1 $\mu$ g/ml で室温10時間)、二次抗体反応 (ビオチン標識抗ウサギ IgG 抗体で室温1時間)、ペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジンで室温30分間インキュベートし3,3'-diaminobenzidipine で発色させた。ブロッキング、二次抗体、ストレプトアビジンは Histofine SAB-PO (R) kit (Nichirei, Tokyo, Japan) を用いた。

#### 運動機能評価

虚血後3, 6, 24, 48時間後にそれぞれのマウスの後肢の運動機能は0-6点の範囲で点数化して評価した<sup>12)</sup>。下記のように後肢の歩行状態について0-4点の範囲で点数化し、マウスを持ち上げ着地させ、歩行開始をさせた時の状態に関して0-2点の範囲で点数化してそれを合計して運動機能の評価とした。<後肢の歩行状態> 0点: 正常に歩行, 1点: 後肢のつま先は腹部の下にあるが運動失調を認める, 2点: 歩行時には後肢は指先で歩く, 3点: 後肢は動くが歩行は不可能, 4点: 全く後肢は動かず後肢を引きずっている。<歩行開始状態> 0点: 正常, 1点: 減弱, 2点: 消失。

#### 組織学的評価

実験に用いたマウスは48時間後に犠牲死させた。4% パラホルムアルデヒドで灌流固定した後に全脊髄を注意深く採取し、同固定液で4 $^{\circ}$ Cで一晩、後固定した。パラフィン包埋した後、腰髄L1-L4のレベルで水平断し5 $\mu$ m 切片を作製しヘマトキシリン・エオジン染色し光学顕微鏡で観察した。それぞれの切片につき脊髄の前半分の範囲で生存している神経細胞数をカウントした。1個体につき4枚の切片で左右それぞれで数えて平均を求めた。神経細胞は細胞質がエオジン好染性のものは壊死細胞と判断し、ヘマトキシリン好染性のものは生存細胞と判断した。

#### マウス脊髄虚血モデル

Lang-Luzdunski らの方法に準拠してマウス脊髄虚血モデルを作製した<sup>10)</sup>。ペントバルビタールを腹腔内に注入 (75mg/kg) して全身麻酔をかけヘパリン500 IU/kg を皮下注射してから自発呼吸下に実験を行った。マウスを仰臥位として頸胸部の正中を皮膚切開し胸骨を上端から第二肋間まで切開した。脊髄肋間動脈への側副血行路として重要と思われる左内胸動脈は9-0 ナイロン糸で結紮した。大動脈弓と左鎖骨下動脈を剥離し、左総頸動脈と左鎖骨下動脈の間で大動脈を遮断、さらに左鎖骨下動脈を起始部で遮断した。遮断時間は11および13分間として、その後遮断を解除し再灌流した。術中は直腸温を持続的に測定して heating pad を用いて36.5 $\pm$ 0.5 $^{\circ}$ C を維持するようにした。

## 結 果

#### GluR $\epsilon$ 1 サブユニットタンパクの脊髄における発現

ウエスタンブロット解析によりノックアウトマウスおよび野生型マウスの脊髄における  $\epsilon$  1 サブユニットタンパクの発現を調べた。野生型マウスでは強くタンパクの発現を認めたが、ノックアウトマウスでは発現がないことを確認した。一方でコントロールとして調べた NSE タンパクは両者で同様に発現していた (図 1A)。

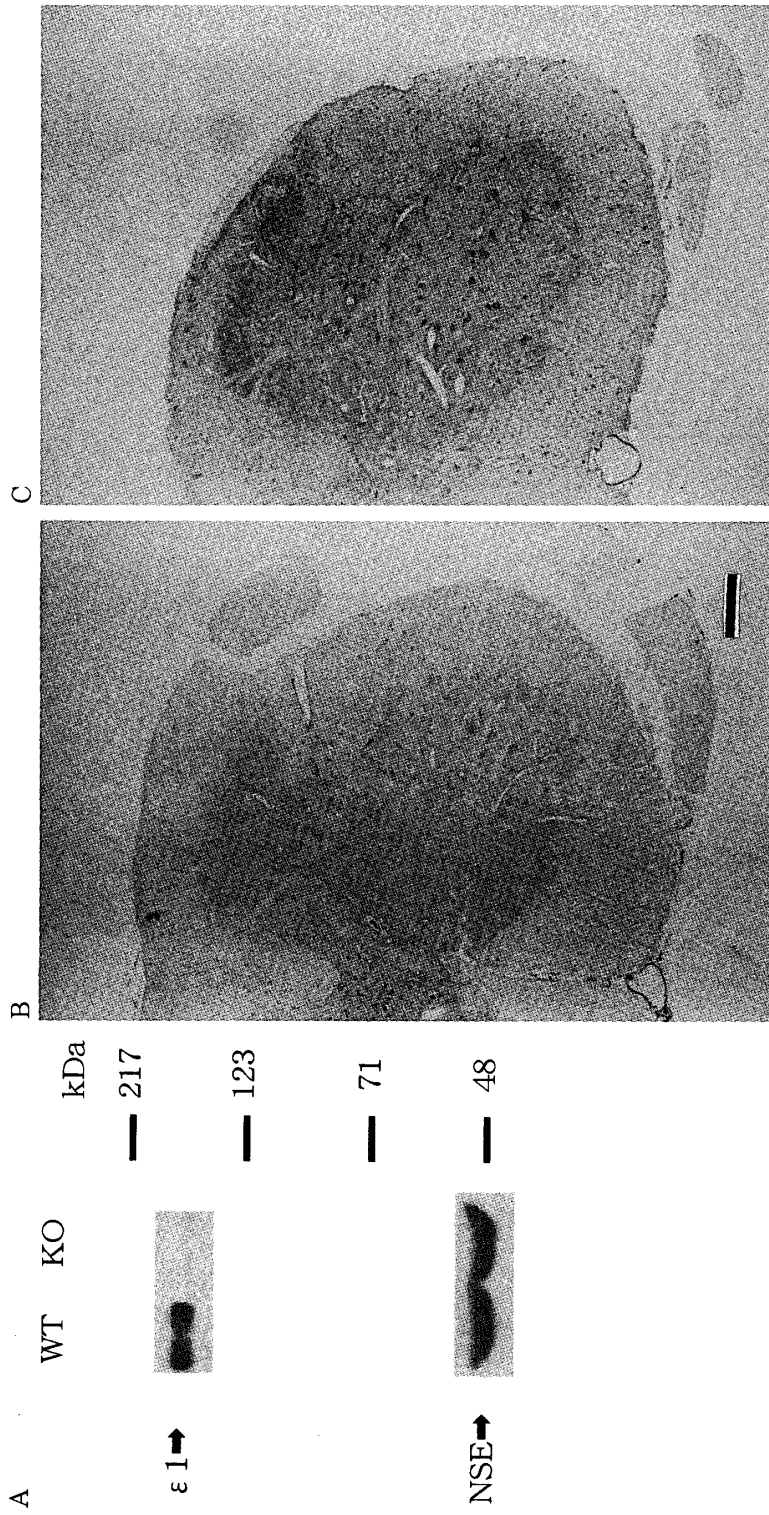


図1 NMDA受容体ε1サブユニット蛋白の脊髄における発現

A. ウェスタンブロットによりマウス脊髄における受容体蛋白の発現を調べた。野生型マウス (WT) では約200 kDaのε1サブユニット蛋白のバンドを認めたが、GluRε1ノックアウトマウス (KO) では蛋白は検出できなかった。対照としてのNSE蛋白は同等に発現していた。

B, C. マウス腰髄のε1サブユニット抗体による免疫組織染色。野生型マウス (B) では神経細胞が染色されるが、GluRε1ノックアウトマウス (C) では染色は認めずε1サブユニットは検出できなかった。スケールバーは0.1mmを示す。

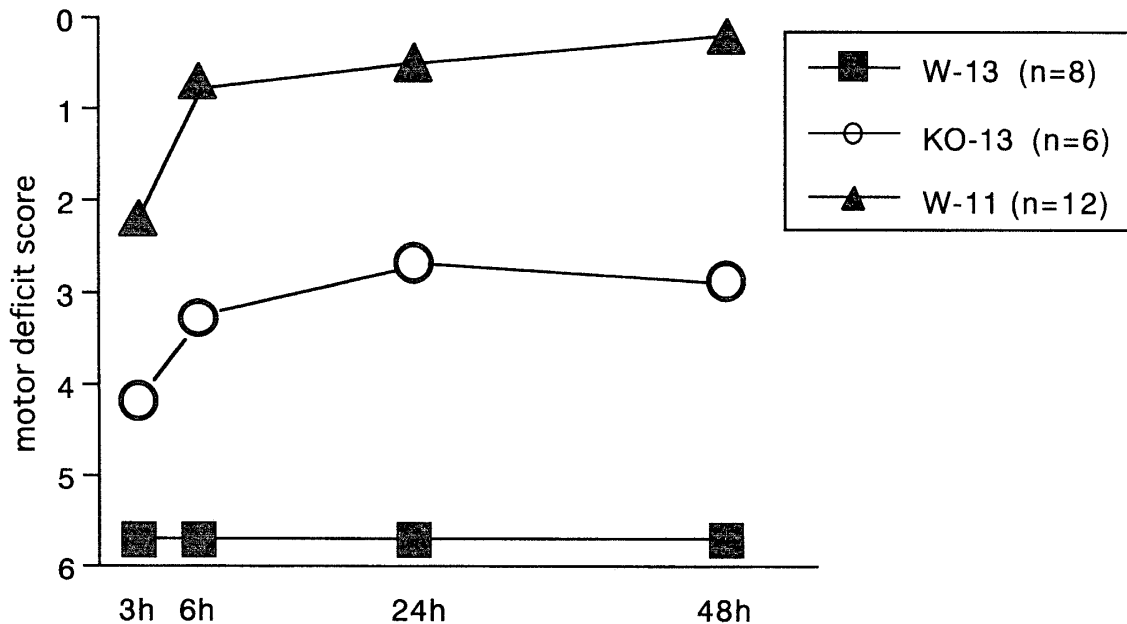


図2 運動機能障害の経時的変化

虚血後48時間までの運動機能障害を点数化した。野生型マウスでは13分間虚血によりほぼ完全対麻痺を認めたが、11分間虚血では実験直後に軽度の運動機能障害を認めたものの48時間後にはほぼ完全に回復した。これに対して  $\text{GluR}\epsilon 1$  ノックアウトマウスでは、13分間虚血により起こる運動機能障害は中等度であった。各時点での運動機能スコア (MDS) は各群間で有意差を認めた ( $p < 0.05$ , Mann-Whitney U-test)。

また脊髄における  $\epsilon 1$  サブユニットタンパクの分布を調べるため免疫組織化学染色を行った。野生型マウスの脊髄灰白質では前角の大型運動神経に特に強く、さらに中間灰白質の小型の介在神経細胞においても強い  $\epsilon 1$  サブユニットタンパクの発現を認めたが、ノックアウトマウスではタンパクの発現は全く検出できなかった (図1B, C)。

**$\text{GluR}\epsilon 1$  サブユニット欠損マウスでは運動機能障害が軽減された**

野生型マウスでは11分間の虚血により術後には急性の不全対麻痺が出現した。虚血3時間後は軽度の麻痺を認めたが48時間後にはほぼ正常に回復した。運動障害スコア (MDS) は3, 6, 24, 48時間後でそれぞれ平均2.2, 0.7, 0.5, 0.2点であった (A群,  $n = 6$ ) (図2)。しかし13分間の虚血では術後重度の運動障害を呈し観察期間を通じて完全対麻痺であった。MDSは3, 6, 24, 48時間後でそれぞれ5.8, 5.8, 5.8, 5.8点であった (B群,  $n = 8$ )。

一方ノックアウトマウスでは13分間の虚血でも運動機能障害は比較的軽度であり経時的に回復が見られた。MDSは3, 6, 24, 48時間後でそれぞれ4.2, 3.3, 2.7, 2.9点であり (C群,  $n = 12$ )、それぞれの群の間には有意差を認めた (Mann-Whitney U-test,  $p < 0.05$ )。

**$\text{GluR}\epsilon 1$  サブユニット欠損マウスでは虚血による神経細胞死が軽度であった**

13分間虚血により腰髄の組織学的変化もまた野生型マウスとノックアウトマウスでは明らかな違いが認められた。野生型マウス13分間虚血群 (B群) では脊髄前角および中間灰白質のほぼ全ての神経細胞が激しく変性し、いわゆる“red neuron”が散在していた。さらに間質は高度に浮腫状となっていた (図3)。これに対してノックアウトマウス13分間虚血群 (C群) では組織変化は野生型と比べて軽く、一部の神経細胞はエオジン好性に染まり壊死していたが大部分の神経細胞が正常であった。また間質の浮腫もわずかであった。一方、野生

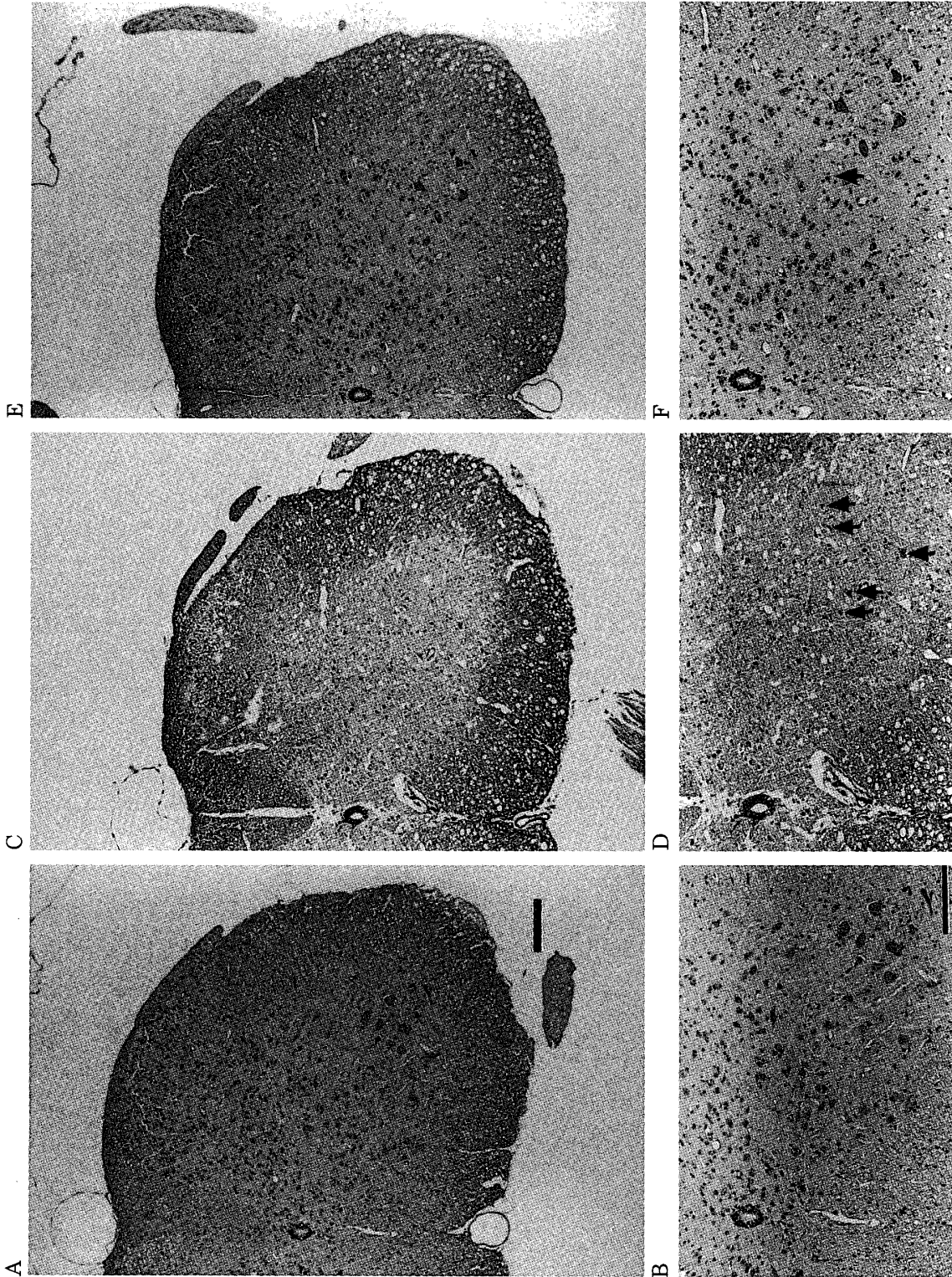


図3 脊髄のヘマトキシリン・エオジン染色像

A, B: 正常マウスの脊髄. C, D: 野生型マウス13分間虚血群. 神経細胞はほとんど全て壊死・脱落し, 強い間質の浮腫を認める. 壊死した神経細胞 (red neuron) が散在している. E, F: GluR  $\epsilon$  1ノックアウトマウス13分間虚血群. 神経細胞は一部変性・壊死しているが大部分は正常形態を保ち, 間質の変化も軽度である. 矢印は壊死細胞 (red neuron) を示す. スケールバーは0.1mmを示す.



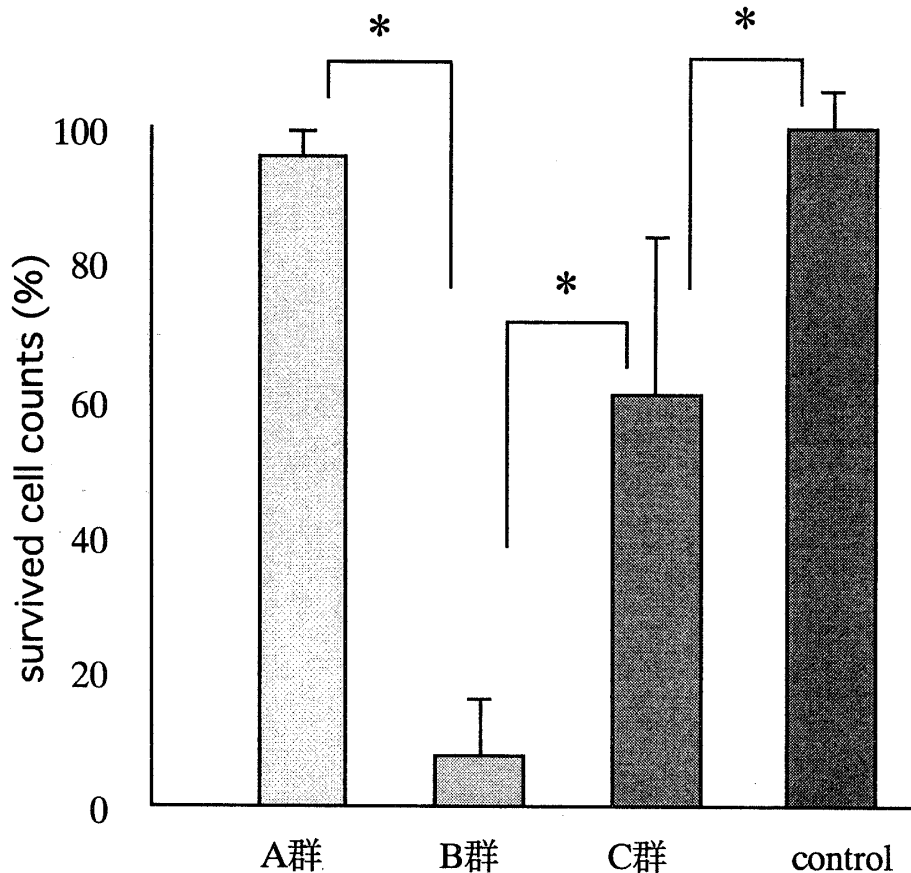


図4 虚血48時間後の脊髓前角の生存神経細胞数

野生型マウス11分間虚血群 (A群) では細胞数は, 正常マウス脊髓 (control) における神経細胞数と差は認めなかった. これに対して野生型マウス13分間虚血群 (B群) ではほぼ全ての細胞が死滅していた. GluR $\epsilon$ 1ノックアウトマウスでは13分間虚血群 (C群) では野生型マウスよりは生存細胞は多かったが, 正常マウスよりは減少していた. 各群間には統計学的有意差を認めた.

細胞数は平均値および標準偏差を, 未実験マウス脊髓の細胞数に対する割合で示した (\* $p < 0.05$  student t-test).

型マウス11分間虚血群 (A群) の脊髓の組織像が未実験マウスの正常脊髓と明らかな違いは指摘できなかった.

これら虚血による組織の障害を定量化するために脊髓灰白質の前角部分の神経細胞数を数えて比較検討した (図4). B群ではほぼ全ての神経細胞が死滅し生存細胞は平均 $5.2 \pm 5.4$ 個であった ( $n = 6$ ). これに対してC群では平均 $41.3 \pm 15.8$ 個の神経細胞が生存しており有意な差を認めた. またC群と正常脊髓組織の神経細胞数の間にも有

意差を認めた (student t-test,  $p < 0.05$ ). 未実験のマウス脊髓の前角部分の神経細胞数は野生マウス, ノックアウトマウスともにほぼ同様でそれぞれ $62.9 \pm 3.3$ 個と $67.9 \pm 3.8$ 個であった. A群における脊髓の生存細胞数は $65.4 \pm 3.6$ 個で正常と比べて統計学的有意差は認めなかった.

## 考 察

本研究は一過性虚血による脊髓障害が NMDA

受容体  $\epsilon$  1 ノックアウトマウスで軽減されていることを初めて示した。

NMDA 受容体は  $\epsilon$  および  $\delta$  サブユニットの複合体として生体内で機能している<sup>2)</sup>。成体マウスの脊髄においては  $\epsilon$  1 および  $\delta$  サブユニットが優位に分布している<sup>19)</sup>。今回行ったウエスタンブロットおよび免疫組織染色の結果から  $\epsilon$  1 サブユニット遺伝子のノックアウトマウスの脊髄には  $\epsilon$  1 サブユニット蛋白が完全に欠落していることが確認された。

胸腹部の大動脈手術では術中に脊髄の虚血が起こることがあり、神経障害により起こる対麻痺は重篤な合併症として未だに未解決の問題となっている。この病態の機構の研究のために、近年では脊髄虚血の動物モデルが様々な種で作製されている<sup>6)10)21)</sup>。本研究では虚血による脊髄障害の検討に際してマウス脊髄虚血モデルを作製した<sup>10)</sup>。このモデルでは左鎖骨下動脈以下の血流の途絶により肋間動脈から分岐している脊髄の栄養血管もまた血流が減少し、脊髄は虚血状態となる。主要な栄養血管である前脊髄動脈により栄養されている脊髄前角の運動神経細胞は海馬 CA1 神経などと同じく虚血に対して非常に脆弱な神経細胞であり、短時間であっても一過性の虚血により急性の壊死に至ることが示された。

また、このモデルではわずか数分間の虚血時間の違いでその結果生じる障害は非常に異なっていた。すなわち野生型マウスにおいて11分間の虚血による障害は可逆的で48時間後にはほぼ完全に回復したが、13分間虚血では障害は不可逆的で完全な対麻痺を認めたのである。脊髄の組織学的検討においても同様に13分間虚血群のマウス脊髄では全ての神経細胞が強く変性していたが、11分間虚血群においては組織変化は軽度で未実験のマウスの正常脊髄組織との差は認められなかった。この結果から、脊髄の神経細胞においては虚血による急性の神経障害はある虚血時間までは可逆的であるが、時間的閾値を越えた虚血にさらされるとその障害は不可逆的となり細胞は死に至るものと思われる。海馬 CA1 神経細胞や小脳顆粒細胞などの脊髄以外の中枢神経組織においても同様の性質

が報告されている<sup>3)4)</sup>。このことから薬剤などの何らかの方法で神経障害が不可逆になる虚血時間を延長させることにより、不可逆的な脊髄障害を予防できる可能性が示唆される。

これまで虚血による脊髄の興奮性細胞死における NMDA 受容体の関与については様々な報告がされてきた<sup>13)15)17)</sup>。しかし NMDA 受容体のどのサブユニットが脊髄の興奮性細胞死に関与するかを検討した報告はなかった。本研究では、脊髄において  $\epsilon$  1 サブユニットが豊富に存在しているのにかかわらず他の  $\epsilon$  サブユニットがほとんど存在しない事に着目し、 $\epsilon$  1 サブユニットが神経細胞死に強く関与しているのではないかと考えた。そこで  $\epsilon$  1 サブユニットの関与を検討するために  $\epsilon$  1 サブユニットのノックアウトマウスを用いた実験を試みた。その結果、野生型マウスでは13分間の虚血により激しい運動機能障害と脊髄の組織学的変化を呈したが、ノックアウトマウスにおいては障害は有意に軽度であった。大脳の部分的な虚血による神経障害が  $\epsilon$  1 ノックアウトマウスでは野生型マウスよりも軽度であったという報告もあり<sup>14)</sup>、本研究の結果から脊髄においては  $\epsilon$  1 サブユニットを含む NMDA 受容体が一過性虚血による興奮性神経細胞死に関与していることが明らかとなった。

今回の検討では虚血の48時間後までの観察しか行っていないが、それ以後に運動機能が回復する可能性は否定できない。しかし神経細胞の虚血後の障害は経時的に増強するという報告があり<sup>4)</sup>、48時間後の障害は不可逆的であると判断した。それゆえ、少なくとも虚血48時間後までの急性期においては  $\epsilon$  1 サブユニットを含み NMDA 受容体が興奮性神経細胞死の機構において重要な役割を果たしていると考えられる。組織学的評価の方法に関しては HE 染色でのみ観察を行い生存細胞を計測したが、壊死した細胞数そのものの計測および比較は行っていない。TUNEL 染色などによる壊死細胞の精密な観察を行えば<sup>21)</sup>、より重要な情報が得られるかもしれない。

胸腹部大血管の手術時の特殊な病態としての脊髄虚血と、その結果起こる神経障害の機構に関し



てノックアウトマウスを用いた実験を行い、NMDA 型グルタミン酸受容体  $\epsilon$  1 サブユニットが神経細胞死の機構に関与していることを示した。今後、より詳細な分子機構の解明と、それによる脊髄障害の防止法の開発が重要な課題であると思われる。

#### 謝 辞

本研究の直接の御指導と本稿の御校閲をいただきました、崎村建司教授 (脳研究所細胞神経生物学教室) に深謝いたします。

#### 参 考 文 献

- 1) Choi DW and Rothman SM: The role of glutamate neurotoxicity in hypoxic-ischemic neuronal death. *Annu Rev Neurosci* 13: 171-182 1990.
- 2) Mori H and Mishima M: Structure and function of the NMDA Receptor Channel. *Neuropharmacology* 34: 1219-1237 1995.
- 3) Radovsky A, Safar P, Sterz F, Leonov Y, Peich H and Kuboyama K: Regional prevalence and distribution of ischemic neurons in dog brains 96 hours after cardiac arrest of 0 to 20 minutes. *Stroke* 26: 2127-2134 1995.
- 4) Colbourne F, Li H, Buchan AM and Clemens JA: Continuing postischemic neuronal death in CA 1: influence of ischemia duration and cytoprotective doses of NBQX and SNX-11 in rats. *Stroke* 30: 662-668 1999.
- 5) Fukaya M and Watanabe M: Improved Immunohistochemical Detection of PSD-95/SAP90 Protein Family by Protease Section. Pre-treatment: A study in the Adult Mouse Brain. *J Comp Neurol* 426: 572-586 2000.
- 6) Kanellopoulos GK, Kato H, Hsu CY and Kouchoukos NT: Spinal cord ischemic injury. Development of a new model in the rat. *Stroke* 28: 2532-2538 1997.
- 7) Hirai H, Kirsch J, Laube B, Betz H and Kuhse J: The glycine binding site of the N-methyl-D-aspartate receptor subunit NR 1: identification of novel determinants of coagonist potentiation in the extracellular M3-M4 loop region. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 93: 6031-6036 1996.
- 8) Kato H, Kanellopoulos GK, Matsuo S, Wu YJ, Jacquin MF, Hsu CY, Choi DW and Kouchoukos NT: Protection of rat spinal cord from ischemia with dextrorphan and cycloheximide: effects on necrosis and apoptosis. *J Thorac Cardiovasc Surg* 114: 609-618 1997.
- 9) Sakimura K, Kutsuwada T, Ito I, Manabe T, Takayama C, Kushiya E, Yagi T, Aizawa S, Inoue Y and Sugiyama H: Reduced hippocampal LTP and spatial learning in mice lacking NMDA receptor epsilon 1 subunit. *Nature* 373: 151-155 1995.
- 10) Lang-Lazdunski L, Matsushita K, Hirt L, Waeber C, Vonsattel J-PG and Moskowitz MA: Spinal cord ischemia. Development of a model in the mouse. *Stroke* 31: 208-213 2000.
- 11) Laube B, Hirai H, Sturgess M, Betz H and Kuhse J: Molecular determinants of agonist discrimination by NMDA receptor subunits: analysis of the glutamate binding site on the NR 2 B subunit. *Neuron* 18: 493-503 1997.
- 12) Marsala M and Yaksh TL: Transient spinal ischemia in the rat: characterization of behavioral and histopathological consequences as a function of the duration of aortic occlusion. *J Cereb Blood Flow Metab* 14: 526-535 1994.
- 13) Martinez-Arizala A, Rigamonti DD, Long JB, Kraimer JM and Holaday JW: Effect of NMDA receptor antagonists following spinal ischemia in the rabbit. *Exp Neurol* 108: 232-240 1990.
- 14) Morikawa E, Mori H, Mishima M, Asano T and Kirino T: Attenuation of Focal Ischemic Brain Injury in Mice Deficient in the  $\epsilon$  1 (NR 2 A) Subunit of NMDA Receptor. *J Neurosci* 18: 9727-9732 1998.
- 15) Nakamichi T: Glutamate neurotoxicity during spinal cord ischemia - neuroprotective effects of glutamate receptor antagonists -. *J Jpn Assn Thorac Surg* 46: 854-859 1998.
- 16) Pulsinelli WA: The therapeutic window in

- ischemic brain injury. *Current Opinion in Neurology* 8: 3-5 1995.
- 17) Reagan RF and Choi DE: Glutamate neurotoxicity in spinal cord cell culture. *Neurosci* 43: 585-591 1991.
- 18) Watanabe M, Inoue Y, Sakimura K and Mishina M: Developmental changes in distribution of NMDA receptor channel subunit mRNAs. *NeuroReport* 3: 1138-1140 1992.
- 19) Watanabe M, Mishina M and Inoue: Distinct Spatiotemporal Distributions of the N-Methyl-D-Aspartate Receptor Channel Subunit mRNAs in the Mouse Cervical Cord. *J Comp Neurol* 345: 314-319 1994.
- 20) Zivin JA and DeGirolami U: Spinal cord infarction: a highly reproducible stroke model. *Stroke* 11: 200-202 1980.
- 21) Matsushita K, Wu Y, Qin J, Lang-Lazdunski L, Waeber C, Hyman BT, Yuan J and Moskowitz MA: Fas receptor and neuronal cell death after spinal cord ischemia. *J Neurosci* 20: 6879-6887 2000.

(平成14年1月29日受付)

---