

# 周産期脳障害の解析と新規治療法に関する研究

坂元 佑哉

薬学部・大学院薬学研究科 博士課程（後期）臨床疾患薬理学教室  
福岡県福岡市城南区七隈8-19-1

## **Pathophysiological analysis and establishment of novel treatment against perinatal brain damage following developmental disorder**

**Yuya Sakamoto**

Department of Neuropharmacology, Faculty of Pharmaceutical Sciences,  
Fukuoka University, Nanakuma 8-19-1, Jyonan, Fukuoka, 814-0180, Japan

### **Abstract**

We previously found that our perinatal hypoxic-ischemic encephalopathy (HIE) model rats produced characteristic slowly progressive brain damage (SPBD) since 5th weeks after hypoxic-ischemic (HI) insult. These SPBD were accompanied by progressive learning and memory impairment processes in different learning and memory behavioral assessment. However, behavioral assessment to evaluate the brain damage in acute phase (until 2nd weeks after HI insult) unestablished because HIE model in this period was neonate. Moreover, the pathogenic mechanism of brain damage following HI insult is unknown. Therefore, the effective treatment for the brain damage undiscovered. First, the present study was designed to establish the behavioral assessment in acute phase after HI insult. Then, based on knowledge gained in the behavioral assessment, we evaluated the pathophysiological mechanism and the novel treatment against brain damage after HI insult. Twenty-four hour after HI insult, we discovered that HIE model rats showed abnormal circling behavior. By quantifying the circling behavior, we non-invasively predicted the degree of the brain damage. Thirty minutes before the assessment of circling behavior, either SCH23390 (0.5 mg/kg), a dopamine (DA) D<sub>1</sub> receptor antagonist, or Sulpiride (50 mg/kg), a D<sub>2</sub> receptor antagonist was administered intraperitoneally. Both DA receptor antagonists suppressed the ischemic-side circling behavior in 24 hr after HI insult. The density of dopamine- and cAMP-regulated phosphoprotein of M(r) 32 kDa (DARPP-32, a marker for DA postsynaptic neurons) positive cells in ischemic-side striatum were decreased compared with non-ischemic side striatum. In contrast, the density of tyrosine hydroxylase (TH, a marker for DA presynaptic neurons) positive cells in ischemic-side striatum was unchanged. In the midbrain that contained the origin of DA neuron, these changes by HI insult were not disappeared in 24hr after HI insult. However, the density of TH positive cells was progressively decreased with the progression of brain damage since 2nd weeks after HI insult. Dexamethasone (a synthetic corticosteroid anti-inflammatory drug; 0.5 mg/kg, i.p.) and minocycline (microglia inhibitor; 30 mg/kg, i.p.) significantly improved the brain damage and the circling behavior in 24 hr after HI insult. Six weeks after HI insult, the plus maze, the eight-arm radial maze, and the choice reaction time task were started as rehabilitative training tasks. Sixteen weeks after the insult, the water maze task was performed to evaluate spatial learning ability. Afterwards, we morphologically

examined brain injury. Rehabilitative training significantly improved SPBD and learning and memory impairment in females but not in males. These results suggested that it was the valuable behavioral assessment for novel therapeutic development for brain dysfunction after HIE to evaluate the abnormal circling behavior in acute phase and progressive learning impairment in chronic phase in HIE model rats and that it was the valuable therapeutic strategy to reduce the retrogressive DA neurologic damage in chronic phase.

**Keywords:** hypoxic-ischemic encephalopathy, dopamine, TH, DARPP-32, abnormal circling behavior, slowly progressive brain damage

## 【背景】

周産期は、出生という胎内環境から胎外環境に適応するため、脳の発達の中で最も重要な時期に相当し、この時期の脳障害は神経学的後遺症を伴いやすい<sup>1)</sup>。周産期の脳障害の代表的な疾患として、低酸素性虚血性脳症 (Hypoxic-ischemic encephalopathy :HIE) がある。HIEは、新生児仮死に伴って生じ、脳性麻痺、精神発達遅延、てんかんなどの恒常的な神経学的後遺症を残す<sup>2)</sup>。現在、臨床現場では、HIEの発症を抑えるために、出生時での産科的管理の向上に加えて、低体温療法やマグネシウムなどの脳保護作用を有した新しい治療が積極的に行われているが、現時点では有効な治療法は確立されていない。さらに、脳障害の発症機序も不明なままである。そこで本研究では、HIEの脳障害の解明および新規治療法の開発を目的としている。

これまでに我々は、HIE動物モデルを作製し、低酸素・虚血(HI)処置後の慢性期において、特徴的な緩徐進行性脳損傷(SPBD)を伴った学習障害を発見した<sup>3)</sup>。このSPBDは、線条体を中心とした脳損傷を示し、その後、遠隔部の中脳を含めた脳幹部や反対側へと広範な脳損傷を遅発的に発症した。また、我々は、SPBDは性差が生じる<sup>4)</sup>ことを明らかにしている。HI処置17週後に脳断面積を比較したところ、雌に比べ雄のほうが損傷面積が大きく、かつそれに伴う空間学習障害も雄の方が増悪した。さらに、そのSPBDは、単独隔離飼育による環境要因の影響を受けることも明らかにしている。単独隔離飼育群は、通常飼育群に比べ損傷面積が大きく、かつそれに伴う空間学習障害も増悪した。これらの結果から、作製したHIEモデルは、HI処置後の慢性期の病態解析や治療法を開発するための薬理学的応用に有用である。

しかしながら、新生仔ラットを用いたHIEモデルの発症直後の急性期において、脳損傷を反映できる機能評価系はない。これまでに我々は、新生仔ラットにおいて、身体機能が発達途上であることや、母親と一時的に離すことで低体温を生じて運動量の低下をまねくこと、などの行動実験を行う上で問題となりうる点を観察した。そのためHIE急性期での行動実験は、比較的短時間かつ簡便に行えるものが必須条件として考えられた。Lirらは、種々の反射や身体的発達について<sup>5-7)</sup>、またTuorらはムービーウォークや前肢の引きつけ、体のねじれを用いた評価を行っている<sup>8)</sup>。このように反射などの成長の早期に発達していく神経機能を評価するしかなかった。さらに、Tuorらは、これらの行動評価が、脳損傷の程度とは関連しないことを示唆している。以上のことから、HIEモデルの発症時期での脳損傷の程度を非侵襲的に予想できる行動評価の確立を行うことは非常に重要であることが考えられる。

これまでに我々は、種々の行動評価系を用いて検討していくなかで、HI処置24時間後に、虚血同側への異常な回転行動が起こることを発見した。このような回転行動は、パーキンソン病モデルラットにもみられ、Dopamine (DA) 神経の左右のアンバランスにより生じること<sup>9, 10)</sup>が報告されている。また、正常ラットの片側線条体へのD<sub>1</sub>受容体作動薬とD<sub>2</sub>受容体作動薬の微量注入が、回転行動を誘発する<sup>11)</sup>。DA神経系は脳の発達・形成に不可欠であり、黒質-線条体DA神経の成熟が、発達に伴う新生仔の行動変化と密接に関与している<sup>12)</sup>。また、脳虚血モデルにおいて、DA受容体依存的に、線条体神経細胞の

細胞質内に存在するタンパク質の dopamine- and cAMP-regulated phosphoprotein of 32kDa (DARPP-32) がリン酸化されることで、脳損傷を憎悪させることが知られている。リン酸化された DARPP-32 は、細胞内  $Ca^{2+}$  の流入を増加させ、その結果、一酸化窒素 (NO) 合成酵素活性の上昇による一酸化窒素の産生、リン脂質代謝の異常による遊離脂肪酸の増加、ミトコンドリア機能障害によるフリーラジカルの発生などが生じて、遅発性の神経細胞死、いわゆる中枢神経系の細胞死のメカニズムである「グルタミン酸毒性 (NMDA 受容体—細胞内  $Ca^{2+}$  上昇)」が生じる<sup>13,14)</sup>。以上のことから、DA 神経は、パーキンソン病モデルにおける回転行動の発現や、脳虚血モデルの脳損傷に関与している。しかしながら、HIE との関与はほとんどないため、HIE モデルにみられた回転行動や脳損傷に対する検討を行う必要がある。

そこで、我々はまず、HIE モデルにみられた回転行動の定量化を行い、HIE 急性期の行動評価系の確立を行った。さらに、この行動変化に対する発症機序を解明するため、DA 神経に着目し行動薬理学的および組織学的変化に検討した。次に、HIE モデルの急性期における新規治療薬の探索を行った。さらに、HIE 慢性期における SPBD の発現機序の解明を行い、得られた知見を基に、新規治療法の探索を行った。

## 【実験方法】

### HIE モデルラットの作製方法

Rice らの方法に従い、生後7日齢の新生仔ラットを用い、エーテル麻酔下で左総頸動脈を露出させ、永久二重結紮を行った。つぎに、術後30-90分回復させた後に、8%酸素と92%窒素の混合気体を充満させたチェンバー内にて1時間、もしくは2時間の低酸素負荷を暴露した（以下これを HI 1hr 処置群、HI 2hr 処置群とする）。また、このときの温度は36.5℃に保って行った。偽手術群は左総頸動脈を露出させた後縫合し、その後は同様の低酸素負荷を行った。

### HI 急性期における行動解析方法の開発

本装置は外直径28cm、内直径20cm、高さ10cm のステンレスボールに8等分に線を引いたものを用いた (Fig 1)。動物を装置中央に置き、左右それぞれの方向に線をまたぐ数を1カウントとして1分間測定を行った。

### HI 急性期における脳損傷と回転行動の相関

HI 処置24時間後に回転行動を測定後、脳を摘出し、2,3,5-triphenyltetrazolium chloride (TTC) 染色を行い、TTC 陽性面積を測定した。その後、TTC 陽性面積と虚血同側への回転行動数の相関関係を評価した。

### DA 神経の関与

$D_1$  受容体拮抗薬 SCH23390 (0.5 mg/kg)、 $D_2$  受容体拮抗薬 Sulpiride (50 mg/kg) を、回転行動測定の前30分前に腹腔内投与して、回転行動に対する影響を調べた。



**Fig. 1** A hand-made apparatus which is measuring the abnormal circling behavior at 24hr following HI insult at 7 days of age.

## **DA神経の発現の評価**

DA神経のプレシナプスのマーカーであるTH抗体と、ポストシナプスのマーカーであるDARPP-32抗体を用いて免疫組織学的に検討した。

## **HI急性期における治療法の開発：回転行動に対する薬効評価**

各種薬物をHI処置前に投与して、回転行動および脳損傷に対する影響を調べた。脳損傷の評価は、回転行動の測定後に断頭し、脳を摘出し、TTC染色を行い、TTC陽性面積を測定した。使用した薬物は、D<sub>1</sub>受容体拮抗薬SCH23390 (0.5 mg/kg)、D<sub>2</sub>受容体拮抗薬Sulpiride (50 mg/kg)、内因性カンナビノイドの2-Arachidonoylglycerol (2-AG, 10 mg/kg)、ミクログリア抑制薬のミノサイクリン (45 mg/kg)、エストロゲン (10 $\mu$ g/kg)、合成糖質コルチコイドのデキサメタゾン (0.5 mg/kg)を用いた。デキサメタゾンとエストラジオールは低酸素処置4時間前に、残りの薬物は低酸素処置15分前に腹腔内投与した。なお、vehicle群には生理食塩水を投与した。

## **HI慢性期における緩徐進行性脳損傷 (SPBD) とDA神経の関与**

SPBDの機序をDA神経に着目し、TH抗体を用いて、免疫組織学的に検討した。

## **HI慢性期における緩徐進行性脳損傷 (SPBD) に対するリハビリテーションの効果**

リハビリテーションは、脳損傷による運動機能障害や麻痺を改善させる目的で、作業活動などの外部刺激を行う治療法である。また、リハビリテーションは、DA神経を賦活化させることが報告されている<sup>15)</sup>。これらのことから、HI急性期にDA神経のポストシナプス損傷が起きた後、リハビリテーションを行うことで、慢性期にみられる脳機能障害が改善することが予想された。本研究は、HIEモデルラットに対し、急性期以降リハビリテーションを行い、HIEモデル慢性期にみられる学習記憶障害の治療効果を検討した。リハビリテーションは、HI処置6週目から、外部刺激を与えるためpre-trainingを行った。pre-trainingは、3種類の異なる学習・記憶課題(高架式十字迷路, 8方向放射状迷路, 選択反応時間課題)を順次行った。脳機能障害の評価は、HI処置後17週目において、空間学習障害として水迷路課題を用いて検討した。脳損傷の評価は、行動実験終了後のHI処置17週目に、脳の面積を測定した。

## **【結果・考察】**

### **HI急性期における行動解析方法の開発：異常な回転行動**

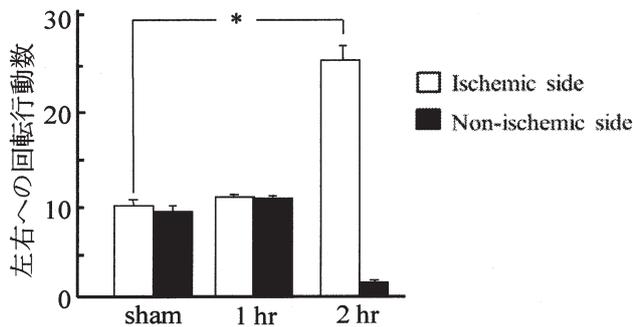
HI処置24時間後の異常な回転行動の定量した結果をFig. 2に示した。回転行動HI処置24時間後に回転行動を測定したところ、HI 2hr処置群は、sham群と比較して、虚血同側への回転行動数が有意に増加した。一方、HI 1hr処置群は、sham群と比較して、回転行動数は変化しなかった。

さらに、回転行動数とTTC陽性面積を相関関係の結果をFig. 3に示した。その結果、HI処置後の虚血同側への回転行動数と、TTC陽性面積は、相関関係を示した。

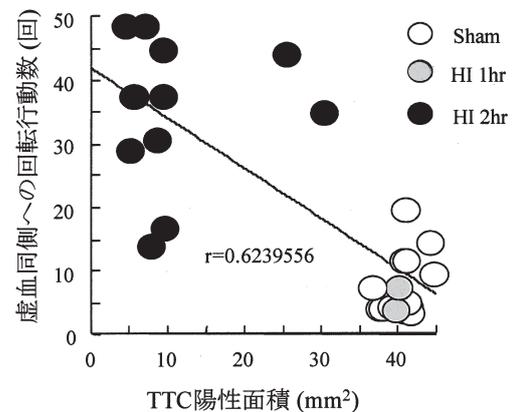
以上の結果から、HI急性期の異常な回転行動を定量的に測定できる行動評価系を確立した。また、この行動評価系を用いることで新生仔ラットのHI処置による脳損傷の指標に有用であることが示唆された。

### **HI急性期における発現機序の解明：異常な回転行動と線条体のDA神経の変性**

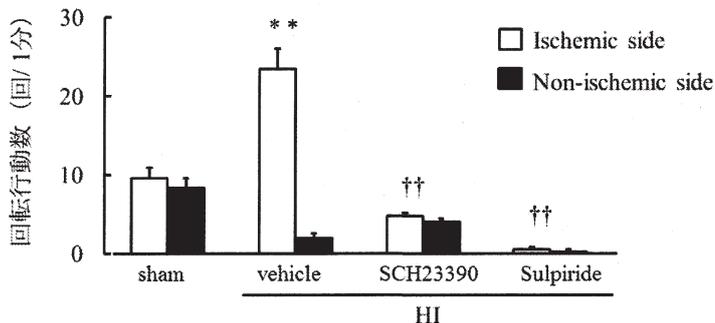
HI処置24時間後に回転行動に対するDA神経の関与を行動薬理的に検討した結果をFig. 4に示した。SCH23390 0.5 mg/kg投与群、Sulpiride 50 mg/kg投与群は、vehicle群と比較して有意に虚血側への回転



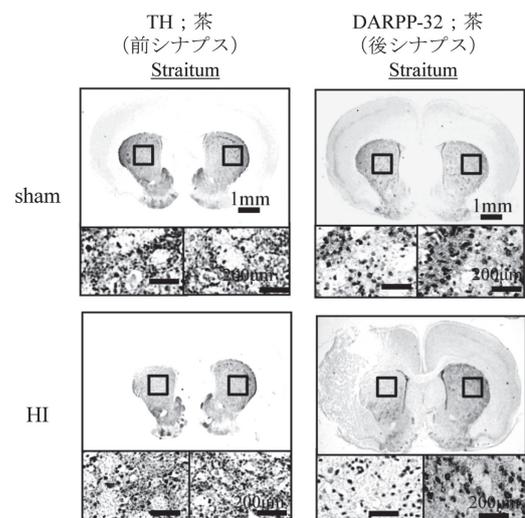
**Fig. 2** The abnormal circling behavior at 24hr following HI insult at 7 days of age. \* $P < 0.001$



**Fig. 3** Correlation between No. of ischemic-side turn and TTC positive area (mm<sup>2</sup>) at 24hr following HI insult at 7 days of age.



**Fig. 4** Effect of SCH23390 and Sulpiride on the abnormal circling behavior at 24hr following HI insult. \* $P > 0.001$  vs sham, ††  $P > 0.01$  vs vehicle.



**Fig. 5** Immunostaining of TH and DARPP at 24hr following HI insult at 7 days of age in striatum.

行動数が減少した。

また、HI処置24時間後の虚血側の線条体において、免疫組織学的に検討した結果を Fig. 5 に示した。HI処置24時間後、DA神経のポストシナプスのマーカーである抗DARPP-32陽性細胞数が減少していたが、DA神経のプレシナプスのマーカーであるTH陽性像は変化しなかった。

これまでに、正常ラットの片側線条体へのDA受容体作動薬の微量注入が、回転行動を誘発すること<sup>15)</sup>、6-ハイドロキシドパミンを片側に投与されたラットは、片側黒質-線条体DA神経が破壊され、回転行動を示す<sup>9,10)</sup>ことが報告されている。このことは、回転行動がDA受容体依存的なシグナル伝達により起こることを示唆しており、今回の結果を支持するものとなる。また、6-ハイドロキシドパミン投与ラットは、破壊側の線条体におけるDARPP-32発現量が、反対側と比較すると有意に減少していた<sup>17)</sup>。このことは、回転行動がDA受容体のシグナル伝達の左右のアンバランスによって起こっている

ことを示唆しており、今回の結果を支持するものである。以上のことから、HI処置24時間後にみられる虚血同側への異常な回転行動は、DA神経のポストシナプス損傷による、DA神経の左右のシグナル伝達のアンバランスによっておこることが明らかになった。

### HI急性期における治療法の開発

HI処置24時間後における薬効評価の結果をTable 1に示した。HI処置24時間後のTTC染色および回転行動において、デキサメタゾンとミノサイクリンは、HI処置による回転行動と脳損傷を改善したが、他の薬物は改善効果を示さなかった。

Kasselmannらはデキサメタゾンが、脳内での血管内皮細胞増殖因子(vascular endothelial growth factor: VEGF)合成阻害に伴う異常血管新生阻害作用を有していることを示唆している。また、低酸素によるHIF-1増加に伴うVEGF遺伝子発現の転写促進<sup>18)</sup>による血管新生病変形成は、末梢からのマクロファージや好中球浸潤を惹起し<sup>19)</sup>、ミクログリアの活性化が起こり、TNF $\alpha$ や炎症性サイトカイン(IL-6, IL-1 $\beta$ )放出によるグリア誘発性神経細胞死が起きる<sup>20)</sup>。本研究において、デキサメタゾンおよびミクログリア抑制薬であるミノサイクリンが神経保護効果をもつことは、HI急性期の脳障害において、グルタミン酸神経毒性や酸化ストレスによる脳障害よりも、活性化ミクログリアや血管新生病変形成の関与が強いことが示唆された。

以上のことから、デキサメタゾンの作用機序に着目し、HI急性期における機能障害に有用な薬物を探索することが、今後のHIE新規治療法の開発につながることを期待された。

### HI慢性期における緩徐進行性脳損傷(SPBD)の発現機序の解明

緩徐進行性脳損傷(SPBD)と黒質のDA神経の関与を免疫組織学的に検討した結果をFig. 6に示した。HI処置2週目では、虚血同側の線条体や大脳皮質、海馬で核濃縮、神経細胞の好酸性化、細胞の空胞化、脳室の拡大が観察された。一方、中脳や黒質を含む脳幹部においては、変化がみられなかった。

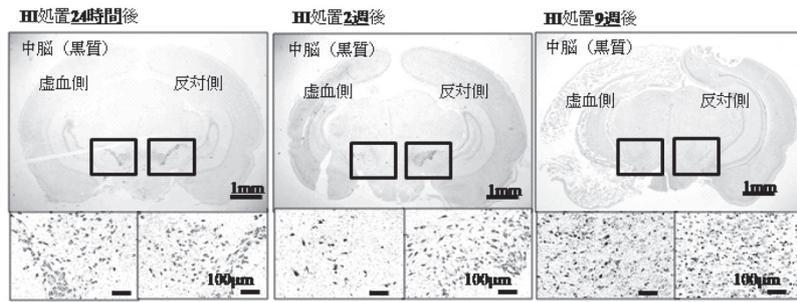
HI処置5週目以降では、反対側まで脳損傷が進行する個体も存在した。線条体から前頭葉皮質や、中脳を含めた脳幹部での核濃縮、神経細胞の好酸性化、細胞の空胞化、黒質での細胞の脱落がみられた。また、TH抗体を用いた免疫組織学的に検討した結果、HI処置2週目において、虚血反対側と比較して、虚血同側での線条体や、中脳(黒質)におけるTH陽性細胞は変化しなかった。一方、HI9週目における中脳(黒質)のTH陽性細胞は、虚血反対側と比較して減少した。

これまでに、中大脳動脈閉塞ラットは、虚血処置1週間では、虚血側の大脳皮質や線条体に損傷がみられるのみで、虚血側視床などの脳幹部は損傷しておらず、虚血処置3カ月後においては、変化の認め

**Table 1** Drug evaluation for brain damage and abnormal circling behavior at 24hr following HI insult.

使用薬物	脳保護効果	回転行動改善作用
D <sub>1</sub> 受容体拮抗薬 (SCH23390)	±	±
D <sub>2</sub> 受容体拮抗薬 (Sulpiride)	±	±
内因性カンナビノイド (2-AG)	+	±
ミクログリア抑制薬 (ミノサイクリン)	++	++
エストロゲン	+	±
合成糖質コルチコイド (デキサメタゾン)	+++	+++

+++ Drugs that showed the highest positive results, ++ drugs that showed positive results, + drugs that showed the weak positive results, and ± drugs that showed the negative results were obtained against brain injury and the abnormal circling behavior following HI insult.



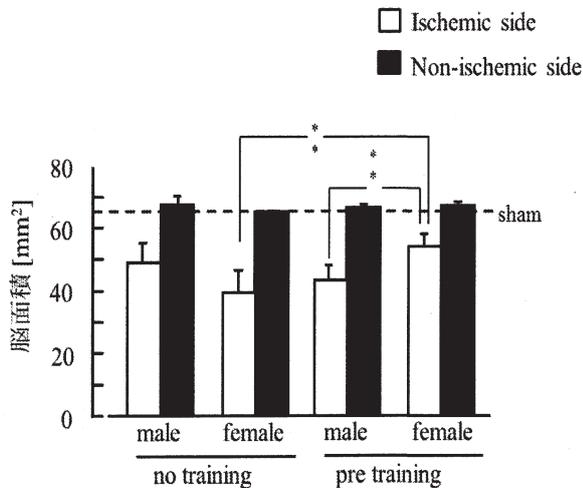
**Fig. 6** Immunostaining of TH in 24hr, 2nd weeks, and 9th weeks after HI insult at 7 days of age in midbrain.

られなかった虚血側視床の著しい変性・萎縮が生じていることが報告されている。このことは、脳虚血による損傷が、遠隔部である脳幹部の神経細胞を遅発的に障害させることを示唆しており、今回の結果を支持するものである。以上のことから、HI慢性期にみられるSPBDの発症には、黒質線条体のDA神経の遅発性遠隔部変性が関与していることが示唆された。

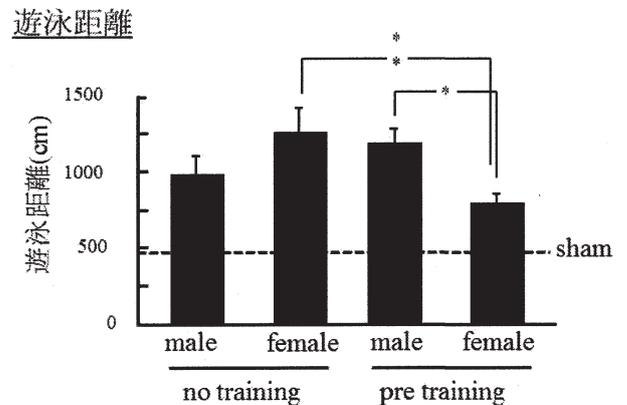
### HI慢性期における治療対策

緩徐進行性脳損傷（SPBD）に対するリハビリテーションの効果を Fig. 7, 8 に示した。pre-training 雌性群は、水迷路課題の空間学習障害を改善した。また、HI慢性期に見られる進行的な中脳（黒質）や線条体の脳損傷も改善した。しかし、雄性群では、リハビリテーションによる改善効果はみられなかった。

上述のように、HI慢性期におけるSPBDは、黒質線条体のDA神経の遅発性遠隔部変性が関与していることを明らかにした。リハビリテーションは、DA神経を賦活化<sup>15)</sup>させることが報告されており、HI慢性期に残存しているDA神経の賦活化を促し、空間学習障害の改善を促すことが予想される。これは、神経回路網を再構築の過程を活性化、特にDA神経の機能回復に結びつけることで、リハビリテーションの改善効果が現れることが示唆された。このことから、リハビリテーションは、DA神経に影響したことが予想された。



**Fig. 7** The effect of rehabilitative training tasks against brain injury in 17th weeks after the HI insult in part of the brain, including midbrain. \*\* $P < 0.01$ .



**Fig. 8** The effect of rehabilitative training tasks against spatial learning impairment in 17th weeks after the HI insult in Water maze. \* $P > 0.05$  and \*\* $P > 0.01$ .

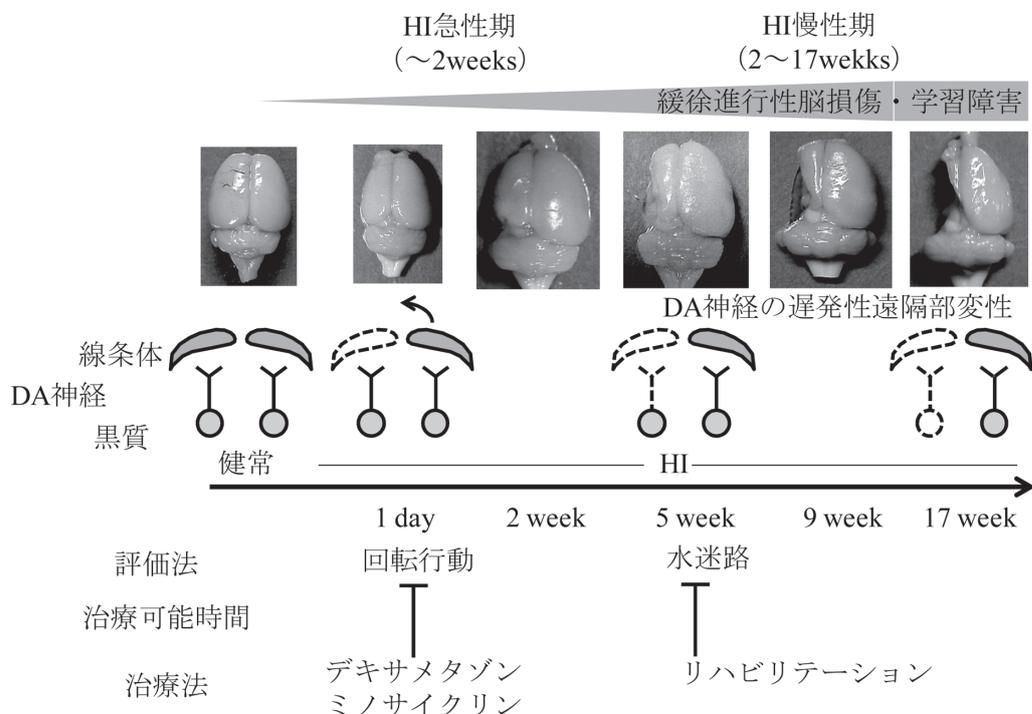
本研究では、リハビリテーションは、雌性にのみSPBDとそれに伴う空間学習障害を改善させた。閉経後のエストロゲン補充療法が、アルツハイマー病の罹患率を減少させること、パーキンソン病の発症率は女性の方が低いことなど、エストロゲンが様々なDA神経疾患の発症を抑制することが報告されている<sup>19,20)</sup>。さらに、培養中脳ニューロンにおけるグルタミン酸神経毒性に対して、エストラジオールは、顕著なDA神経保護効果をもつ<sup>21)</sup>ことから、本研究で得られたリハビリテーションにおける性差の発現は、内因性エストロゲンの関与が示唆された。

したがって、HI急性期以降に開始したリハビリテーションは、HIE慢性期にみられる脳機能障害に対して治療効果があること、その治療効果には性差があることがわかった。

### 【総括】

以上の結果から、HI処置は、急性期において異常な回転行動を示し、慢性期において進行性の学習障害を示した。さらに、HI処置による脳損傷は、急性期において線条体のDA神経のポストシナプス損傷から始まり、その後、その損傷は遠隔部に拡大し、慢性期においてDA神経の起始部である中脳の黒質が逆行性に損傷した。このDA神経の逆行性の脳損傷がHIEの病態を反映しているのかもしれない。さらに、これらの行動評価系を用いて、HI急性期ではデキサメタゾンが、慢性期ではリハビリテーションが有効な治療法であることを明らかにした (Fig. 9)。

したがって、HI処置による急性期の異常な回転行動と慢性期の進行的な学習障害は、HIEの脳機能障害に対する治療薬の開発にとって有用な行動評価系であること、また、HI慢性期において、DA神経の逆行性の脳損傷を軽減させることが有用な治療戦略であることを示唆した。



**Fig. 9** Schematic view of the mechanisms of brain damage following HI insult; the retrogressive DA neurologic degeneration. Continuous line and ash-colored graphic showed the normal DA neuron. Dot line and white colored graphic showed the injured DA neuron. Arrowed line showed the circling behavior following HI insult.

## 【参考文献】

1. Robert C., *Pediatrics* 100 : 1-11. (1997)
2. 池田智明ら. 周産期学シンポジウム. 21: 61-65. (2002)
3. Mishima K *et al.*, *Neurosci Lett.* 376:194-9. (2005)
4. Tsuji M *et al.*, *Exp Neurol.* 226:285-92. (2010)
5. Lir-Wan Fan *et al.*, *Behavior Brain Res.* 165: 80-90. (2005)
6. Andrea Lubic *et al.*, *Behavior Brain Res.* 157: 157-165. (2005)
7. Vadim S *et al.*, *Behavior Brain Res.* 145: 209-219. (2003)
8. U.I. Tuor S *et al.*, *Exp Neurol.* 167: 272-281. (2001)
9. Costall B S *et al.*, *Neuropharmacology.* 22 : 295-302. (1983)
10. Hefti F S *et al.*, *Pharmacol Biochem Behav.* 12:185-8 (1980)
11. Kitamura M S *et al.*, *Neuropharmacology.* 38:1397-407. (1999)
12. Sasa M S *et al.*, 日薬理誌 : 122 : 215-225. (2003)
13. Volpe J *et al.*, 3rd, *WB Saunders. Philadelphia*, 211-372. (1995)
14. Vannucci RC *et al.*, *Pediatrics.* 100 :1004-14. (1997)
15. Kitamura M *et al.*, *Neuropharmacology.* 38:1397-407. (1999)
16. Tillerson JL *et al.*, *J Neurosci.* 21:4427-35. (2001)
17. Barone P *et al.*, *Neuroscience.* 61:867-73 (1994)
18. Yamashita K *et al.*, *J Biol Chem.*;276:12645-53. (2001)
19. Yang Y *et al.*, *Stroke.* 42:3323-8. (2011)
20. Serdula MK *et al.*, *Am J Epidemiol* 142, 820-827. (1995)
21. Birge SJ *et al.*, *Neurology* 48, S36-S41 (1997)
22. Sawada H *et al.*, *J Neurosci Res* 54, 707-719 (1998)