脊髄アデノシン A₁ 受容体活性化によるアロディニアの調節

河 野 一 郎

九州歯科大学歯科麻酔学講座 (指導: 仲西 修教授)

平成 11 年 12 月 27 日受理

The Modification for Allodynia via Adenosine A₁ Receptor

Ichiro Kawano

Department of Dental Anesthesiology (Director: Prof. Osamu Nakanishi)
Kyushu Dental College, Kitakyushu, Japan

Spinally delivered adenosine receptor agonists and its analogs have recently been shown to have antinociceptive effects. However, the mechanisms by which adenosine produces antinociception are not clear. Therefore, the present study evaluated the modulating effect of adenosine A₁ receptor agonist, R-PIA injected intrathecally (I.T.) on the tactile-allodynia, associated with cerebrospinal fluid (CSF) -glutamate release induced by injection of gamma amino butyric acid.

The microdialysis probe and polyethylene tube (PE-10) was intrathecally implanted into lumbar segment under halothane anesthesia in forty-three Sprague-Dawley rats. After three days, rats were divided into three groups; i) Control (saline, I.T.); ii) R-PIA at doses of 1 nM, 3 nM, and 10 nM, and iii) 10 nM R-PIA plus 300 nM aminophylline. The tactile-allodynia was evaluated by touch-evoked agitation (TEA) which was scored 0 (no response to hair touching at lumbar level) to 3 (strong agitation appeared). Using an intrathecal microdialysis, glutamate concentration in cerebrospinal fluid (CSF-Glu) was periodically (10 min intervals) determined simultaneously by a HPLC-ECD.

Intrathecal BIC injection evoked a transient strong agitation (TEA score: 4.7 at 10 min, 1.0 at 30 min), associated with increased CSF-glu (70 % at 10 min.). R-PIA attenuated such increases of TEA and CSF-glu dose-dependently (3 nM: 1.2 and 0.3, 10 nM: 0.3 and 0.1). Such action of R-PIA (10 nM) was reversed by codelivery of aminophylline (300 nM).

Based on the present study, it is clearly demonstrated that R-PIA can prevents allodynia in a dose-dependent manner. This attenuating effect was reversed by adenosine A₁ receptor antagonist, suggesting R-PIA has a potent anti-allodynic effect via inhibiting adenosine A₁ receptor activity at spinal cord. In addition, the microdialysis study demonstrated that R-PIA attenuates increased spinal glutamate release evoked by allodynia through presynaptic inhibition of primary afferent input.

Key words: Tactil-allodynia / Bicuculline / Adenosine A₁ agonist / Intrathecal microdialysis / CSF-glutamate

緒 言

現代医療の中で、痛みの緩和が生活の質の向上に密接にかかわっていることが理解されつつある。したがって、痛みの発現機構の解明とその的確な調節法の確立が待たれている。なかでも、最も難治とされる痛みの一つである低閾値求心性刺激による過敏症、アロディニアの病態およびその調節機構はほとんど解明されていないのが現状である。

最近の基礎的研究から、アロディニアの発現機構には、1) 傷害された末梢神経の自発活動が亢進¹⁾、アロディニアは交感神経遮断術で軽減される²⁾ことから、末梢性交感神経系の活動亢進が関与すること、2) 脊髄の gamma-amino butyric acid (GABA) および glycine (Gly) 含有介在ニューロンが、 A_{δ} 線維終末および広作動域 (WDR) ニューロンと結合し、 A_{δ} 線維を介する求心性入力 of 抑制および後細胞の過分極をもたらすこと^{3,4)}、更に GABA および Gly の阻害薬である bicuculline (BIC), strychnine (STR) の脊髄クモ膜下腔内 (I. T.) 投与で、WDR ニューロンが興奮し、化学的誘発アロディニアを起こすことから^{5,6)}、脊髄の GABA および Gly 含有介在ニューロンが、低閾値求心性入力を調節している可能性がある。3) さらに、N-methyl-D-aspartate (NMDA) の I. T. 投与で脳脊髄液中の glutamate (Glu) 濃度が上昇し、痛覚過敏やアロディニアが誘発される。この作用は NMDA 受容体阻害薬投与で消失する⁷⁾。したがって、これらの化学的誘発アロディニアは A_{δ} 線維終末あるいは Glu 含有介在ニューロンからの Glu 放出亢進が引き金となって、脊髄シナプス伝達が神経可塑性 (刺激に対して興奮性が増大し、長く維持する性質) に陥りもたらされるものと考えられる⁸⁾。

一方、最近の報告から、アデノシンおよびその誘導体類が、未だその作用機構は十分に解明されていないが、抗侵害作用を有することが示された⁹⁻¹¹⁾。アデノシン A_1 受容体は脊髄後角表層に豊富に局在していることが知られる^{12,13)}。また、 A_1 受容体の活性化は G_i と結合した K^+ コンダクタンス亢進により細胞の過分極をもたらすほか、脊髄髄腔内への A_1 受容体作動薬投与は繰り返しの C 線維の興奮による WDR ニューロンの wind up 現象を抑制することが示されている⁹⁾。さらに、動物実験で、 A_1 受容体作動薬はホット・プレートテストなどにおける急性痛に対しては、軽微な作用であるが¹⁰⁾、持続痛に対しては強い抑制作用を有し、その作用は A_1 受容体阻害薬カフェインで拮抗されることが明かにされてい

る¹⁴⁾。

しかしながら、アロディニア調節について脊髄アデノシンの果たす役割を、CSF-Glu 放出と関連して調べたものはない。

そこで、本研究では脊髄 GABA 誘発アロディニアをアデノシン A_1 受容体作動薬がどのように修飾するか、またその作用はアデノシン A_1 受容体選択的であるのかを CSF-Glu の動態と関連させ、その調節機構を明らかにすることを目的として、ラットを用いて検討した。

実験方法

1. 実験動物および準備操作

雄性 Sprague-Dawley 系ラット (300~350 g) 43 匹を用いた。明/暗 12 時間 (明 7:00~19:00)、室温 $23 \pm 2^\circ\text{C}$ の環境条件下で飼育し、固形飼料および飲用水は自由に与えた。図 1 に実験の模式図を示す。ラットをハロタン (2-3 %) 麻酔下に頭部を固定したのち、大槽を切開し、薬物投与のためポリエチレンチューブ (PE-10, イントラメディック) を、また CSF-Glu 測定用としてループ型マイクロダイアリシス (MD) プロブを先端が第 1 から第 2 腰髄に位置するようそれぞれ脊髄クモ膜下腔内 (I. T.) に挿入、留置した¹⁵⁾。MD プロブは、Marsala (1995)¹⁶⁾ の方法に準じ、長さ 18 cm のキャプロファン膜ホローファイバーをループにし、その先端 4 cm (透析部位) を残し、エポキシ樹脂でコーティングしたプロブ (内径 $200\mu\text{m}$ 、外径 $300\mu\text{m}$ 、cut off 分子量 45 kDa) の両端に延長用として PE-10 を接続し透析を行なった。予備実験から本プロブの回収率は、デキストロースを用い、 37°C で測定したところ約 40 % であった。

これらの操作後 3~7 日目に、20 % 以上の体重減少、脊髄障害、または、ストレス症状のないラットを実験に供した。また、実験終了後は、速やかにペントバルビタール (50 mg/kg) 麻酔下、ホルマリン灌流固定を行い、カテーテルの留置部位を確認した。

なお、本研究は、九州歯科大学動物実験委員会の指針に準じて行った。

2. 薬物投与および実験群

薬物投与に際して、まず、ラットを麻酔箱の中に入れ、ハロタン麻酔 (吸入濃度は 2-3 %) にて正向反射が消失したのち、実験台に腹臥位にしてマスク麻酔下、四肢をビニールテープにより最小限に拘束した。その後吸入ハロタン濃度を 1.0 % (赤外線ガスモニター) とし、鎮静状態を保った。以下に示すように、アロディニア誘発前

Fig. 1 Experimental model (Intrathecal Microdialysis).

の所定時間に各薬物を投与したのち、BIC (Sigma) $10\mu\text{g}/10\mu\text{l}$ の I.T. によりアロディニア誘発を行い、触覚過敏反応の測定および脊髄マイクロダイアリシスを行った。この用量はアロディニアを誘発するには十分な用量であることを既に確認している⁹⁾。各薬物投与では、 $10\mu\text{l}$ 生理食塩水に溶解し、注入後にはさらに $10\mu\text{l}$ 生理食塩水をフラッシュのために注入した。

実験群は投与薬物、用量により 5 群とし、ラットを無作為に以下のように分けた。

対照群：生理食塩水 $10\mu\text{l}$ を BIC 投与 10 分前に I.T. 投与 ($n=10$)。

R-PIA 群：アデノシン A_1 受容体作動薬 R(-)-N6-2-phenyl-isopropyl adenosine (R-PIA, フナコシ) を BIC 投与 10 分前に I.T. 投与。

投与用量により、さらに以下の 3 群に分けた。

(1) 1 nM 群 ($n=8$)

(2) 3 nM 群 ($n=6$)

(3) 10 nM 群 ($n=9$)

R-PIA+AMI 群：R-PIA 10 nM とアデノシン A_1/A_2 受容体阻害薬 aminophylline (AMI, Sigma) 300 nM を BIC 投与 10 分前に併用 I.T. 投与 ($n=10$)。

3. アロディニアの評価 (TEA 測定)

アロディニアは、ラット腰部に 3 本の鉛筆の先で尾側より頭側に向かって撫でる刺激を与えたときの反応、すなわち touch-evoked agitation (TEA) で評価した。

反応の強さは 4 段階スコア (0: 無反応, 1: 軽度なものがき, 2: 中等度なものがき, 3: 強いものがきと逃避行動) とし、5 分毎の測定を 2 回合わせ 10 分間の総和スコアを求めた。測定は BIC 投与後、30 分間 5 分毎に行った⁹⁾。また 30 分間の総和を求め、以下のマイクロダイアリシスの結果と対応するようにした。

4. 脳脊髄液中 Glu の測定 (脊髄マイクロダイアリシス)

TEA に伴う脳脊髄液中 Glu の変化をマイクロダイアリシスにより観察した。

ラットをハロタン麻酔 (2-3%) し、実験台に四肢をテープで固定し鎮静状態に保った後、マイクロダイアリシスプローブに微量持続注入ポンプを接続し、人工脳脊髄液 (aCSF, pH7.2) を $10\mu\text{l}/\text{分}$ で灌流させた¹⁶⁾。まず、aCSF を 30 分間灌流させた後 (wash-out), 基準値 (baseline) の測定のため、透析液を 10 分毎に 2 回採取し、その後、I.T. カテーテルより各薬物の投与を行い、TEA を観察しながら透析液を 30 分間 (10 分毎に 3 回) 採取した。回収した透析液は、測定まで -80°C にて保存した。aCSF の組成は、 Na^+ 151.1 , K^+ 2.6 , Mg^{2+} 0.9 , Ca^{2+} 1.3 , Cl^- 122.7 , HCO_3^- 21.0 , PO_4^{3-} 2.5 , dextrose 3.5 (単位 mM) とした。透析液中の Glu 濃度 (CSF-Glu 濃度) は、o-phthalaldehyde 誘導体化法を用い、高速液体クロマトグラフィーと電気化学検出器 (エイコム) で定量分析した。

5. 測定値の解析

TEA スコアおよび CSF-Glu 濃度 (%基準値) の経時的測定結果は、平均値±標準誤差で表した。また、30 分間の TEA スコアの総和 (Σ instance of TEA) を求め、群間の比較を行った。統計は、TEA スコアについては、Mann-Whitney U test で、CSF-Glu 濃度は、一元配置分散分析法で判定し、有意な場合は Fisher's Least sig-

nificant-difference (最小有意差) 法を用い多重比較を行った。危険率 5 %以下を有意とした。

結 果

1. R-PIA (I.T.) の BIC 誘発アロディニア修飾作用
BIC の I.T. 投与により、対照群では TEA スコアは 10 分で 4.7, 30 分で 1 となり、一過性に著しく増加したの

Fig. 2 Effect of adenocine A_1 receptor agonist, R-PIA, on bicuculline-induced allodynia.

Fig. 3 Effect of adenocine A_1 receptor activation on GABA antagonism-induced allodynia.

Fig. 4 Change in CSF-glutamate after bicuculline I.T. injection.

ち、漸次減少することが明らかとなった。この場合、 Σ TEA は 9 であった。R-PIA 1 nM では 10 分で TEA スコアは 4、30 分で 1.5 と対照群と有意差はなかったが、R-PIA 3 nM では 10 分で 1.2、30 分で 0.3、R-PIA 10 nM では 10 分で 0.3、30 分で 0.1 と TEA スコアの増加は用量依存性 (R-PIA) に有意に抑制された (図 2-A)。また、これら薬物投与群の Σ instance of TEA は R-PIA 3 nM、10 nM で対照群に対して有意な低下を示

した (図 2-B)。

2. R-PIA (I.T.) 作用のアデノシン受容体特異性

対照群に対し、R-PIA 10 nM では有意に抑制作用を示したが、AMI の併用投与でこの作用は消失した (図 3-A, B)。

3. 脳脊髄液中 Glu 変化

CSF-Glu は、BIC 投与直後 (10 分) に 70 % 増加したのち、漸次減少した。R-PIA 10 nM はこの増加を有意に抑制した。また、この抑制作用は AMI 併用投与で低下した (図 4-A, B)。

考 察

本研究で、中枢性アロディニア発現は脊髄 GABA_A 受容体の機能低下で起き、アデノシン A₁ 受容体作動薬 R-PIA は用量依存性にそれを抑制することが明らかとなった。この場合、R-PIA はアロディニア発現による脊髄 Glu 放出を抑制することが分かった。また、R-PIA の抗アロディニア作用は AMI で低下した。したがって、アロディニアは脊髄アデノシン A₁ 受容体作動薬で調節されることが示唆された。

1. 脊髄マイクロダイアリシスによる Glu 測定

本研究では、腰髄クモ膜下腔内にループ型マイクロダイアリシスプローブを埋め込み、末梢からの求心性刺激入力を神経伝達物質、とくに神経可塑性をもたらすとされる、Glu を測定する方法を用いた¹⁶⁾。このクモ膜下腔内留置法は Skilling ら (1988)¹⁷⁾ が従来報告した脊髄貫通法に比べ、侵襲が極めて少なく、行動変化と同時に Glu 測定が出来る利点がある。さらに、この技法は長期的な観察にも適しており、今回の急性実験のみならず慢性実験にも適用できる¹⁶⁾。本研究では、脊髄アデノシンの抗アロディニア作用を脊髄グルタメート放出と関連させ調べたものである。

2. アロディニア発現機序

GABA および Gly 含有神経が脊髄後角 (II-IV 層) に局在し、求心性 A_δ 神経終末に軸索-軸索連絡するほか、WDR ニューロンの樹状突起、細胞質に連絡している。さらに、アロディニアでは脊髄後角 (II-IV 層) で GABA 含有神経密度の減少¹⁸⁾ およびネクロシスが起きること⁹⁾ が報告されている。したがって、これらのことからアロディニアには脊髄後角の抑制性介在ニューロンの脆弱性が高いことが強く関与するものと考えられる。本研究で、アロディニアが脊髄 GABA_A 受容体阻害薬 BIC の I.T. 投与により発現したことから、アロディニアが脊髄 GABA_A 受容体の機能低下で起きることが分かっ

Fig. 5 Possible action sites of adenosine in modulating allodynia.

た。この結果は、BIC や STR 投与で逃避行動と血圧上昇、WDR ニューロンの放電増加が起きたことと報告⁵⁾に一致する。

一方、Glu や NMDA を I.T. 投与するとアロディニアが発現すること⁷⁾、また、Yamamoto ら (1992)¹⁹⁾ によりアロディニアは NMDA 受容体阻害薬投与で抑制されることが報告されている。このグルタミン酸神経系の興奮に関しては、さらに、それを裏付ける報告が積み重ねられている。i) Glu 放出促進は、non-NMDA 受容体 (AMPA/KA)、NMDA 受容体を活性化し²⁰⁾、Ca²⁺ の細胞内流入が亢進する。ii) 細胞内 Ca²⁺ 増加により産生される prostaglandins や nitric oxide などが、逆行性伝達物質としてシナプス前細胞を刺激し、いわゆる "Positive feed back"²¹⁾ 機構が働き、脊髄シナプスは「神経可塑性」となりうる。このような脊髄 Glu 神経系の活動亢進によって、シナプスは上向き調節となり、非侵害性低閾値刺激であっても、これを疼痛と認識し、自発痛および持続痛を引き起こすものと考えられる^{5,6)}。

したがって、低閾値刺激伝達では Glu 含有の神経線維を介することから、脊髄 Glu 神経系の活動亢進が起き、アロディニアを引き起こすものと考えられる。なかでも脊髄 Glu 放出の増加は、アロディニア発現機序に密接に

関与するものと考えられる。

本研究は、以下に述べる脊髄アデノシン受容体の活性化がどのようにこのアロディニア発現とそれに伴う脊髄 Glu 放出に影響するかを初めて検討したものである。

本研究で用いた BIC 誘発モデルは、GABA_A 受容体阻害により誘発されるアロディニアであり、臨床の触覚過敏症状によく一致することから有用とされている^{5,6)}。また、BIC 誘発モデルは脊髄グルタミン酸放出を増強することが分かったが、このことは石川ら (1997)²²⁾ の報告と良く符合している。したがって、BIC 誘発アロディニアは抑制性介在ニューロンの易脆弱性と併せ、脊髄 Glu 神経系の増強が主たる機序と考えられる。

3. アデノシン A₁ 受容体作動薬によるアロディニア調節

本研究から、R-PIA を I.T. 投与した結果、用量依存性の抗アロディニア作用が得られ、その作用はアデノシン A₁ 受容体阻害薬で低下することが判明した。このことは、モデルが異なるが、Lee ら (1996)¹⁴⁾ および Sosnowski ら (1989)²³⁾ がラット坐骨神経結紮後のアロディニアを R-PIA (1-10 nM) が用量依存性に抑制するとして報告に符合する。したがって、脊髄介在ニューロンに局在するアデノシン A₁ 受容体の活性化がアロディニアを

調節しうることを意味する。

つまり、R-PIAにより、後述するように神経伝達物質の放出の減少やWDRニューロンの過分極がもたらされ、アロディニアが抑制されたものと考えられる。シナプス前抑制作用による効果が考えられるが、これについては、他の報告でも α_2 受容体²⁴⁾やN型Caチャンネル阻害薬²⁵⁾の抗アロディニア作用の報告が散見される。したがって、これらに協同して脊髄プリン神経がアロディニアを調節するものと考えられる。

4. 脊髄グルタメート放出機構

GABA_A受容体阻害によるアロディニア発現には、Glu神経の活動亢進が有力な一機序とされているため、本研究ではアロディニア発現あるいはその修飾作用についてCSF-Glu変動について検討した。

BIC投与後のCSF-Gluレベル変化は、対照群ではBIC投与直後に70%増加し、漸次低下した。このことよりアロディニア発現に脊髄グルタメート放出が関与していることが判明し、石川ら(1997)²²⁾の報告にも一致した。これに対し、アデノシンA₁受容体作動薬は、脊髄グルタメート放出増加作用をほぼ完全に抑制し、その作用はAMI併用で低下することが分かった。したがって、アデノシンA₁受容体作動薬は、後角ニューロンの興奮を抑制する作用に加え(過分極)、脊髄の求心性神経終末にも抑制作用を有することが示唆される。このシナプス前抑制作用については、同様にA₈神経終末に局在する α_2 受容体²⁴⁾の活性化やN型Caチャンネルの阻害²⁵⁾により、アロディニアが抑制することを示した報告に関連するものと考えられる。しかし、アロディニアにおけるアデノシンA₁受容体作動薬の抑制作用にCSF-Gluレベルを関連させ、その作用を明らかにしたものは今までにはなかった。

これらのことを考え合わせると、脊髄介在ニューロンに局在するプリン神経系のアロディニアにおける調節機構は(図5)のように模式的に示される。

以上から、脊髄GABA_A受容体阻害により誘発されるアロディニアをアデノシンA₁受容体作動薬が用量依存性に抑制することが分かり、さらにこの抑制には脊髄グルタメート放出を抑制する作用を伴っていることが、本研究から初めて明らかとなった。したがって、アデノシンA₁受容体作動薬は脊髄求心性A₈線維終末のシナプス前抑制作用、および、後角ニューロンの過分極作用を介してアロディニアを調節するものと考えられる。

ま と め

本研究から、アロディニア発現には脊髄GABA含有介在ニューロンの機能低下に加え、Glu神経系の活動亢進が関与する可能性が示唆された。また、R-PIAのI.T.投与で、1)用量依存性にアロディニアを抑制すること、2)その作用はアデノシンA₁受容体阻害薬で低下すること、3)さらに、R-PIAはアロディニア状態における脊髄グルタメート放出増加を抑制することが明らかとなった。これらのことから、アロディニア発現には脊髄NMDA受容体に加え、アデノシンA₁受容体活性を介する調節系の変調も関与することが示唆される。

稿を終えるにあたり、終始ご懇篤なご指導を賜りました、九州歯科大学歯科麻酔学講座仲西 修教授に深甚なる謝意をあらわします。そして、本研究の遂行に多大なご協力を賜った、同講座の諸兄姉に厚くお礼を申し上げます。

引用文献

- 1) Devor, M., Wall, P. D., and Catalan, N.: Systemic lidocaine silences ectopic neuromas and DRG discharge without blocking nerve conduction. *Pain* 48: 261-268, 1992.
- 2) McLachlan, E. M., Jänig, W., Devor, M. and Michaelis, M.: Peripheral nerve injury triggers noradrenergic sprouting within dorsal root ganglia. *Nature* 363: 543-546, 1993.
- 3) Sugimoto, T., Bennett, G. J. and Kajander, K. C.: Strychnine-enhanced transsynaptic degeneration of dorsal horn neurons in rats with an experimental painful peripheral neuropathy. *Neurosci. Lett.* 98: 139-143, 1989.
- 4) Sugimoto, T., Bennett, G. J. and Kajander, K. C.: Transsynaptic degeneration in the superficial dorsal horn after sciatic nerve injury: Effects of a chronic constriction injury, transection, and strychnine. *Pain* 42: 205-213, 1990.
- 5) Yaksh, T. L.: Behavioral and autonomic correlates of the tactile evoked allodynia produced by spinal glycine inhibition: Effects of modulatory receptor systems and excitatory amino acid antagonists. *Pain* 37: 111-123, 1989.
- 6) Sherman, S. E., Loomis, C. W.: Morphine insensitive allodynia is produced by intrathecal strychnine in the lightly anesthetized rat. *Pain* 56: 17-29, 1994.
- 7) Sorkin, L. S. and Puig, S.: Neuronal model of tactile allodynia produced by spinal strychnine: effects of excitatory amino acid receptor antagonists and a

- mu-opiate receptor agonist. *Pain* 68: 283-292, 1996.
- 8) Coderre, T. J., Katz, J., Vaccarino, A. L. and Melzack, R.: Contribution of central neuroplasticity to pathological pain: review of clinical and experimental evidence. *Pain* 52: 259-285, 1993.
 - 9) Reeve, A. J. and Dickenson, A. H.: The roles of spinal adenosine receptors in the control of acute and more persistent nociceptive responses of dorsal horn neurones in the anaesthetized rat. *Br. J. Pharmacol.* 116: 2221-8, 1995.
 - 10) Sosnowski, M., Stevens, C. W., Yaksh, T. L.: Assessment of the role of A_1/A_2 adenosine receptors mediating the purine antinociception, motor and autonomic function in the rat spinal cord. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 250: 915-922, 1989.
 - 11) Malmberg A. B. and Yaksh T. L.: Pharmacology of the spinal action of ketorolac, morphine, ST-91, U 50488H, and L-PIA on the formalin test and an isobolographic analysis of the NSAID interaction. *Anesthesiology* 79: 270-281, 1993.
 - 12) Geiger, J. D., LaBella, F. S., Nagy, J. I.: Characterization and localization of adenosine receptors in rat spinal cord. *J. Neurosci.* 4: 2303-10, 1984.
 - 13) Choca, J. I., Green, R. D., Proudfit, H. K.: Adenosine A_1 and A_2 receptors of the substantia gelatinosa are located predominantly on intrinsic neurons: an autoradiography study. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 247: 757-64, 1988.
 - 14) Lee, Y. W. and Yaksh, T. L.: Pharmacology of the spinal adenosine receptor which mediates the anti-allodynic action of intrathecal adenosine agonists. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 277: 1642-1648, 1996.
 - 15) LoPachin R. M., Rudy, T. A. and Yaksh, T. L.: An improved method for chronic catheterization of the rat spinal subarachnoid space. *Physiol. Behav.* 27: 559-561, 1981.
 - 16) Marsala, M., Malmberg, A. M. and Yaksh, T. L.: The spinal loop dialysis catheter: characterization of use in the unanesthetized rat. *J. Neurosci. Methods* 62: 43-53, 1995.
 - 17) Skilling, S. R., Smullin, D. H., Beitz, A. J. and Larson AA.: Extracellular amino acid concentrations in the dorsal spinal cord of freely moving rats following veratridine and nociceptive stimulation. *J. Neurochem.* 51: 127-132, 1988.
 - 18) Ibuki, T., Hama, A. T., Wang, X. T., Pappas, G. D. and Sagen, J.: Loss of GABA- immunoreactivity in the spinal dorsal horn of rats with peripheral nerve injury and promotion of recovery by adrenal medullary grafts. *Neuroscience* 76: 845-858, 1997.
 - 19) Yamamoto, T. and Yaksh, T. L.: Comparison of the antinociceptive effects of pre- and posttreatment with intrathecal morphine and MK-801, an NMDA antagonist, on the formalin test in the rat. *Anesthesiology* 77: 757, 1992.
 - 20) Dickenson, A. H.: NMDA receptor antagonists as potential analgesics. *Trends Neurosci.* 11: 307-309, 1990.
 - 21) Malinow, R. and Tsien, R. W.: Presynaptic enhancement shown by whole-cell recordings of long-term potentiation in hippocampal slices. *Nature* 346: 177-180, 1990.
 - 22) Ishikawa, T. and Yaksh, T. L.: 触角過敏発現における脊髄抑制性介在ニューロンの役割. *麻酔* 45: 439-444, 1996.
 - 23) Sosnowski, M. and Yaksh, T. L.: Role of spinal adenosine receptors in modulating the hyperesthesia produced by spinal glycine receptor antagonism. *Anesth Analg* 69: 587-592, 1989.
 - 24) Takano, M., Takano, Y. and Yaksh, T. L.: Release of calcitonin gene-related peptide (CGRP), substance P (SP), and vasoactive intestinal polypeptide (VIP) from rat spinal cord: Modulation by α_2 agonist. *Peptide* 14: 371-378, 1993.
 - 25) Chaplan, S. R., Pogrel, J. W. and Yaksh, T. L.: Role of voltage-dependent calcium channel subtypes in experimental tactile allodynia. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 269, 1117-1123, 1994.