炎症性疼痛時における 5-HT_{2A} 受容体阻害薬の 脊髄グルタメートへの影響

中 野 茂

九州歯科大学歯科麻酔学講座 (指導: 仲西 修教授)

平成 12 年 2 月 25 日受理

Local 5-HT_{2A} Receptor Antagonist Attenuates CSF-glutamate Release
in Relation to Hyperalgesia Produced by 5-HT Paw Injection in Rats

Shigeru Nakano

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

Serotonergic neuron located at peripheral sites is thought to be concerned as an one of the pivotal factor of the tissue inflammation which leads to pain behavior. However, which serotonin (5-HT) receptor subtypes is involved in peripheral sensitization is not understood. Sarpogrelate HCl (MCI) is a novel compound which may modulate inflammatory reaction through 5-HT_{2A} receptor antagonism. No data have still been examined the effect of MCI on inflammatory pain response in relation to spinal glutamate (CSF-Glu) release and that whether this effect is affected to 5-HT_{2A} receptor or not. The present study was designed to evaluate the modulating effect of local administration of MCI on the instances of flinching behavior and CSF-Glu after 5-HT injection into the rat paw.

Three days after intrathecal implantation of loop-type microdialysis probe in male Sprague-Dawley rats, 100 μ l of 0.12 % 5-HT was subcutaneously injected into left hind paw. Thereafter, simultaneous determinations of microdialysis at 10min. intervals for glutamate by HPLC-ECD and observation of flinches were performed for 30 min after subcutaneous administration of either drugs (saline for control, MCI, MCI+ α -methyl-5-HT)

Flinching behavior after injection of 5-HT in saline groupe were observed (max. 22 flinches/min. at 1-2 min). CSF-glu in saline groupe increased by 124 % during the first 10 min. MCI in a dose of 5 μ g given s. c. attenuated both flinching / min and CSF-glu. But those effects were antagonized by giving α -methyl-5-HT, 5 μ g.

Based on the present study, MCI administration provokes antinociceptive effect on 5-HT-produced inflammatory pain behaviour in relation to CSF-Glu. These effects were reversed by 5-HT_{2A} receptor agonist, suggesting MCI has a beneficial effect on hyperalgesia via inhibiting selective 5-HT_{2A} receptor and CSF-Glu release.

Key words: 5-HT receptor / MCI / CSF-Glu / Hyperalgesia

緒 言

末梢の組織障害後には、しばしば痛覚閾値の低下や疼痛部位の広がり、すなわち“痛覚過敏症”に遭遇する。しかし、組織障害後の末梢神経系における炎症反応が複合的であることに加え、求心性侵害受容系の脊髄における伝達・調節機構が十分に解明されておらず、的確な治療法もないのが現状である¹⁾。

旧来より、末梢の組織障害により、prostaglandine (PGs), bradykinin (BK), noradrenaline (NA) の他、血小板由来の炎症介在物質 serotonin (5-hydroxytryptamine: 5-HT) が放出され、なかでも 5-HT は末梢知覚神経系に含有する受容体の活性化を介し炎症性疼痛の発症及びその維持に重要に関与することが考えられている²⁾。しかし、どの 5-HT 受容体亜型が介在するのか知られていない。最近の基礎的研究から、一次求心性無髄神経の軸索に 5-HT_{2A} 受容体の免疫活性が認められ³⁾、また後根神経節にも 5-HT_{2A} を含む 5-HT 受容体亜型の mRNA が局在することが明らかにされた⁴⁾。さらに、5-HT の末梢投与は NA 誘発疼痛を増強し、その作用は 5-HT_{2A} 受容体阻害薬 ketanserin や spiperone で消失する⁵⁾など、5-HT_{2A} 受容体の関与を示す報告が多い。しかし、一方では、末梢 5-HT 皮下注入による疼痛反応は 5-HT₁⁶⁾、5-HT₂ および 5-HT₃⁷⁾ 受容体を介する可能性が *in vitro*, *in vivo* の実験において示唆されている。したがって、未だどの受容体亜型の介在が主であるかについては、一定した見解が得られていない。

近年、ラットの脊髄マイクロダイアリシス法⁸⁾が開発され、これは疼痛反応の観察と同時に末梢からの侵害受容が脊髄でどのように伝達されているか、痛みの伝達物質放出を測定することにより痛覚過敏に対する薬物の調節機構を知るうえで大きな注目を集めている。今までに、多くの報告で痛覚過敏に対する薬物の調節機構を知るのに有用とされている。たとえば、痛覚過敏の調節に、末梢組織の炎症反応に由来する求心性入力増加を如何に抑えるかは重要な鍵を握っているが⁹⁾、求心性入力の抑制作用が期待される Ca²⁺ チャンネル阻害薬、アラキドン酸カスケードの抑制薬に加え、5-HT_{2A} 受容体阻害薬¹⁰⁻¹²⁾の脊髄アミノ酸放出への修飾作用を測定することにより、その調節様式(求心性入力の抑制あるいはシナプス前抑制作用など)が分かる。

塩酸サルボクレラート (MCI) は図 1 に示す化学構造式を有し、いままでに血小板凝集の抑制、抗血栓作用を介し、末梢循環障害を改善するとされ、またこれらの作

図 1 MCI の化学構造

用は 5-HT_{2A} 受容体作動薬の投与で消失することが報告されている^{13,14)}。したがって、MCI は前述したように末梢における疼痛発現あるいはその維持機構において、末梢知覚神経に局在する 5-HT_{2A} 受容体の活性化を抑制し、侵害受容を抑制する可能性がある。しかし、MCI の炎症性疼痛に対する鎮痛作用をとくに脊髄アミノ酸放出から調べたものはない。

そこで、本研究では 5-HT 誘発炎症性疼痛モデルを用い、MCI 投与後の疼痛行動および脊髄マイクロダイアリシス法による脳脊髄液中グルタメート (CSF-Glu) 変化を調べた。また同時にその作用は 5-HT_{2A} 受容体選択的であるかどうか検討をした。

実験方法

1. 実験動物および準備操作

実験には Sprague-Dawley ラット (体重 300 ~ 350 g) 16 匹を用いた。明/暗 12 時間 (明 7:00~19:00), 室温 23±2℃ の環境条件下で飼育し、固形飼料および飲水は自由に与えた。

実験 3 日前にマスクによる酸素とハロタン (2~3%) 麻酔下にループ型マイクロダイアリシス (M.D.) プロブを先端が第 1~3 腰髄部クモ膜下腔内 (I.T.) に位置するように挿入、留置した⁸⁾。これらの準備操作により、実験日において、20% 以上の体重減少、運動障害、アロディニアや強いストレス症状の見られるラットは実験から除外した。また、実験終了後は速やかに pentobarbital (150 mg/kg) による深麻酔下にて灌流固定を行い、M.D. プロブの留置位置を確認した (図 2)。

2. 薬物投与ならびに実験群

5-HT 投与で誘発される炎症性疼痛に先行して、5-HT 投与部位より求心側 (1~2 cm) 皮下に治療薬を投与した。薬物投与の種類により、ラットを以下の実験群に分けた。

A) 5-HT 皮下投与による炎症性疼痛

図2 脊髄マイクロダイアリシス実験モデル

ラット左後肢の背側部に 5-HT (H-9523, シグマ) を皮下投与した後、後肢を引っ込める行動 (flinching) の分時回数をカウントした。この観察を 30 分間行った。注入後 3 分までは 1 分毎、5 分より 15 分までは 2.5 分毎、15 分から 30 分までは 5 分毎に行った。まず、被験薬を 5-HT 注入 5 分前に左後肢の 5-HT 皮下投与部位から上位 1 cm の部位に皮下投与した (5 μ l)。その後、ラットに 2 % ハロタンと酸素によるマスク麻酔を 2 分間施し鎮静状態を得た後、5-HT を 100 μ l 左後肢甲部に皮下注入した。注入後は麻酔を中止し、覚醒後 30 分間にわたり flinching を観察した。

B) 実験群

1. Saline (対照) 群: 生理食塩水 5 μ l を投与 (n=5)
2. MCI 群: MCI 5 μ g/5 μ l を投与 (n=6)
3. + α -methyl-5-HT 群: α -methyl-5-hydroxy-tryptamin maleate (α -methyl-5-HT: 5-HT_{2A} 作動薬, M-110, フナコシ) 5 μ g/5 μ l を併用投与 (n=5)。

3. 使用薬物および調製法

MCI (塩酸サルボクレラート, 三菱化学): 5 μ g/5 μ l, α -methyl-5HT: 5 μ g/5 μ l, 5-HT: 120 μ g/100 μ l は原末を蒸留水で溶かし調整した。

4. 脊髄マイクロダイアリシス

M. D. プロブは, Marsala ら (1995)⁸⁾ の方法に準じて作製し、長さ 18 cm, 透析範囲 4 cm, 内径 200 μ m, 外径 300 μ m, cut off 分子量 45 kDa のキュプロファン

膜ホローファイバーに透析部位以外をエポキシ樹脂でコーティングして用いた。本プロブの回収率はデキストロース (100 mg) を用い、37 $^{\circ}$ C 下では約 40 %であることを予め確かめた。ラットを保定籠 (KN 式ボールマンケージ, 2 型, 夏目製作所) に入れ、前述の M. D. プロブの一方に PE-50 チューブ (内径 0.58 mm, 外径 0.965, 長さ 30 cm, イントラメデック) を接続し、微量注入ポンプを用い、人工脳脊髄液 (aCSF) を 10 μ l/分 で灌流した。M. D. プロブの一方に PE-50 チューブを接続し透析液を回収した (図 2)。得られた透析液は CSF-Glu 定量分析まで -80 $^{\circ}$ C で保存した。aCSF の組成は, Na⁺ 151.1, K⁺ 2.6, Mg²⁺ 0.9, Ca²⁺ 1.3, Cl⁻ 122.7, HCO₃⁻ 21.0, HPO₄⁻ 2.5, dextrose 3.5 (単位 mM) とした。

安静状態で 30 分間 aCSF を透析プロブに灌流させたのち、透析液を 10 分毎に 2 回採取した。この 2 回の採取における平均濃度を基準値 (baseline) とし、以後のサンプルは %baseline で表した。5-HT 皮下注入後、痛覚関連行動を観察しながら 30 分後まで 10 分毎に透析液を採取した。透析液中の CSF-Glu 濃度は o-phthalaldehyde 誘導体化法を用い、HPLC-ECD (高速液体クロマトグラフィー, 電気化学検出器) 法で定量分析した。

5. 統計

Flinching 回数および CSF-Glu 濃度 (%baseline) の測定結果は平均 $\pm$ 標準誤差で表した。5-HT 注入後、各時間における flinching 回数の経時的変化および各時間

における群間の差については、一元配置分散分析法で判定し、有意な場合は Fisher の最小有意差法を用い、平均値間について多重比較を行った。危険率 5 % 以下を有意とした。

なお、本実験は、「九州歯科大学における動物実験の指針」に従って行った。

結 果

1. 5-HT 皮下注入後の疼痛関連行動

Saline 群では、5-HT の左後肢注入後 1~2 分におい

図3 5-HT 皮下投与による疼痛関連行動 (flinching) に及ぼす MCI および α -methyl-5-HT の影響

●—Saline 群 ■—MCI 群 ▲—MCI + α -methyl-5-HT 群
 **: $p < 0.01$ vs Saline, *: $p < 0.05$ vs Saline, ##: $p < 0.01$ vs MCI, #: $p < 0.05$ vs MCI.

図4 5-HT 皮下投与後 30 分間における flinching の総和
 *: $p < 0.05$

て flinching が平均 20 回 / 分となるピークを示した。その後は時間と共に減衰し、30 分後では平均 4 回 / 分となるパターンがみられた (図3)。Saline 群の 30 分間における flinching の総和は 114 回であった。一方、MCI 群ではこの flinching のパターンは 1~2 分後で平均 12 回 / 分となり有意に抑制され、flinching の総和も 68 回と有意に抑制することが分かった。また、この MCI の作用は α -methyl-5-HT 併用により減少した。すなわち、1~2 分後のピークで平均 15 回 / 分、flinching の総和 108 回となり、MCI に対して有意に拮抗することが分かった (図3, 4)。

2. 5-HT 注入後の CSF-Glu 濃度の変化

Saline, MCI, α -methyl-5-HT のそれぞれ CSF-Glu の濃度変化に及ぼす影響について結果を (図5) に示す。5-HT 注入後の CSF-Glu 濃度変化は % baseline で示す。baseline の絶対値は全ての群 (50-100 pg/ml) の範囲であった。Saline 群では 5-HT 注入後 CSF-Glu 濃度は 10 分で % baseline は 124 %, 20 分後に 115 % と有意に増加し、30 分後では baseline に復した。一方、MCI 投与では、5-HT 投与後 30 分間にわたり baseline に比べ変化はなく、Saline 群に比べ、10 分および 20 分後における値は有意に低値であった。また、 α -methyl-5-HT 併用では 5-HT 注入後 10 分で % baseline は 115 %, 20 分後で 113 % と有意に増加し、MCI に比べ有意に拮抗することが分かった (図5)

図5 5-HT 皮下投与後の CSF-Glu 変化 (%Baseline)

□ 対照群 ■ MCI 群 ■ MCI + α -methyl-5-HT 群
 各値は平均 ± 標準誤差を示す。

*: $p < 0.05$.

考 察

本研究から、5-HTの皮下注入で誘発される疼痛反応を5-HT_{2A}受容体阻害薬MCIが著しく抑制すること、その作用は5-HT_{2A}受容体作動薬 α -methyl-5-HTで拮抗されること、また、MCIは5-HT皮下注入で誘発されるCSF-Glu濃度増加を抑えることが明かとなった。したがって、炎症性疼痛において、末梢知覚神経線維に局在する5-HT_{2A}受容体の活性化が関与することが脊髄シナプス伝達の面よりも初めて明かになった。

1. 末梢組織障害後の痛覚過敏発生機序

今までに痛覚過敏症の発現には、1)一過性の急性痛の症状(初期反応:急性痛)を呈した後、脊髄後角ニューロンの“神経可塑性”により持続性疼痛反応が現れること¹⁵⁾(“中枢性機序”)に加え、2)末梢組織の炎症反応に起因した知覚神経受容器—求心路系における変調が末梢の侵害受容器を過刺激し、求心性侵害刺激情報を増大し脊髄に伝達すること(“末梢性機序”)によりもたらされるという2面性の機序が考えられている^{11,12)}。

前者の場合では、末梢組織障害後に求心性侵害刺激によって脊髄で神経終末よりグルタミン酸やサブスタンスP(sP)が放出され、シナプス後細胞の受容体を刺激し細胞内Ca²⁺濃度を増加させる結果、ニューロンの感受性が亢進するものと考えられている^{16,17)}。また、この細胞内Ca²⁺濃度の増加は連鎖する細胞内シグナリング反応としてシクロオキシゲナーゼ、Cキナーゼ、一酸化窒素シンターゼを活性化し、それぞれ活性物質PGs、NO産生

の促進、リン酸化反応を介する受容体の持続的活性化をもたらす¹⁸⁾。その結果シナプス間隙に過剰放出されたこれらの活性物質は逆行性にシナプス前細胞を刺激し、神経伝達物質放出を亢進し、さらに脊髄後角ニューロンの受容体の持続的活性化から過敏状態、いわゆる“神経可塑性”を引き起こす。これらのことが、痛みの維持や増強(痛覚過敏)に関与するものと理解されつつある(図6)。本研究はCSF-Glu濃度を検索することにより従来の報告では調べられていなかった脊髄におけるシナプス伝達の関与について明らかにしたものである。

一方、本研究で検討した末梢性機序については、中枢性機序に比べて未だ十分に解明されていない。今までに、末梢組織が障害されると炎症反応が起き、遊離されてくる発痛物質が末梢知覚神経線維を刺激し、sP、NA、5-HTやPGsの放出を促進する。これらは侵害受容器を過刺激することにより求心性侵害刺激情報の増大をもたらす、中枢で痛みを認識するものと考えられている^{19,20)}(図6)。したがって、その治療として末梢レベルにおける求心性入力に炎症反応に由来する増加を如何に抑えるかが有用である。中でも5-HTは、前述したように主要な炎症介在物質であることから、その抑制薬の臨床応用を考える上で5-HT神経その役割を解明することは有意義である⁹⁾。

2. 痛覚過敏と末梢知覚神経における5-HT受容体活性

末梢組織障害後の疼痛を含む病態は、しばしば炎症反応と関連させ理解されている。したがって、炎症反応を

図6 痛覚過敏の発生機序

緩和し、求心性侵害刺激入力の抑制効果をもたらす Ca チャネル阻害薬、アラキドン酸カスケードの抑制薬 (インドメサシンなど) に加え、5-HT 受容体阻害作用をもつ薬物の有効性が期待される。なかでも、炎症の発生および助長因子として主たるものは 5-HT であり、その炎症性疼痛への役割を明らかにすることは臨床的にも重要な意義がある。

そこで本研究では、5-HT 皮下注入の 5 分前に MCI を全身作用を発現し得ない低用量^{6,10)} (5 μg/body) で、炎症誘発部位に局所投与したところ、MCI は flinching、すなわち炎症性疼痛を抑制し、その作用は α-methyl-5-HT (5-HT_{2A} agonist) で拮抗された。一方 CSF-Glu 濃度は、5-HT 注入後に一過性に上昇したが、MCI はその増加を抑えることがわかった。

これらの結果から、MCI は 5-HT_{2A} 受容体阻害作用を介し、抗痛覚過敏作用を有することが明らかになった。投与経路および作用様式からその機序を考えると MCI は、1) 障害された組織部位において 5-HT 神経の軸索およびシナプス後細胞に局在する 5-HT_{2A} 受容体を阻害し、5-HT 神経の興奮性伝達を抑制し、脊髄への求心性入力を抑えて効果を発揮するものと示唆される。

しかし、MCI は末梢循環の改善作用を有することも知られており、障害された知覚神経の栄養供給の改善から神経機能を損なわなかったために、鎮痛効果が得られた可能性も否定出来ない。最近、末梢炎症後に血管透過性が高まり血小板の活性化から 5-HT の放出、再吸収に続く微小血栓の発生などの一連のカスケード的反応過程を調節している末梢 5-HT 神経系については循環器系に関する検討が著しく進んでいる。すなわち、1) 5-HT₁ 受容体が血管内皮細胞に存在し、EDRF (内皮細胞由来血管弛緩因子) の分泌を促進させ血管を弛緩させ、一方 5-HT₂ 受容体は血管平滑筋と血小板に存在し、血管の収縮、血小板の凝集を起こす¹⁸⁾。2) とくに血管系においては、末梢の障害血管において血小板の活性化が生じ、5-HT が放出される。放出された 5-HT は血小板血栓の形成を促すとともに、末梢の血管を収縮させる²¹⁾。このことは、今後末梢循環を合わせ測定しその関与を調べる必要がある。

したがって、これらの示唆的機構と本研究結果を考えると、末梢組織障害後の炎症性疼痛の発生は、末梢知覚神経終末の 5-HT₂ 受容体および末梢血管の 5-HT₂ 受容体の活性化を介しもちたされることが、その場合 MCI は、脊髄におけるシナプス伝達の抑制 (求心性入力の抑制) をもたらすが、本研究から初めて明かと

なった。

最近の報告から、5-HT₂ 受容体以外の関与を示す報告もいくつかある。Doak ら (1997)¹⁰⁾ はホルマリン皮下注入でもたらされる痛覚の過敏反応は 5-HT₁ あるいは 5-HT₃ 受容体阻害薬で抑制されるが、5-HT₂ 受容体阻害薬では炎症に伴う浮腫は抑制するものの、痛覚反応の修飾作用は微弱であることを示し、本研究結果や前述した報告⁶⁾とは異なるとした。このことに加えて、5-HT₁ 受容体阻害薬⁹⁾、および 5-HT₃ 受容体阻害薬⁷⁾が熱的、機械的、化学的侵害受容を抑制することも示唆されている。しかし、本研究から脊髄での求心性侵害入力の様子がわかる脊髄マイクロダイアリス法を用いた結果、炎症性疼痛の発生に 5-HT₂ 受容体の活性化が関与することを強く示唆する。

最近、神経因性疼痛において、MCI がその疼痛を緩和することが報告されたこと、また慢性疼痛で病態生理学的状態にある脊髄局所に大脳縫線核 (5-HT 含有) 細胞を移植し、治療可能であったとする報告が散見される²²⁾。したがって、このような末梢神経系における 5-HT 受容体の活性化のもたらす細胞の再生、分化誘導を促し、痛覚機能障害の回復をなしえる可能性を追求することは、今後の研究の展開に大きな影響を与えるものと考えられる。

ま と め

ラット 5-HT 皮下注入で炎症性疼痛反応がみられた。この疼痛行動は 1~2 分後にピークをもち、その後減衰し 30 分後にはほぼ消失した。この時の CSF-Glu 放出は 20 分まで増加することが明らかになった。また 5-HT_{2A} 受容体阻害薬の使用で疼痛行動および CSF-Glu 放出の増加が抑制され、その作用は 5-HT₂ 受容体作動薬併用で拮抗されることが明かとなった。したがって、このことより炎症性疼痛の末梢性機序として 5-HT₂ 受容体の活性化の関与を示唆された。

稿を終えるにあたりご指導とご校閲を賜りました恩師九州歯科大学歯科麻酔学講座仲西 修教授に深甚なる感謝の意をあらわします。ならびに本研究に数多くのご協力をいただきました同講座の諸兄姉に心からお礼申し上げます。

引用文献

- 1) Treede, R. D., Meyer, R. A., Raja, S. N. and Campbell, J. N.: Peripheral and central mechanisms of cutaneous hyperalgesia Prog Neurobiol 38: 397-421, 1992.

- 2) Rang, H. P., Bevan, S. and Dray, A.: Chemical activation of nociceptive peripheral neurones. *Br. Med. Bull* 47: 534-548, 1991.
- 3) Carlton, S. M. and Coggeshall, R. E.: Immunohistochemical localization of 5-HT_{2A} receptors in peripheral sensory axons in rat glabrous skin. *Brain Res.* 763: 271-275, 1997.
- 4) Pierce, P. A., Xie, G. X., Levine, J. D. and Peroutka, S. J.: 5-Hydroxytryptamin receptor subtype messenger RNAs in rat peripheral sensory and sympathetic ganglia: a polimerase chain reaction study. *Neuroscience* 70: 553-559, 1996.
- 5) Rueff, A. and Dray, A.: 5-Hydroxytryptamin-induced sensitization and activation of peripheral fibres in the neonatal rat are mediated via different 5-Hydroxytryptamin receptors. *Neuroscience* 50: 899-905, 1992.
- 6) Abbott, F. V., Hong, Y. and Blier, P.: Activation of 5-HT_{2A} receptors potentiates pain produced by inflammatory mediators. *Neuropharmacology* 35: 99-110, 1996.
- 7) Giordano, J. and Rogers, L. V.: Peripherally administered serotonin 5-HT₂ receptor antagonists reduce inflammatory pain in rats. *Eur. J. Pharmacol.* 170: 83-86, 1989.
- 8) Marsala, M., Malmberg, A. B., and Yaksh, T. L.: The spinal loop dialysis catheter: characterization of use in the unanesthetized rat. *J. Neurosci. Methods* 62: 43-53, 1995.
- 9) Yaksh, T. L.: An introductory perspective on the study of nociception and its modulation in Anesthesia; *Biologic foundations*, edited by TL Ysksh, Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia pp 471-482, 1997.
- 10) Doak, G. J. and Sawynok, J.: Formalin-induced nociceptive behavior and edema: involvement of multiple peripheral 5-hydroxytryptamin receptor subtypes. *Neuroscience* 80: 939-949, 1997.
- 11) Sufka, K. J., Schomburg, F. M. and Giordano, J.: Receptor mediation of 5-HT-induced inflammation and nociception in rats. *Pharmacol Biochem Behav.* 41: 53-56, 1992.
- 12) Tokunaga, A., Saika, M. and Senba, E.: 5-HT_{2A} receptor subtype is involved in the thermal hyperalgesic mechanism of serotonin in the periphery. *Pain* 76: 349-355, 1998.
- 13) Hara, H., Osakabe, M., and Kitajima A., Tamao, Y. and Kikumoto, R.: MCI-9042, a new antiplatelet agent is a selective 5-HT₂-serotonergic receptor antagonist. *Thrombosis and Haemostasis* 65: 415-420, 1991.
- 14) 高野静子: 血栓形成におけるセロトニンの役割とセロトニン拮抗薬の作用. *基礎と臨床* 29: S611, 1995.
- 15) Dickenson, A. H. and Sullivan, A. F.: Subcutaneous formalin-induced activity of dorsal horn neurons in the rat-differential response to an intrathecal opiate administered pre or post formalin. *Pain* 30: 349-360, 1987.
- 16) Malmberg, A. B. and Yaksh, T. L.: The effect of morphin on formalin-evoked behaviour and spinal release of excitatory amino acids and prostaglandin E₂ using microdialysis in conscious rats. *Br. J. Pharmacol* 114: 1069-1075, 1995.
- 17) Yamamoto, T. and Yaksh, T. L.: Comparison of the antinociceptive effects of pre and post treatment with intrathecal morphine and MK801, an NMDA antagonist, on the formalin test in the rat. *Anesthesiology* 77: 757-763, 1992.
- 18) Malmberg, A. B. and Yaksh, T. L.: Cyclooxygenase inhibition and the spinal release of prostaglandin E₂ and amino acid evoked by paw formalin injection: a microdialysis study in unanesthetized rats. *J. Neurosci.* 15: 2768-2776, 1995.
- 19) Hong, Y. and Abbott, F. V. Bihavioural effects of intraplantar injection of inflammatory mediators in the rat. *Neuroscience* 63: 827-836, 1994.
- 20) Taiwo, Y. O. and Levine, J. D.: Further confirmation of the role of adenylyclase and of cAMP-dependent protein kinase in primary afferent hyperalgesia. *Neuroscience* 44: 131-135, 1991.
- 21) 原 啓人, 越阪部正徳, 山田久美, 中尾健一郎, 玉尾嘉邦: 血管収縮反応に対する塩酸サルボクレラートの作用. *薬理と治療* 19: S611, 1991.
- 22) Eaton, M. J., Santiago, D. L., Dancausse, H. A. and Whitmore, S. R.: Lumbar transplants of immortalized serotonergic neurons alleviate chronic neuropathic pain. *Pain* 72: 59-69, 1997.