Allodynia 発現におけるプリン神経系作用薬の調節機構

水 野 完 治

九州歯科大学歯科麻酔学講座

平成 16 年 2 月 20 日受付

平成 16 年 4 月 12 日受理

The Modification of Purinergic Nerve Agonist for Allodynia via GABA_A

Kanji Mizuno

Department of Dental Anesthesiology,
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, KF24345, R-PIA injected intrathecally (I.T.) on the tactile-allodynia, associated with cerebrospinal fluid (CSF) – glutamate release induced by injection of GABA_A receptor antagonist, bicuculine (BIC).

The microdialysis probe and polyethylene tube (PE-10) were intrathecally implanted into lumbar segment under halothane anesthesia in forty-five Sprague-Dawley rats. After three days, rats were divided into six groups; i) Control (saline), ii) and iii) KF24345 at doses of 10 μ g and 100 μ g, iv) R-PIA at doses of 10 nM, v) 10 nM R-PIA plus 300 nM aminophylline, and vi) 100 μ g KF24345 plus 300 nM aminophylline. The tactile-allodynia was evaluated by touch-evoked agitation (TEA) which 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.). KF24345 and R-PIA attenuated such increases of TEA and CSF-Glu dose-dependently. Such action of KF24345 (100 nM) was reversed by codelivery of aminophylline (300 nM).

Base on the present study, it is clearly demonstrated that KF24345, R-PIA can prevent 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: Allodynia/Adenosine A₁/KF24345/R-PIA

緒 言

中枢神経系における Adenosine 含有神経は、脊髄後角の求心性小径および太い径の神経線維終末および後角ニューロンに対し、立体的神経連絡が認められ¹⁾、また脊髄膠様質に adenosine A₁受容体 (Gi 感受性) が豊富に局在する²⁾。これまでに、テールフリックやホットプレートテストなどの急性痛に対し、adenosine A₁受容体作用薬の I.T. 投与は軽微な作用であるが³⁾、持続痛に対しては強力な鎮痛作用を有し、その作用は adenosine 受容体阻害薬で拮抗されることが報告されている⁴⁾。また、adenosine A₁受容体作用薬はホルマリン注入後の急性痛 (第 1 相) および痛覚過敏 (第 2 相) を、部分的であるが、ともに抑制することが示唆されている⁵⁾。これらのことから、脊髄 adenosine 神経系はさまざまな侵害、非侵害受容における調節に重要な役割を果たしているものと考えられる。しかし、とくに低閾値機械刺激に対する疼痛反応、なかでも allodynia の発現機序との関係については充分明らかではない。

痛みは、病態発生機序により急性痛、神経因性疼痛、さらには心因性疼痛に分類されるが、それぞれに多様な進展過程が存在し、しばしば急性期を過ぎて、難治性の allodynia を含む慢性疼痛へ移行する症例に遭遇する。したがって、このような疼痛管理は複合的治療であるとともに長期的なものであることから、医療の中で重要な一課題とされている。神経因性疼痛のうち、熱性刺激など高閾値求心性刺激により発症する熱性痛覚過敏の病態発現機序は比較的解明されているが、非侵害刺激、機械的低閾値求心性刺激による過敏、すなわち allodynia の病態はほとんど理解されていない。最近の神経生化学的研究の著しい進歩により、allodynia の基礎的、臨床的解明が進展した結果、その主たる機序として、1) 末梢性交感神経系の活動亢進が起こること⁶⁾、および、2) 求心性 A_β線維の神経終末部および広作動域ニューロンの細胞体に軸索を送り、触覚刺激入力を調節する抑制性介在ニューロン (GABA, グリシン含有) の傷害^{7,8)} から、“脱抑制”を起こし、興奮性伝達を亢進させることが示唆されている。これらのことは、GABA_A受容体阻害薬 bicuculline (BIC) やグリシン受容体阻害薬 strychnine の脊髄クモ膜下腔内 (I.T.) 投与が allodynia を発現すること^{9,10)} から理解される。3) さらに allodynia は N-methyl-D-aspartate (NMDA) の I.T. 投与で発現し、その阻害薬 MK-801 で拮抗される¹¹⁾ ことから、glutamate (Glu) 神経系の活動亢進が密接に関与する

ことが考えられる。しかし adenosine A₁受容体活性が脊髄シナプス伝達変調にどのように関与しているのか詳細な機序はまだ十分には理解されておらず、少なくとも触覚過敏反応としての Touch-evoked agitation (TEA) と脊髄 glutamate 放出を同時観測するという面から明らかにしたものはない。そこで、本研究では、GABAA 受容体阻害による触覚 allodynia モデルを用い、TEA の測定と合わせて脊髄マイクロダイアリシスを行うことで、allodynia の発現に対する adenosine 受容体作用薬の影響を調べ、脊髄痛覚伝達におけるプリン神経系の調節様式を検討した。

実験方法

1. 動物および準備操作

Sprague-Dawley 系雄性ラット (体重 300–350 g) を用いて実験を行った。室温 23±2 °C, 明 (7:00–19:00) 暗サイクルで飼育し、飼料および水は自由に与えた。ハロタン (2~3 %) 麻酔下に LoPachin ら (1981)¹²⁾ の方法に準じ、I.T. にポリエチレンカテーテル (ポリエチレンチューブ: 内径 0.28 mm, 外径 0.61 mm, 長さ 9 cm: PE10, イントラメデック) およびループ型マイクロダイアリシスプローブ (MD 特製) プローブを先端が腰髄 I~III レベルの I T に位置するように挿入、留置した (Fig. 1)。マイクロダイアリシスプローブは、Marsala ら (1995)¹³⁾ の方法で、長さ 18 cm, 透析範囲 2 + 2 cm, 内径 200 μm, 外径 300 μm, cut off 分子量 45 kDa のキュプロファン膜ホローファイバーを用いて作成した (回収率は約 40 %) (Fig. 1)。これらの操作後、20 % 以上の体重減少あるいは脊髄障害や強いストレス症状のないことを確認し、3~7 日後に実験を行った。

2. 使用薬物および調整法

KF24345 (adenosine uptake inhibitor), R-PIA (R(-)-N⁶-2-phenyl-isopropyl adenosine, adenosine A₁ agonist, フナコシ), AMI (aminophylline, A₁ / A₂ receptor antagonist, シグマ) は BIC 注入 10 分前に、それぞれを I.T. 投与した (フラッシュ量 10 μl を含み最大量が 30 μl となるよう各試薬を調整した)。KF24345 および R-PIA は少量の DMSO (dimethyl sulfoxide) で溶解し、その後生理食塩水と混ぜ、また BIC および AMI は生食水で溶解し、目標の濃度として使用した。このうち、KF24345 群における用量は、BIC 注入後の触覚過敏反応 (TEA) を抑制、また明らかな運動障害をきたさないとされる用量として 10 μg および 100 μg を用いた。

Fig. 1 Intrathecal Microdialysis.

3. Allodynia 実験ならびに実験群

A) Allodynia 実験

allodynia 発現のために BIC の I.T. 投与を行う 10 分前に、各実験群の薬物を I.T. 投与した。この前処置のために投与する薬物の種類により、ラットを後述のように 6 群に分けた。

前処置を行った後、マスクでハロタン麻酔（吸入濃度は 1 %）にて鎮静させ、実験台にうつ伏せにして固定し、マイクロシリンジ（30 G）を用いて BIC（10 μ g/10 μ l）を I.T. 投与した。BIC 投与後、30 分間 5 分毎に TEA を測定した。TEA は Yaksh (1989)¹⁰ の方法に準じ、ラットの腰部を 3 本の鉛筆の先で尾側より頭側に向かって約 5 秒毎に正中、両背側を撫でるようにして刺激を与え、それに対する反応の強さを判定するため 4 段階スコアを設けた。すなわち、0: 無反応、1: 軽度なもがき、2: 中等度なもがき、3: 強いもがき、鳴き声および逃避行動を評価基準とし、5 分毎の測定値を 10 分単位で合算し、TEA スコアとした。

B) 実験群

- 1) Saline (対照) 群生理食塩水 10 μ l 投与 (n=8)
- 2) KF24345 (10 μ g) 投与 (n=8)
- 3) KF24345 (100 μ g) 投与 (n=7)
- 4) KF24345 (100 μ g) + AMI (300 nM) 投与 (n=6)
- 5) R-PIA (10 nM) 投与 (n=6)
- 6) R-PIA (10 nM) + AMI (300 nM) 投与 (n=7)

4. 脊髄マイクロダイアリシスの検討

ラットをマスクでハロタンを鎮静量吸入させ、実験台にうつ伏せにして固定し、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 (CSF, pH 7.2) を 10 μ l/分 で灌流させ、マイクロダイアリシスを行った (Fig. 1)。まず、安静状態で 30 分間灌流させた後、基準 (baseline) 値の測定のため透析液を 10 分毎に 2 回採取した。その後、I.T. カテーテルより各薬剤の投与を行い TEA を観察しながら透析液を 30 分間 10 分毎に採取した。回収した透析液は、測定までの間、冷凍庫 (−80 °C) にて保存した。人工脳脊髄液の組成は Na⁺ 151.1, K⁺ 2.6, Mg²⁺ 0.9, Ca²⁺ 1.3, Cl[−] 122.7, HCO₃[−] 21.0, PO₄^{3−} 2.5, dextrose 3.5 (単位 mM) とした。透析液中の Glu 濃度を o-phthalaldehyde 誘導体化法を用い、高速液体クロマトグラフィー電気化学検出器 (HPLC-ECD) を用い定量分析した。

5. 測定値の統計学的処理

TEA スコアおよび CSF-Glu 濃度 (%基準値) の測定結果は平均±標準誤差で表した。また、TEA スコアの総和を Σ TEA として群間の比較を行った。Glu 濃度の経時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 Least significant-difference (最小有意差) 法を用い、それぞれ各時間における基準値からの差、および同一時間における群間の差について多重比較を行った。危険率 5 % 以下を有意とした。TEA スコアについては、Mann-Whitney U test で、透析液中の Glu 濃度は、二

元配置分散分析法で判定し、有意な場合は LSD 法を用い多重比較を行った。危険率 5 % 以下を有意とした。

以上の実験は、九州歯科大学および山口大学動物実験委員会の倫理基準および実験指針に準じて行った。

結 果

1. KF-24345 及び R-PIA の BIC 誘発 allodynia に対する修飾作用

結果を Fig. 2-A, B に示す。対照群では TEA スコア

は 10 分で 4.5 と一過性に著しく増加したのち、30 分で 1.2 と減少することが明らかになった。この時の Σ TEA は 8.7 であった。KF24345 10 μ g 群では 10 分で 3.0 と対照群と有意差がみられたが、20 分で 2.8、30 分で 0.8 と有意差はなかった。また、KF24345 100 μ g 群と R-PIA 群ではそれぞれ 10 分で 1.1、0.7、20 分で 1.2、0.8 と対照群との間に有意差がみられ、KF24345 は用量依存性に TEA スコアを抑制した。また、これらのことは Σ TEA でみても、KF24345 10 μ g、100 μ g 群および R-

Fig. 2-A Time course of effect of Adenosine A_1 agonist on BIC-induced Allodynia.

Fig. 3-A Time course of effect of Adenosine A_1 agonist for KF24345 on BIC-induced Allodynia.

Fig. 2-B Sum of TEA score.

Fig. 3-B Sum of TEA score.

Fig. 4-A The effects of an Adenosine A_1 antagonist for R-PIA on BIC-induced Allodynia.

Fig. 4-B Sum of TEA score.

PIA 群は対照群に対し有意な抑制を示した。

2. KF24345 および R-PIA 作用の adenosine 受容体特異性

KF24345 100 μ g 群および R-PIA 群の抗 allodynia 作用に対する adenosine 受容体の関与をみるため、AMI 300 nM の併用投与を行った。その結果、KF24345 100 μ g 群の抗 allodynia 作用は AMI の併用投与で抑制された (Fig. 3-A, B)。同様に R-PIA 群における抗 allodynia 作用も AMI の併用投与で抑制された (Fig.

Fig. 5 Effect of an Adenosine A_1 on CSF-Glutamate during BIC-induced Allodynia.

4-A, B).

3. 脳脊髄中の Glu 変化

CSF-Glu は BIC 投与によって著しく増加し、baseline に比較して 10 分値は 100 % の増加を示した。その後漸時減少したが、30 分値でも 27 % の増加を維持していた。KF24345 10 μ g, 100 μ g および R-PIA の各投与群ではこのような顕著な変化は見られなかった。すなわち、KF24345 10 μ g の 10 分では baseline の 7 % 増加を示したのみであり、KF24345 10 μ g, 100 μ g および R-PIA では僅かに減少傾向がみられた。いずれにしても BIC による CSF-Glu の増加はこれらの薬物投与により有意に抑制された (Fig. 5)。

考 察

1. Allodynia 発現機序

最近の研究から、allodynia 発現に関し、中枢性機序の様式に関する検討が進み、およそ以下の 2 つの概念が成立しつつある。すなわち、1 つは脊髄第 3-4 層に局在する抑制性の GABA や glycine 含有介在ニューロンは低酸素のみならず、繰り返し刺激に対し極めて易傷害性が高く (脆弱細胞群)、その調節としての機能低下が起きることにより、興奮性神経系の活動亢進がもたらされ、いわゆる脱抑制^{7,8)}を起こすことである。また他の 1 つとして脊髄 GABA_A や glycine 受容体阻害により触覚過敏

が誘発され^{9,10)},それが脊髄クモ膜下腔内グルタミン酸受容体阻害薬^{9,15)}の他, α_2 受容体作用薬¹⁶⁾やAdenosine A_1 受容体作用薬¹⁷⁾により抑制されることが判り,これらの神経系がallodynia発現機構に密接に関与することが理解されるようになった。

一方,交感神経遮断術による効果も報告され^{18,19)},このことは末梢性機序の存在を示唆するもので,こうした考えは以下の事からも支持される。たとえば,末梢神経損傷後や脊髄低酸素・虚血により,脊髄第3-4層で選択的にdark neuronなどが生ずることから脆弱細胞群の存在が示唆され,いわゆる脱抑制機序により,興奮性神経系の活動増強がもたらされている可能性がある⁶⁾。

さらに,Toddら(1990)²⁰⁾は電気生理学的研究から,脊髄後角において,GABAやglycine含有神経系が求心性 A_β 神経終末に対しシナプス前抑制作用を有し,また,後角ニューロンに対しても抑制性(過分極)に働くことを示した。このことは,GABA_A受容体やglycine受容体阻害薬のI.T.投与でallodyniaが発現することからも理解できる^{9,10)}。したがって,末梢からの低閾値触覚刺激の脊髄後角での受容を調節しているこれらの抑制性介在ニューロンの機能低下が引き金となって,allodyniaが発現するものと考えられる。その後,Yamamotoら(1992)¹⁶⁾が,allodyniaはNMDA受容体阻害薬投与で拮抗されることを示し,Glu神経系の活動亢進の関与が示唆され,治療法を考える上で注目されるようになった。このことは,末梢神経損傷後,求心性 A_β 線維においてGlu神経が興奮することを意味し,それによって連鎖する以下の複合的な生化学的反応がallodyniaを引き起こしていると考えられた。allodynia発現では,non-NMDA受容体(AMPA/KA),NMDA受容体が活性化され²¹⁾, Ca^{2+} の細胞内流入が促進し,それにより産生される一酸化窒素やアラキドン酸などが逆行性伝達物質としてシナプス前細胞を刺激し脊髄シナプスが可塑的となり,この中枢過敏状態が非侵害性刺激を疼痛と認識し,allodyniaが発現するものと考えられるようになった^{10,22)}。一方,末梢性機序については,allodyniaは α_2 受容体作用薬の末梢投与や損傷前の交感神経遮断術が効果的であることから,末梢交感神経の緊張によりもたらされていることも考えられている¹⁶⁾。

本研究で用いたBIC誘発allodyniaモデルは,臨床でみられるallodynia症状によく一致することから有用とされている。このGABA_A受容体阻害により誘発されるallodyniaは,本研究の予備実験からも脊髄NMDA受容体阻害薬で抑制されることが確認された。これは,

前述したYamamotoら(1992)¹⁶⁾の結果に一致する。さらに,脊髄へのNMDA投与でallodyniaが発現し²³⁾,その作用はNMDA受容体阻害薬で拮抗されることも報告されている¹⁶⁾。したがって,これらのことからBIC誘発allodyniaは,抑制性介在ニューロンの易傷害性と併せ,脊髄glutamate神経系の増強が主たる機序と考えられる。そこで,本研究ではBICとadenosine A_1 受容体作用薬との併用実験を行い,その結果はallodynia発現におけるプリン神経系の調節機構解明だけでなく,治療面にも有用な情報を提供するものと考えられる。すなわち,NMDA受容体阻害薬以外に脊髄でシナプスを形成し鎮痛作用を有する薬物に広く着目することの意義が明らかになった。これらの薬物についてallodyniaモデルにおける併用効果を調べることにより,臨床応用の可能性や合理的な薬物療法を確立するための基礎的知見が得られるのではないかと期待される。また,本研究ではallodyniaモデルに脊髄マイクロダイアリシス法を実施することにより,TEAの変化に伴うCSF-Gluの動態を明らかにした。これによりプリン神経系による制御様式の一端が明らかになり,薬物併用効果の発現機序が新たに判明したものと考ええる。

2. Adenosine A_1 受容体による抗allodynia発現機序

本研究から,従来よりその鎮痛作用が報告されているR-PIAに加え,adenosine uptake阻害作用を有するKF24345が用量依存性にallodyniaを抑制することが明らかとなった。この場合,BIC誘発では脊髄シナプス伝達はglutamate放出の亢進,すなわちシナプス後と併せ,シナプス前への脱抑制作用が関与し,もたらされるものと考えられ,KF24345はこれら両面を抑制するものと考えられる。また,予備実験からこの抗allodynia作用はKF15372(adenosine A_1 antagonist)で抑制され,KF17837(A_2 antagonist)では作用しないことが分かった。

これらの結果から,adenosine受容体の活性化は A_β 線維の脊髄後角における介在神経の阻害による(脱抑制)中枢性allodyniaに対し,脊髄での神経連絡におけるシナプス前(glutamate放出亢進の抑制作用),後(過分極作用)両面に作用するものとし唆される。最近,Yamamotoら(2002)²⁴⁾はホルマリン注入による炎症性疼痛において,R-PIAがCSF-Gluへは影響せずに鎮痛効果を示すことを明らかにした。このことは,炎症性疼痛,つまりC線維の持続的興奮による痛覚過敏反応では,主にシナプス後細胞に作用し鎮痛作用を発揮するこ

とを意味し、本研究の allodynia への鎮痛発現機序とは大きく異なることが明らかとなった。痛みの伝達とその調節において介在する神経系及び脊髄での神経連絡の違いの存在が新たに判明したものと考えられる。このように、allodynia は痛覚過敏 (hyperalgesia) とは異なる脊髄シナプス伝達系を介して起こっていると考えられる。

3. Glutamate 神経のシナプス伝達

本研究では allodynia 発現あるいはその修飾作用について検討するため特殊に開発されたループ型マイクロダイアリス法²⁵⁾を行い、脊髄 Glu 濃度変化を観測した。我々は組織の炎症性疼痛では、adenosine A₁受容体作用薬は脊髄における Glu 放出を抑制しないことを報告した²⁴⁾。しかし、本研究の GABA_A受容体阻害による allodynia 発現では不明のままであり adenosine A₁受容体作用薬の疼痛様式による作用の差異の存在を裏付ける一端として、脊髄シナプス伝達を直接に観察した。その結果、対照では BIC 投与直後に基準値より 70 %増加し、これに対し adenosine 関連薬の投与は、この放出増加をほぼ完全に抑制した。これらの結果から、adenosine 関連薬は allodynia における Glu 放出を抑制することが、本研究から初めて明らかとなった。すなわち、adenosine 神経系は、炎症性疼痛における C線維を介する刺激伝達では脊髄シナプス前からの伝達物質放出にはほとんど影響せず、広作動域ニューロンにおいて、Gi/K⁺ conductance 亢進を介し過分極をもたらすとされる。しかし、allodynia 発現では、adenosine 神経系の痛覚調節における役割は、後角ニューロン (シナプス後) に対する過分極作用に加え、強力なシナプス前抑制作用を有し鎮痛効果を発揮するものであり、C線維を介する痛覚過敏に対する調節機構とは機能的に異なっていることが明かとなった。

ま と め

以上から、allodynia 発現に、1) Glu 神経系の活動亢進、および、2) GABA 含有介在ニューロンの阻害作用が関与することが明らかとなった。また、3) プリン神経系作用薬は、脊髄後角シナプス後細胞への抑制に加え、Glu 放出亢進の抑制作用、つまり求心性刺激線維終末に対する前抑制作用を介し、抗 allodynia 作用を発揮することが明らかとなった。

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) Choca, J. I., Green, R. D. and Proudfit, H. K.: Adenosine A₁ and A₂ receptors of the substantia gelatinosa are located predominantly on intrinsic neurons: an autoradiography study. *J. Pharmacol. Expe. Ther.* 247: 757-764, 1988.
- 2) Schulte, G., Robertson, B., Fredholm, B. B., DeLander, G. E., Shortland, P. and Molander, C.: Distribution of antinociceptive adenosine A₁ receptors in the spinal cord dorsal horn, and relationship to primary afferents and neuronal subpopulations. *Neuroscience* 121: 907-916, 2003.
- 3) Sosnowsky, M., Stevens, C. W. and Yaksh, T. L.: Assessment of the role of A₁/A₂ adenosine receptors mediating the purine antinociception, motor and autonomic function in the rat spinal cord. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 250: 915-922, 1989.
- 4) Lee, Y. W. and Yaksh, T. L.: Pharmacology of the spinal adenosine receptor which mediates the antiallodynic action of intrathecal adenosine agonists. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 277: 1642-1648, 1996.
- 5) Poon, A. and Sawynok, J.: Antinociception by adenosine analogs and an adenosine kinase inhibitor: dependence on formalin concentration. *Eur. J. Pharmacol.* 286: 177-184, 1995.
- 6) Yaksh, T. L., Pogrel, J. W., Lee, Y. W. and Chaplan, S. R.: Reversal of nerve ligation-induced allodynia by spinal alpha-2 adrenoceptor agonists. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 272: 207-214, 1995.
- 7) Hwang, J. H. and Yaksh, T. L.: The effect of spinal GABA receptor agonists on tactile allodynia in a surgically-induced neuropathic pain model in the rat. *Pain* 70: 15-22, 1997.
- 8) Kontinen, V. K., Stanfa, L. C., Basu, A. and Dickenson, A. H.: Electrophysiologic evidence for increased endogenous gabaergic but not glycinergic inhibitory tone in the rat spinal nerve ligation model of neuropathy. *Anesthesiology* 94: 333-339, 2001.
- 9) Ishikawa, T., Marsala, M., Sakabe, T. and Yaksh, T. L.: Characterization of spinal amino acid release and touch-evoked allodynia produced by spinal glycine or GABA(A) receptor antagonist. *Neuroscience* 95: 781-786, 2000.
- 10) 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.

- 11) Ma, Q. P. and Woolf, C. J.: Noxious stimuli induce an N-methyl-D-aspartate receptor-dependent hypersensitivity of the flexion withdrawal reflex to touch: implications for the treatment of mechanical allodynia. *Pain* 61: 383-390, 1995.
- 12) 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.
- 13) 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.
- 14) 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.
- 15) Carlton, S. M., Zhou, S. and Coggeshall, R. E.: Evidence for the interaction of glutamate and NK1 receptors in the periphery. *Brain Res.* 790: 160-169, 1998.
- 16) 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.
- 17) Sosnowsky, M., Stevens, C. W. and Yaksh, T. L.: Assessment of the role of A₁/A₂ adenosine receptors mediating the purine antinociception, motor and autonomic function in the rat spinal cord. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 250: 915-922, 1989.
- 18) Ringkamp, M., Eschenfelder, S., Grethel, E. J., Habler, H. J., Meyer, R. A., Janig, W. and Raja, S. N.: Lumbar sympathectomy failed to reverse mechanical allodynia- and hyperalgesia-like behavior in rats with L5 spinal nerve injury. *Pain* 79: 143-53, 1999.
- 19) Kim, S. H., Na, H. S., Sheen, K. and Chung, J. M.: Effects of sympathectomy on a rat model of peripheral neuropathy. *Pain* 55: 85-92, 1993.
- 20) Todd, A. J. and Sullivan, A. C.: Light microscope study of the coexistence of GABA-like and glycine-like immunoreactivities in the spinal cord of the rat. *J. Comp. Neurol.* 296: 496-505, 1990.
- 21) Dickenson, A. H.: NMDA receptor antagonists as potential analgesics. *Trends Neurosci.* 11: 307-309, 1990.
- 22) Sherman, S. E. and Loomis, C. W.: Morphine insensitive allodynia is produced by intrathecal strychnine in the lightly anesthetized rat. *Pain* 56: 17-29, 1994.
- 23) 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.
- 24) Yamamoto, S., Nakanishi, O., Matsui, T., Shinohara, N., Kinoshita H., Lambert C., and Ishikawa, T.: Intrathecal adenosine modulates nociceptive response to formaline paw injection without inhibiting spinal glutamate release in the rat. *Cell Mol. Neurobiol.* 23: 175-185, 2002.
- 25) 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.