Cellular mechanism for spinal cord electrical stimulation-induced analgesia

Terumasa Nakatsuka, Wataru Taniguchi, Yasuhiko Kawasaki
Tsugumi Fujita, and Eiichi Kumamoto

Department of Physiology, Faculty of Medicine, Saga University

[Received 29 January 2009, Accepted 16 March 2009]

Abstract

Spinal cord electrical stimulation (SCS) is the most commonly used implantable neurostimulation modality for the management of pain syndromes. However, cellular mechanisms of SCS-evoked analgesia have been poorly understood at this time. In the present study, whole-cell patch-clamp recordings were performed from substantia gelatinosa (SG) neurons in adult rat spinal cord slices to determine which neurotransmitters are influenced by SCS. Although repetitive stimuli applied to the dorsal root did not induce any slow responses, ones focally applied to the spinal dorsal horn produced slow inhibitory postsynaptic currents (IPSCs) at a holding potential of -50 mV in about 30% of the SG neurons recorded. The amplitude and duration of slow IPSCs increased with the number of stimuli and decreased with removal of Ca^{2+} from the external Krebs solution. Slow IPSCs were associated with an increase in membrane conductance; their polarity was reversed at a potential close to the equilibrium potential for K^{+} , calculated from the Nernst equation. Slow IPSCs were blocked by addition of GDP- β -S into the patch-pipette solution, reduced in amplitude in the presence of Ba^{2+} , and significantly suppressed in the presence of an antagonist of GIRK channels, tertiapin-Q. Somatostatin produced an outward current in a subpopulation of SG neurons and the slow IPSC was occluded during the somatostatin-induced outward current. Moreover, slow IPSCs were significantly inhibited by a somatostatin receptor antagonist, cyclo-somatostatin. These results indicate that endogenous somatostatin released from interneurons or descending fibers by SCS may induce slow IPSCs by activating GIRK channels in SG neurons. It is suggested that this slow synaptic transmission may play an important role in SCS-evoked analgesia.

Key words: SCS; Analgesia; Somatostatin; Spinal cord; Patch-clamp

PAIN RESEARCH 24 (2009) 117–125

脊髄電気刺激による鎮痛機構

中塚 映政／谷口 亘／川崎 康彦／藤田 亜美／熊本 栄一

佐賀大学医学部 生体構造機能学講座 神経生理学分野

はじめに

脊髄電気刺激による鎮痛法（脊髄電気刺激療法）は、鎮痛薬や神経ブロック治療に対して抵抗性の難治性慢性疼痛に対して臨床応用されている。脊髄電気刺激療法は非ステロイド性消炎鎮痛剤（NSAIDs）やモルヒネなどの鎮痛薬が無効な症例に対して有効であることから、その鎮痛作用は従来の鎮痛薬とは全く異なることが示唆されてきた。

脊髄電気刺激療法による鎮痛機構を明らかにするために、Meyersonらは脊髄電気刺激療法を施行している患者の脳脊髄液を採取し、モノアミンをはじめ、サブスタンスP、ソマトスタチン、コレシストキニン、ニューロテンシンなど種々の神経ペプチド含有量を測定した¹⁵⁾。採取した脳脊髄液において脊髄電気刺激によって有意に増加している物質はサブスタンスPだけであり、脊髄電気刺激によって遊離する物質は少量でかつ急速に代謝されるために脳脊髄液の採取によって脊髄電気刺激に関連する物質を同定することは困難であると結論づけられた。彼らはマイクロダイアリシス法を用いて実験を続け、脊髄電気刺激によって脊髄後角におけるグルタミン酸などの興奮性アミノ酸の遊離が減少する一方、GABAの遊離が増加することを示した⁴⁾。一方、馬場らは脊髄スライス標本を用いて脊髄膠様質ニューロンにパッチクランプ法を適用し、脊髄電気刺激によってGABAの遊離が増加するだけでなく、脊髄膠様質ニューロンにおいて緩徐な抑制性シナプス後電位が発生することを単一細胞レベルで明らかにした¹⁾。残念ながら、末梢からの痛み情報を伝達するAδ線維ならびにC線維が入力する脊髄膠様質ニューロンにおいて緩徐な抑制性応答が発生す

ることは脊髄電気刺激による鎮痛機構にとって極めて重要であると考えられたが、その発生機序は全く不明であった。今回、我々は成熟ラットの脊髄スライス標本を用いて、脊髄後角の膠様質ニューロンからパッチクランプ記録を行い、脊髄電気刺激によって発生する緩徐な抑制性応答を詳細に解析した。

方 法

1. 脊髄横断スライスの作製

成熟Sprague-Dawley系雄性ラットをウレタン腹腔内投与(1.2～1.5 g/kg)によって深麻酔を施行した後、腰仙部レベルの椎弓切除を行った。脊髄を摘出した後、直ちに95% O₂-5% CO₂で飽和し、かつ冷却した人工脳脊髄液(2～4℃)を浸したシャーレに移し、実体顕微鏡下に硬膜を除去した後、左L5以外の全ての後根および前根を切除した。くも膜および軟膜を除去した後、浅い溝を形成したブロック状の寒天上に置き固定した。マイクロスライサを用いて、厚さ650 μmの左L5後根付き脊髄横断スライスを作製した。切り出したスライスを記録用チャンバ内に移し、95% O₂-5% CO₂で飽和した人工脳脊髄液を5～10 ml/minの速度で灌流した。人工脳脊髄液の組成は、NaCl 117 mM, KCl 3.6 mM, NaH₂PO₄ 1.2 mM, CaCl₂ 2.5 mM, MgCl₂ 1.2 mM, NaHCO₃ 25 mM, glucose 11 mMであった。

2. 細胞内記録

脊髄膠様質はスライス下部から透過光で観察すると、後角の背側表層に位置する比較的明るい帯として観察することができる。実体顕微鏡

の観察下 (20~40 倍) に記録電極を盲目的に膠様質に刺入して, 単一の膠様質ニューロンからパッチクランプ法を用いて電気応答を記録した。記録用電極には, potassium gluconate 135 mM, KCl 5 mM, CaCl_2 0.5 mM, MgCl_2 2 mM, EGTA 5 mM, ATP-Mg 5 mM, HEPES 5 mM を充填した先端電極抵抗 5~10 M Ω の微小ガラス電極を用いた。得られた記録電流はパッチクランプ増幅器 (Molecular Devices 社製, Axopatch 200B) により増幅し, データ記録および解析用ソフト (Molecular Devices 社製, pClamp⁸⁾) を用いて, 記録ならびに解析した。データは全て mean $\pm$ S.E. で表わした。検定は Student's paired t test で行い, $p < 0.05$ を有意とした。括弧内の n は記録したニューロンの数である。

使用した薬剤について, somatostatin, cyclo(7-aminoheptanoyl-Phe-D-Trp-Lys-Thr[Bzl]) (cyclo-somatostatin), tertipin-Q, endomorphin-1, naloxone hydrochloride, D-Phe-Cys-Tyr-D-Trp-Arg-Thr-Pen-Thr-NH₂ (CTAP), CGP 35348, methiothepin, 8-cyclopentyl-1,3-dipropylxanthine (DPCPX), 6-cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione (CNQX), DL-2-amino-5-phosphonopentanoic acid (AP5), GDP- β -S は Sigma 社から, yohimbine hydrochloride と sulpiride は和光純薬, CGP 52432 は Tocris 社から購入し, WAY100635 は旭化成ファーマ株式会社から供与された。

結 果

脊髄膠様質ニューロンにホールセル・パッチクランプ法を適用し, 膜電位を -50 mV に固定して, 保持膜電流の変化に着目した (Fig.1-A)。単極の刺激電極を用いて, 脊髄後角を局所的に

Fig.1 Synaptic responses evoked in substantia gelatinosa neurons by spinal cord electrical stimulation.

(A) Schematic diagram of a spinal cord slice preparation in which electrically-evoked synaptic responses were examined. Focal stimulation was given via a monopolar silver wire electrode positioned near the recorded neuron to activate the fibers of interneurons, or descending fibers. Orthodromic stimulation of the dorsal root was performed using a suction electrode to activate primary afferent fibers. (B) A slow IPSC elicited by repetitive stimuli at 20 Hz for 1 s (stimulus strength and duration: 0.6 mA and 0.4 ms, respectively), focally applied to the dorsal horn with a monopolar electrode. (C) Dependence of slow IPSCs on the number of stimuli given. Slow IPSCs elicited by various numbers (shown on the left of each trace) of stimuli at 20 Hz, given to the dorsal horn. Note that the slow IPSCs increased in amplitude and duration with an increase in the number of stimuli. The holding potential (V_H) used was -50 mV.

20 Hz で 20 回 (刺激強度: 0.3~1.0 mA, 刺激持続時間: 0.4 ms) 反復刺激すると, 記録した 289 ニューロンのうち, 94 ニューロンにおいて, 緩

徐な抑制性シナプス後電流 (slow inhibitory postsynaptic current: slow IPSC) が観察された (**Fig.1-B**)。脊髓電気刺激によって生じた slow IPSC の平均振幅は 62 ± 4 pA, 平均持続時間は 59 ± 4 s であった ($n=73$)。また, 脊髓電気刺激を 5~10 分間隔で行っても, slow IPSC の振幅に変化はなかった。過去にも報告したように¹⁹⁾, 吸引刺激電極を用いて後根を刺激(強度:0.5 mA, 持続時間:0.1 ms)すると Aδ 線維誘起興奮性シナプス後電流 (excitatory postsynaptic current: EPSC) あるいは C 線維誘起 EPSC が観察されたが, 同様の刺激条件で後根を 20 Hz で 20 回反復刺激しても緩徐なシナプス応答は観察されなかった(データ記載なし)。

Fig.1-C のように, 脊髓刺激回数を増やすと slow IPSC の振幅ならびに持続時間は増加した。また, slow IPSC は細胞外カルシウムイオン濃度に依存していた (**Fig.2-A**)。無カルシウム溶液中における slow IPSC の平均振幅は 15 ± 6 pA で, 同一記録ニューロンにおける通常的人工脳脊髄液中の平均振幅 (54 ± 4 pA, $n=4$) と比較して有意に減少した。一方, 脊髓電気刺激によって発生した slow IPSC はグルタミン酸受容体阻害薬により影響を受けなかった (**Fig.2-B**)。CNQX (10 μ M) と AP5 (50 μ M) 存在下における slow IPSC の平均振幅は 48 ± 8 pA で, 同一記録ニューロンでの CNQX ならびに AP5 非存在下における平均振幅 (48 ± 8 pA, $n=4$) と比較して有意な変化は認めなかった。

脊髓電気刺激によって生じる slow IPSC にどのようなイオンチャンネルが関与しているかを検討するために, まず, 保持膜電位を変えて slow IPSC を観察した (**Fig.3-A**)。保持膜電位が -90 mV に近づくにしたがって, slow IPSC の振幅ならびに持続時間は減少した。もっと正確に解

Fig.2 Characterization of slow IPSCs evoked by spinal cord electrical stimulation.

(A) Dependence of slow IPSCs on extracellular Ca^{2+} concentration. Slow IPSCs produced by repetitive stimuli focally applied to the dorsal horn in normal (left) and nominally Ca^{2+} -free Krebs solution (right). Note that the slow IPSCs were largely decreased in amplitude and duration in a Ca^{2+} -free solution. (B) Effect of glutamate receptor antagonists on slow IPSCs. Slow IPSCs were produced by repetitive stimuli focally applied to the dorsal horn in the absence (left) and presence of CNQX (10 μ M) and AP5 (50 μ M) (right). Note that glutamate receptor antagonists did not significantly change the amplitude and duration of slow IPSCs. (C) Effect of the intracellular injection of GDP- β -S on slow IPSCs. Slow IPSCs were produced by repetitive stimuli focally applied to the dorsal horn just after (left) and 30 min (right) after establishing the whole-cell configuration using a patch-pipette solution containing GDP- β -S (2 mM). Note that the intracellular injection of GDP- β -S reduced the amplitude of slow IPSCs. (D) Effect of the GIRK channel blocker tertiapin-Q on slow IPSCs. Repetitive stimuli were focally applied to the dorsal horn in the absence (left) and presence of tertiapin-Q (0.1 μ M; right). Note that the slow IPSCs were markedly decreased in amplitude and duration in the presence of tertiapin-Q. $V_H = -50$ mV.

Fig.3 Identification of the ionic mechanisms underlying slow IPSCs evoked by spinal cord electrical stimulation.

(A) Slow IPSCs produced by a repetitive stimulation given to the dorsal horn, recorded at various V_{Hs} . (B) Membrane currents in response to voltage pulses from -50 to -140 mV in steps of 10 mV before (left) and just after repetitive stimulation (right). (C) Membrane currents, which were plotted against membrane potentials; these were obtained before (filled triangles) and just after a repetitive stimulation (filled circles). The current-voltage relationship for net slow IPSCs (open circles) was estimated from the difference between the current responses before and just after a repetitive stimulation.

析するために、コントロールならびに slow IPSC 発生時における電流-電圧関係を調べた (Fig.3-B)。その結果, slow IPSC 発生時には膜の透過性は増加し, slow IPSC の逆転電位は -95.3 ± 2.1 mV ($n=4$) であった (Fig.3-C)。記録電極内液と人工脳脊髄液の間に存在する液間電位を考慮すると, この電位はそれらの液の組成から計算される K^+ の平衡電位にほぼ等しかった。また, slow IPSC 発生中のコンダクタンスの膜電位依存性について, -110 mV でのスローブコンダクタンスは, -70 mV のスローブコンダクタンスより有意に大きく, 電流-電圧曲線は内向き整流性を呈していた (Fig.3-C)。

slow IPSC の発生に細胞膜 G 蛋白質が関与す

るかどうかを調べるために, G 蛋白質の活性を阻害する GDP- β -S (2 mM) を加えた記録電極を使用した (Fig.2-C)。パッチクランプ記録直後, 脊髄電気刺激によって発生した slow IPSC の平均振幅は 62 ± 13 pA であったが, 記録 30 分後には 5 ± 3 pA ($n=4$) となり, 記録電極内に GDP- β -S を加えることによって slow IPSC の平均振幅は有意に減少した。また, 非選択的 K^+ チャネルの阻害薬である Ba^{2+} 存在下に実験を行った (データ記載なし)。 Ba^{2+} (0.5 mM) 存在下における slow IPSC の平均振幅は 14 ± 2 pA で, 同一記録ニューロンでの Ba^{2+} 非存在下における平均振幅 (47 ± 7 pA, $n=6$) と比較して有意に減少した。G 蛋白質共役型内向き整流性 K^+ チャネル (G-protein-coupled, inwardly-rectifying K^+ チャネル: GIRK チャネル) の阻害薬である tertiapin-Q (0.1 μ M) 存在下における slow IPSC の平均振幅は 16 ± 3 pA で, 同一記録ニューロンでの tertiapin-Q 非存在下における平均振幅 (59 ± 15 pA, $n=5$) と比較して有意に減少した (Fig.2-D)。

脊髄電気刺激によって発生した slow IPSC がどの神経伝達物質を介する応答であるかを同定するために, 種々の神経伝達物質阻害薬を用いて実験を行った。これまでに, 脊髄膠様質ニューロンではオピオイド, アデノシン, ノルアドレナリン, セロトニン, ドーパミンなど様々な神経伝達物質によって外向き電流が誘起されることが知られている^{5,6,13,23,24,26})。まず, オピオイド受容体阻害薬を用いて実験を行った (データ記載なし)。 μ -オピオイド受容体阻害薬である CTAP (1 μ M) 存在下における slow IPSC の平均振幅は 40 ± 13 pA で, 同一記録ニューロンでの CTAP 非存在下における平均振幅 (42 ± 14 pA, $n=4$) と比較して有意な変化は認めなかった (Table 1)。さらに, 非選択的オピオイ

Table 1 Slow IPSC amplitudes in the absence and presence of neurotransmitter-receptor antagonists

Receptor	Antagonist	Conc., μM			No. of Cells
			– Amplitude, pA	+ Amplitude, pA	
Opioid	Naloxone	1	52 ± 5	45 ± 5	11
μ -Opioid	CTAP	1	42 ± 14	40 ± 13	4
Adenosine A ₁	DPCPX	1	51 ± 9	49 ± 9	6
GABA _B	CGP 35348	50	42 ± 2	42 ± 1	4
GABA _B	CGP 52432	50	54 ± 8	54 ± 8	6
α_2 -Adrenergic	Yohimbine	1	54 ± 8	47 ± 8	10
5-HT ₁	Way100635	10	53 ± 13	54 ± 12	4
5-HT _{1A}	Methiotepin	10	52 ± 10	51 ± 9	5
Dopamine D ₂ -like	Sulpiride	30	59 ± 9	60 ± 8	4
Somatostatin	Cyclo-somatostatin	5	69 ± 13	$39 \pm 11^*$	5

– and +: the absence and presence of antagonists, respectively. Values are means $\pm$ S.E. *: $p < 0.05$

ド受容体阻害薬である naloxone (1 μM) 存在下における slow IPSC の平均振幅は 45 ± 5 pA で、同一記録ニューロンでの CTAP 非存在下における平均振幅 (52 ± 5 pA, $n=11$) と比較して有意な変化は認めなかった (Table 1)。脊髄電気刺激によって発生する slow IPSC は、オピオイド受容体阻害薬と同様に、アデノシン A₁ 受容体阻害薬 (DPCPX), GABA_B 受容体阻害薬 (CGP 35348, CGP52432), α_2 アドレナリン受容体阻害薬 (yohimbine), 5-HT₁ 受容体阻害薬 (WAY 100635), 5-HT_{1A} 受容体阻害薬 (methiotepin), ドーパミン D₂ ライク受容体阻害薬 (sulpiride) により影響を受けなかった (Table 1)。

近年、神経ペプチドであるソマトスタチンは G 蛋白質共役型 K⁺チャネルを介して脊髄膠様質ニューロンの膜を過分極することが報告されている^{7,9)}。そこで、我々はソマトスタチン (1 μM) を灌流投与したところ、記録した 13

ニューロンのうち、5 ニューロンにおいて外向き電流が観察された (Fig.4-A)。また、ソマトスタチンにて外向き電流が発生した全てのニューロンにおいて、脊髄電気刺激によって slow IPSC が発生した。興味深いことに、ソマトスタチンによって外向き電流が発生している間に誘起された slow IPSC の平均振幅は 16 ± 3 pA で、外向き電流が発生していない状況下での平均振幅 (68 ± 15 pA, $n=5$) と比較して有意に減少した (Fig.4-A)。さらに、また、非選択的ソマトスタチン受容体阻害薬である cyclo-somatostatin 存在下実験を行った (Fig.4-B)。cyclo-somatostatin (5 μM) 存在下における slow IPSC の平均振幅は 39 ± 11 pA で、同一記録ニューロンでの cyclo-somatostatin 非存在下における平均振幅 (69 ± 13 pA, $n=6$) と比較して有意に減少していた。

Fig.4 A possible involvement of somatostatin in the slow IPSC.

(A) Bath-applied somatostatin (1 μ M) produced an outward current. A Slow IPSC was occluded during the somatostatin-induced outward current. (B) Effect of cyclo-somatostatin, a somatostatin receptor antagonist, on slow IPSCs. Repetitive stimuli were focally applied to the dorsal horn in the absence (left) and presence of cyclo-somatostatin (5 μ M; right). Note that the slow IPSCs were inhibited by cyclo-somatostatin. $V_H = -50$ mV. (C) Schematic diagram showing the activation of GIRK channels by somatostatin in substantia gelatinosa neurons. Endogenous somatostatin released from spinal interneurons or descending fibers, but not from primary afferent fibers, activates GIRK channels via G-protein coupled somatostatin receptors.

考 察

今回、脊髄膠様質ニューロンにおいて、後根を電気刺激しても緩徐なシナプス応答は観察されなかったが、脊髄を局所的に電気刺激すると slow IPSC が観察された。G 蛋白質の活性を阻

害する GDP- β -S によって slow IPSC は阻害されることから、slow IPSC の発生には G 蛋白質の活性化が関与している。また、slow IPSC の極性はネルンストの式から計算される K^+ の平衡電位に近い膜電位で逆転することから、slow IPSC の発生には K^+ チャンネルが関与している。これらの結果は、slow IPSC の振幅が非選択的 K^+ チャンネルの阻害薬である Ba^{2+} あるいは GIRK チャンネルの阻害薬である tertiapin-Q によって抑制されることによって証明された。一方、slow IPSC の振幅はソマトスタチンによって外向き電流が発生している間に減少し、ソマトスタチン受容体阻害薬によって有意に減少される。以上の結果から、脊髄電気刺激によって遊離するソマトスタチンが脊髄膠様質ニューロンのソマトスタチン受容体を活性化し、その結果、G 蛋白質を介して GIRK チャンネルを活性化することが明らかになった (**Fig.4-C**)。

GIRK チャンネルは中枢神経系に広く存在し、主に、G 蛋白質を介する緩徐な抑制性シナプス応答に関与していることが知られている²⁰⁾。GIRK チャンネルをコードする遺伝子には GIRK1-4 あるいは Kir3.1-3.4 と呼ばれる 4 種類が存在し、中枢神経系の GIRK チャンネルは GIRK1-3 を含む 4 量体で構成されている¹⁰⁾。脳では GIRK1-3 がいずれも発現しているが⁸⁾、脊髄では GIRK1 と GIRK2 だけが後角表層、特に膠様質に局限して発現している¹⁴⁾。また、GIRK1 あるいは GIRK2 ノックアウトマウスでは、痛覚過敏を呈することから、GIRK チャンネルは鎮痛に関与していることが示唆された¹⁰⁾。しかしながら、脊髄内の GIRK チャンネルがどのような内因性の神経伝達物質によって、どのように機能的に作用するかは不明であった。本研究によって脊髄内の GIRK チャンネルは痛みの制

御に重要な役割を果たしていることが明らかになった。

ソマトスタチンは当初、視床下部の神経内分泌ホルモンとして発見され、脳下垂体からの成長ホルモン分泌を抑制することが知られている²⁾。最近、ソマトスタチンは中枢神経系に広く存在し、G蛋白質共役型ソマトスタチン受容体に結合して多彩な生理作用を呈することが明らかになった²¹⁾。脊髄腔へのソマトスタチン投与は鎮痛作用を呈することや、脊髄後角ニューロンにおける発火がソマトスタチンによって抑制されることから、ソマトスタチンは脊髄レベルでは痛覚伝達機構を制御する^{17,18)}。さらに、近年、ソマトスタチンは一部の膠様質ニューロンに作用して膜を過分極することが示された^{7,9)}。ソマトスタチン含有ニューロンやソマトスタチン免疫反応陽性の神経終末が後角表層に豊富に存在する^{3,16)}。これらソマトスタチン免疫反応陽性の神経終末は、視床下部からの下行性線維だけでなく¹¹⁾、一次求心性線維や脊髄介在ニューロンに由来すると考えられる²⁵⁾。しかしながら、本研究で後根を電気刺激しても緩徐なシナプス応答は観察されなかったため、脊髄電気刺激によって遊離するソマトスタチンは一次求心性線維ではなく、脊髄内介在ニューロンあるいは下行性線維に由来することが示唆された。これまでに、5種類のソマトスタチン受容体がクローニングされ¹²⁾、そのいくつかは脊髄膠様質ニューロンに発現している²²⁾。しかしながら、ソマトスタチン受容体の選択的な阻害薬は殆んど市販されておらず、脊髄電気刺激によって誘起されるslow IPSCが、どのサブタイプのソマトスタチン受容体を介した応答なのかは同定できなかった。

結 語

脊髄電気刺激によって脊髄介在ニューロンあるいは下行性抑制性神経線維終末から遊離される内因性のソマトスタチンによってGIRKチャネルが活性化し、膠様質ニューロンの膜が過分極することが明らかとなった。したがって、本機序が脊髄電気刺激による鎮痛機構に関与することが推察された。

文 献

- 1) Baba, H., Yoshimura, M., Nishi, S., Shimoji, K., Synaptic responses of substantia gelatinosa neurones to dorsal column stimulation in rat spinal cord *in vitro*, *J. Physiol.*, 478 (1994) 87-99.
- 2) Brazeau, P., Vale, W., Burgus, R., Ling, N., Butcher, M., Rivier, J., Guillemin, R., Hypothalamic polypeptide that inhibits the secretion of immunoreactive pituitary growth hormone, *Science*, 179 (1973) 77-79.
- 3) Chung, K., Briner, R.P., Carlton, S.M., Westlund, K.N., Immunohistochemical localization of seven different peptides in the human spinal cord, *J. Comp. Neurol.*, 280 (1989) 158-170.
- 4) Cui, J.-G., Linderth, B., Meyerson, B.A., Effects of spinal cord stimulation on touch-evoked allodynia involve GABAergic mechanisms. An experimental study in the mononeuropathic rat, *Pain*, 66 (1996) 287-295.
- 5) Fujita, T., Kumamoto, E., Inhibition by endomorphin-1 and endomorphin-2 of excitatory transmission in adult rat substantia gelatinosa neurons, *Neuroscience*, 139 (2006) 1095-1105.
- 6) Ito, A., Kumamoto, E., Takeda, M., Takeda, M., Shibata, K., Sagai, H., Yoshimura, M., Mechanisms for ovariectomy-induced hyperalgesia and its relief by calcitonin: participation of 5-HT_{1A}-like receptor on C-afferent terminals in substantia gelatinosa of the rat spinal cord, *J. Neurosci.*, 20 (2000) 6302-6308.
- 7) Jiang, N., Furue, H., Katafuchi, T., Yoshimura, M., Somatostatin directly inhibits substantia gelatinosa neurons in adult rat spinal dorsal horn *in vitro*, *Neurosci. Res.*, 47 (2003) 97-107.
- 8) Karschin, C., Dißmann, E., Stühmer, W., Karschin, A., IRK(1-3) and GIRK(1-4) inwardly rectifying K⁺ channel mRNAs are differentially expressed in the adult rat brain, *J. Neurosci.*, 16 (1996) 3559-3570.

- 9) Kim, S.J., Chung, W.H., Rhim, H., Eun, S.-Y., Jung, S.J., Kim, J., Postsynaptic action mechanism of somatostatin on the membrane excitability in spinal substantia gelatinosa neurons of juvenile rats, *Neuroscience*, 114 (2002) 1139-1148.
- 10) Koyrakh, L., Luján, R., Colón, J., Karschin, C., Kurachi, Y., Karschin, A., Wickman, K., Molecular and cellular diversity of neuronal G-protein-gated potassium channels, *J. Neurosci.*, 25 (2005) 11468-11478.
- 11) Krisch, B., Somatostatin-immunoreactive fiber projections into the brain stem and the spinal cord of the rat, *Cell Tissue Res.*, 217 (1981) 531-552.
- 12) Lahlou, H., Guillermet, J., Hortala, M., Vernejoul, F., Pyronnet, S., Bousquet, C., Susini, C., Molecular signaling of somatostatin receptors, *Ann. N Y Acad. Sci.*, 1014 (2004) 121-131.
- 13) Liu, T., Fujita, T., Kawasaki, Y., Kumamoto, E., Regulation by equilibrative nucleoside transporter of adenosine outward currents in adult rat spinal dorsal horn neurons, *Brain Res. Bull.*, 64 (2004) 75-83.
- 14) Marker, C.L., Stoffel, M., Wickman, K., Spinal G-protein-gated K⁺ channels formed by GIRK1 and GIRK2 subunits modulate thermal nociception and contribute to morphine analgesia, *J. Neurosci.*, 24 (2004) 2806-2812.
- 15) Meyerson, B.A., Brodin, E., Linderorth, B., Possible neurohumoral mechanisms in CNS stimulation for pain suppression, *Appl. Neurophysiol.*, 48 (1985) 175-180.
- 16) Mizukawa, K., Otsuka, N., McGeer, P.L., Vincent, S.R., McGeer, E.G., The ultrastructure of somatostatin-immunoreactive cell bodies, nerve fibers and terminals in the dorsal horn of rat spinal cord, *Arch. Histol. Cytol.*, 51 (1988) 443-452.
- 17) Mollenholt, P., Rawal, N., Gordh, T. Jr., Olsson, Y., Intrathecal and epidural somatostatin for patients with cancer. Analgesic effects and post-mortem neuropathologic investigations of spinal cord and nerve roots, *Anesthesiology*, 81 (1994) 534-542.
- 18) Murase, K., Nedeljkov, V., Randic, M., The actions of neuropeptides on dorsal horn neurons in the rat spinal cord slice preparation: an intracellular study, *Brain Res.*, 234 (1982) 170-176.
- 19) Nakatsuka, T., Ataka, T., Kumamoto, E., Tamaki, T., Yoshimura, M., Alteration in synaptic inputs through C-afferent fibers to substantia gelatinosa neurons of the rat spinal dorsal horn during postnatal development, *Neuroscience*, 99 (2000) 549-556.
- 20) Sadjá, R., Alagem, N., Reuveny, E., Gating of GIRK channels: details of an intricate, membrane-delimited signaling complex, *Neuron*, 39 (2003) 9-12.
- 21) Schindler, M., Humphrey, P.P.A., Emson, P.C., Somatostatin receptors in the central nervous system, *Prog. Neurobiol.*, 50 (1996) 9-47.
- 22) Schulz, S., Schreff, M., Schmidt, H., Händel, M., Przewlocki, R., Höllt, V., Immunocytochemical localization of somatostatin receptor sst_{2A} in the rat spinal cord and dorsal root ganglia, *Eur. J. Neurosci.*, 10 (1998) 3700-3708.
- 23) Sonohata, M., Furue, H., Katafuchi, T., Yasaka, T., Doi, A., Kumamoto, E., Yoshimura, M., Actions of noradrenaline on substantia gelatinosa neurones in the rat spinal cord revealed by *in vivo* patch recording, *J. Physiol.*, 555 (2004) 515-526.
- 24) Tamae, A., Nakatsuka, T., Koga, K., Kato, G., Furue, H., Katafuchi, T., Yoshimura, M., Direct inhibition of substantia gelatinosa neurones in the rat spinal cord by activation of dopamine D2-like receptors, *J. Physiol.*, 568 (2005) 243-253.
- 25) Tessler, A., Himes, B.T., Gruber-Bollinger, J., Reichlin, S., Characterization of forms of immunoreactive somatostatin in sensory neuron and normal and deafferented spinal cord, *Brain Res.*, 370 (1986) 232-240.
- 26) Yoshimura, M., North, R.A., Substantia gelatinosa neurones hyperpolarized *in vitro* by enkephalin, *Nature*, 305 (1983) 529-530.