Analysis of Nociceptive Transmission in the Adult Rat Spinal Cord Slice

Megumu Yoshimura, Yohichi Yajiri and Syogoro Nishi

*Department of Physiology, Kurume University School of Medicine, Kurume
Japan*

(Received 6 May 1993)

Abstract

In an attempt to study the mechanism of nociceptive transmission in the spinal dorsal horn, intracellular recordings were made from neurons located in substantia gelatinosa (SG; lamina II of Rexed) in slices of the adult rat spinal cord which retained an attached dorsal root. In many SG neurons, stimulation of primary afferent A δ fibers evoked initial fast excitatory postsynaptic potentials (EPSPs) followed by fast and/or slow inhibitory postsynaptic potentials (IPSPs). The fast EPSPs observed in a majority of SG neurons were monosynaptic and inhibited by a glutamate receptor antagonist of non-NMDA subclass. While the IPSPs appeared to be polysynaptic and were abolished by either strychnine or bicuculline. In 25 % of SG neurons, stimulation of primary afferent C fibers evoked fast EPSPs. The time course and amplitude of the C fiber-evoked EPSPs were similar to those evoked by A δ fibers and were depressed by a non-NMDA receptor antagonist. These observations suggest that SG neurons receive glutamatergic inputs from primary afferent A δ and /or C fibers, and glycine as well as GABA inputs from interneurons which are innervated by A δ fibers. Thus, the slice preparation cut from adult rats provides detail information concerning nociceptive transmission at a single cell level in the spinal dorsal horn.

Key Words : intracellular recording, spinal cord slice, dorsal horn, primary afferent, synaptic response

成熟ラット脊髄スライス標本を用いた脊髄後角における痛覚伝達機序の解析

吉村 恵¹ 矢尻 洋一² 西 彰五郎¹

¹久留米大学医学部 生理学第1講座

²新潟大学医学部 整形外科教室

緒 言

Melzack と Wall¹³⁾ による Gate Control Theory の発表 (1965 年) 以来, 脊髄後角第 2 層ニューロン, いわゆる膠様質細胞は痛覚伝達の制御に重要な役割を果たしている可能性を示唆する報告が多くみられる^{1,2)}. 膠様質には多数の小型細胞がみられ, 形態的特徴より主に 2 種類の細胞に分けられている⁶⁾. 1 つは膠様質背側に存在する stalk 細胞, 他は腹側に存在する islet 細胞である. Stalk 細胞の一部はその軸索を背側に伸ばし, 第 1 層の視床投射ニューロンとシナプスを形成している⁵⁾. 一方, islet 細胞の樹状突起および軸索は膠様質に局限している⁹⁾. 免疫組織学的研究より膠様質にはグルタミン酸含有細胞^{4,18)}, glycine¹⁵⁾, γ -aminobutyric acid (GABA)¹⁴⁾ および enkephalin^{7,11)} などの抑制性伝達物質を含む細胞とその受容体の存在が報告されている. さらに, 痛覚伝達物質と考えられているサブスタンス P 含有終末も密に存在する^{3,4)}. また, 膠様質は末梢より多くの痛覚伝達に関与する A δ および C 線維入力を受けている^{17,19,20)}. これらのことより, 末梢からの痛覚情報は視床投射ニューロンに伝えられるとともに, 膠様質細胞にも伝えられ, 投射ニューロン出力をコントロールしている可能性が考えられる. しかし, 単一細胞レベルにおける膠様質細胞の痛覚伝達に及ぼす影響は未だ明らかなではない. これは膠様質細胞が中枢神経系の中でもっとも小型の細胞に属し, in vivo での細胞内記録が困難であることによる. 私たちは安定した細胞内記録を行うため, 成熟ラット脊髄横断または縦断スライスに後根を付した標本を開発した^{19,20)}. スライス標本では膠様質細胞の同定は容易で, また, 後根刺激によるシナプス応答の長時間記録が可能である. 今回, このスライス標本を用いて, 一次求心性 A δ および C 線維刺激により膠様質細胞に誘起される興奮性および抑制性シナプス電位を細胞内記録し, 脊髄後角における痛覚伝達機序の解析を行った.

方 法

1. 脊髄スライス標本

Sprague-Dawley 系の雄ラット (体重 150~250 g) を用い, urethane による腹腔内麻酔 (1.5 g/kg) 後, 腰仙部の椎弓切除を行った. およそ 1.5 cm の長さに脊髄を切り出し, 酸素負荷した低温 (2~4 °C) の Krebs 液に浸した. 硬膜を除去した後, 一側の L5 または L6 後根を残し, 他の後根および前根を切除した. 温存した後根の周囲領域以外のクモ膜と軟膜を除去した後, 脊髄を寒天ブロックに設けた溝に置き, 不用な両端を切除した. 寒天ブロックとともに脊髄をリユースサイトのステージ上に接着剤で固定し, 冷却した Krebs 液で満たした vibratome の中に設置した. 横断スライス (Fig. 1A) 作製時には, 脊髄をステージに垂直に, 縦断スライス (Fig. 1B) 作製時には, ステージに平行に脊髄を固定した. 後根を付した厚さ約 500 μ m の横断または縦断スライスを vibratome によって作製し, これを記録用チャンパー中のナイロンメッシュ上に軽く固定した後, 両面を Krebs 液で灌流した (30 ml/min).

2. 細胞内記録および電気刺激

脊髄膠様質細胞からの細胞内記録には K-acetate を充填した先端電気抵抗 120~200 M Ω の微小ガラス電極を用いた. 後根の電気刺激は吸引電極を用いて行った. 後根内の A α / β , A δ と C 線維の閾値刺激強度を単離した後根一坐骨神経標本を用い, 吸引電極刺激によって誘起された複合活動電位を細胞外記録電極を用いて観察した. 同じ吸引電極を脊髄スライスに付した後根 (長さ 6~10 mm) 刺激に用いた. A δ および C 線維により誘起されるシナプス応答の刺激強度は単離した神経標本のそれとよく一致した.

3. 膠様質細胞の同定

膠様質細胞の同定はスライス断面における記録細胞の位置, 脊髄表面からの深さおよび細胞の形態的特徴に基づいて行った. 横断スライスにおける膠様質は, 後角背側に位置する著明に明るい細胞帯として容易に視認できる. また, 縦断スライスでは後根

Fig. 1 Schematic arrangement of recording and stimulation in transverse and longitudinal slices. **A**: Transverse slice which had a thickness of $500\ \mu\text{m}$ and retained an attached dorsal root. **B**: Longitudinal slice.

侵入部外側に位置する比較的明るい帯として認められる。記録細胞は脊髄表面から $50\sim 250\ \mu\text{m}$ の深さに位置した。これは、横断スライスを用いて計測した膠様質の表面からの深さに一致した。また、その電気的膜特性も横断スライスで同定した膠様質細胞のそれと類似していた。さらに一部の記録ニューロンでは 2.5 % Lucifer Yellow または 5 % carboxyfluorescein を充填した電極よりこれらの色素を過分極パルスによって注入し、電気活動を記録後、蛍光顕微鏡を用いてその形態を調べた¹⁹⁾。記録細胞の形態および大きさは今まで報告された膠様質 stalk または islet 細胞に類似していた。

結 果

52 匹の成熟ラットより脊髄スライス標本を作り、321 個の膠様質細胞から細胞内記録を行った。細胞内記録は 12 時間以上可能で、同一細胞から 6 時間に及ぶ安定した記録も得ることができた。

1. 後根刺激によって誘起されるシナプス電位

約 60 % の細胞において、後根刺激に引き続き短くかつ一定潜時の興奮性シナプス電位 (excitatory postsynaptic potential; EPSP) が誘起された (**Fig. 2-A**)。5 % の細胞においては、弱い刺激では何ら応答

を示さなかったが、刺激を増大することにより一定した長潜時の EPSP が観察された (**Fig. 2-C**)。20 % の細胞では、一定した短および長潜時の EPSP が誘起された (**Fig. 2-B**)。残り 15 % の細胞では潜時不定の EPSP が誘起された (**Fig. 2-D**)。約 40 % の細胞において、静止膜電位レベル (約 $-68\ \text{mV}$) では EPSP のみが観察されたが、 $-60\ \text{mV}$ 近くで脱分極すると EPSP に遅れて抑制性シナプス電位 (inhibitory postsynaptic potential; IPSP) が出現した (**Fig. 2-E**)。

まず、85 % の細胞で観察された潜時一定の fast EPSPs が単シナプス性応答、すなわち記録細胞が一次求心線維から直接入力を受けているか否かを検討した。短潜時、長潜時 EPSP とともに、低頻度閾値刺激によりその潜時に変化はみられなかった (**Fig. 3-A1, B1**)。さらに、高頻度刺激においても、EPSP の振幅は著明に減少したが、その潜時には何ら変化は認められなかった (**Fig. 3-A2, B2**)。以上の結果は、一定した短、および長潜時 EPSP が単シナプス性であることを示唆する。一方、**Fig. 2-D, E** に示した潜時不定の EPSP および IPSP は多シナプス性応答と考えられる。つぎに単シナプス性短潜時、長潜時 EPSPs がいかなる一次求心線維の活動により誘起されているかを検討した。短潜時 EPSP の潜時 (0.7

Fig. 2 Representative synaptic responses in substantia gelatinosa neurons evoked by primary afferent stimulation. **A**: Constant and short latency EPSPs. **B**: Constant short and long latency EPSPs. **C**: Constant and long latency EPSPs. **D**: Variable latency EPSPs. **E**: Variable latency IPSPs followed EPSP.

Fig. 3 Consistency of the latency of EPSP with low (**A1, B1**) and high (**A2, B2**) frequency threshold stimulations. **A**: Dorsal root was stimulated with threshold intensity for A δ (**A1**) or C (**B1**) fibers at low frequency (1 Hz, **A1, B1**) and high frequency (10 Hz, **A2, B2**). Note that the latency of EPSPs was constant, although the EPSPs were decreased in amplitude.

Fig. 4 Effect of excitatory amino acid receptor antagonist on A δ fiber-evoked monosynaptic EPSPs. Records were obtained from two neurons (**A** and **B**). **A**: Effect of non-NMDA receptor antagonist CNQX (10 μ M). CNQX reversibly depressed EPSP (**A2**). **B**: Effect of NMDA receptor antagonist APV (50 μ M). The falling phase of EPSPs was depressed (**B2**). However, the peak amplitude was not affected (**B3**).

Fig. 5 Effect of excitatory amino acid receptor antagonist on the A δ - and C fiber-mediated monosynaptic EPSPs. **A**: High intensity stimuli applied to dorsal root elicited both the A δ - and C fiber-mediated EPSPs. CNQX markedly depressed both EPSPs (**B**). The effect was reversible (**D**).

Fig. 6 Effect of inhibitory amino acid receptor antagonist on the fast IPSPs. **A**: Low intensity stimulation applied to dorsal root elicited the fast IPSPs. GABA_A receptor antagonist bicuculline (10 μ M) had no appreciable effect on the IPSPs (**B**). Glycine receptor antagonist strychnine (1 μ M) abolished the IPSPs (**C**).

Fig. 7 Effect of GABA_A receptor antagonist bicuculline on the slow IPSPs. Bicuculline (10 μ M) abolished the IPSPs (**B**).

～2.4 ms) と刺激後根の長さから算出した EPSP 誘起線維の伝導速度は 5～7 ms であった。これは今まで報告された A δ 線維の伝導速度に一致する¹²⁾。また、短潜時 EPSP を誘起する後根刺激閾値強度は 2.0V, 0.1 ms で、これは A δ 線維の閾値強度に一致する。一方、長潜時 EPSP 誘起線維の伝導速度は 0.4

～0.8 ms であり、これは C 線維のそれに一致する¹²⁾。さらに、長潜時 EPSP は A δ 線維刺激強度では誘起されず、C 線維刺激強度ではじめて誘起された。

2. A δ および C 線維誘起 EPSP に対する興奮性アミノ酸受容体拮抗薬の作用

興奮性アミノ酸受容体の 1 つ、non-N-methyl-D-

aspartic acid (non-NMDA) 受容体拮抗薬である 6-cyano-7-nitroquinoxaline-2, 3-dione (CNQX; 5~10 μ M) は A δ 線維誘起単シナプス性 EPSP を濃度依存性に抑制した (Fig. 4-A2, A3). 一方, NMDA 受容体拮抗薬の DL-2-amino-5-phosphonovaleric acid (APV; 50~100 μ M) は EPSP の振幅には著明な変化を与えず, その持続時間を減少させた. (Fig. 4-B2, B3). つぎに, C 線維誘起単シナプス性 EPSP に対する作用を検討した. Fig.5-A は, 後根の A δ および C 線維刺激による単シナプス性 EPSP を示す. CNQX は A δ および C 線維誘起 EPSPs を著明に抑制した (Fig. 5-B2). 以上の結果は, A δ および C 線維共に L-グルタミン酸を伝達物質とし, 主に non-NMDA 受容体を介し fast EPSP を惹起していることを示唆する.

3. A δ 線維刺激により発生する IPSP の性質

A δ 線維刺激によって約 40 % の膠様質細胞に IPSP が誘起された. この IPSP はその時間経過および薬理的性質から, 速い IPSP (fast IPSP) (Fig. 6) と緩徐な IPSP (slow IPSP) (Fig. 7) に分けられた. IPSP が観察された細胞の約 30 % では fast IPSP が, 他の 30 % の細胞では slow IPSP が, 残り 40 % の細胞では fast と slow IPSP が誘起された. これら 2 種類の IPSP はその潜時が不定で, また A δ 線維誘起単シナプス性 EPSP より常に潜時が長いことから, 多シナプス性応答と考えられる. Fast IPSP は 30~60 ms の持続を示した (Fig. 6). GABA 受容体の 1 つ, GABA_A の拮抗薬であるピククリン (bicuculline; 10~20 μ M) は fast IPSP の振幅には何ら変化を与えなかった (Fig. 6-B). 一方, グリシン (glycine) 受容体拮抗薬のストリキニン (strychnine; 0.5~2 μ M) は著明に fast IPSP を抑制した (Fig. 6-C). Slow IPSP は fast IPSP と比較してより緩徐な時間経過を示した (80~400 ms) (Fig. 7). この slow IPSP はピククリンによってほぼ完全に抑制された (Fig. 7-B). また, 40 % の膠様質細胞で, ストリキニンによる IPSP の初期成分の抑制, ピククリンによる緩徐な成分の抑制が観察された. 上記の結果は, fast IPSP はグリシンによって, slow IPSP は GABA によって

仲介されていることを示唆する. また, 一部の細胞はグリシンおよび GABA 線維入力を受けていることを示す.

考 察

1. 成熟ラット脊髄スライス標本

今回用いた脊髄横断スライスと縦断スライスを比較すると, 横断スライスは後角細胞層の視認が容易であること, whole cell patch clamp 法が適用できる²¹⁾ ことなどが利点である. 一方, 縦断スライスは後索や上位中枢からの抑制線維が下行する背側索の刺激による応答を解析できる. 膠様質細胞の同定は脊髄表面からの深さ, およびその電気的性質から容易であるが, その他のニューロン層の正確な同定は困難である.

2. 膠様質細胞における後根誘起シナプス電位

今回成熟ラット脊髄のスライス標本を用いて得られた膠様質細胞のシナプス応答を Fig. 8 に示した. 本実験の結果は一次求心性 A δ および C 線維ともにグルタミン酸を伝達物質としていることを強く示唆した. 幼若ラット脊髄を用いた実験において, Ia 線維の伝達物質はグルタミン酸と考えられること¹⁰⁾, 後根神経節内の多くの細胞がグルタミン酸を含有している⁸⁾ ことなどから, 大多数の一次求心性感覚線維はグルタミン酸をその伝達物質としている可能性が考えられる. しかし, C 線維誘起 EPSP の一部は CNQX に感受性が低いことや, 一部の膠様質細胞はグルタミン酸投与によって何ら反応を示さないことも報告されており²⁰⁾, グルタミン酸以外の伝達物質の関与も否定できない. とくにアデノシン 3 リン酸 (adenosine-3-phosphate; ATP) は, 後根刺激により脊髄後角において分泌されること, 後角細胞に速い経過の脱分極を惹起する⁹⁾ など, グルタミン酸と類似の作用を示すことが報告されている.

杉浦ら¹⁷⁾ による詳細な C 線維終末分布の解析から, 体性 C 線維は主に膠様質に終末していると考えられる. しかし, 今回の電気生理学的実験では, C 線維誘起シナプス電位は約 25 % の細胞においてのみ観察された. また, C 線維にはサブスタンス P をは

Fig. 8 Schematic diagram of proposed synaptic circuitry in substantia gelatinosa. Substantia gelatinosa neurons received glutamatergic A δ and/or C fiber inputs from dorsal root and glycinergic as well as GABAergic inputs from interneurons. These interneurons are likely to be innervated by primary afferent A δ fibers.

じめ多くのペプチドが含まれているが、膠様質細胞はサブスタンス Pをはじめ、これらペプチドに対して非常に弱い感受性しか示さなかった²²⁾。これらのことから次のような可能性が考えられる。1) C線維は小型の膠様質細胞にのみシナプスを形成し、たまたま本実験における記録は比較的大型の細胞から行われていた可能性。しかし、色素注入により細胞内記録・染色を行った細胞を調べた結果は、上記の可能性に対して否定的である。2) スライス標本では、C線維誘起シナプス応答が抑制を受けている可能性。3) 多くのC線維は膠様質細胞とシナプスを形成せず、膠様質以外の細胞が膠様質にのぼした樹状突起にシナプスを作っている可能性。事実、解剖学的に一部のIV/V層ニューロンはその樹状突起を膠様質にのぼしていることが報告されている^{1,16)}。また、C線維刺激によって、IV/V層ニューロンに緩徐

なEPSPが誘起され、この一部はサブスタンス P受容体拮抗薬で抑制されることが報告されている²²⁾。

3. 膠様質細胞の痛覚伝達における役割

本実験は膠様質細胞の一部がglycineやGABA線維入力を受け、これらの線維によって抑制されることを示した。しかし記録ニューロンが興奮性あるいは抑制性いずれの伝達物質を含んでいるかは不明である。抑制性細胞の分布から、Gobel⁵⁾はislet細胞は抑制性細胞で主にstalk細胞を抑制しているのではないかと推量している。免疫組織学的手法を用いた記録細胞の伝達物質の同定や、シナプス応答と記録細胞の種類との関係解明が必要と考えられる。

今回の実験で示したように、脊髓スライス標本を用いるとin vivo条件下では細胞内記録がきわめて困難な微細ニューロンのシナプス応答やその生理・薬理学的性質の解析が可能である。後根を付した脊

髄スライス標本は痛覚伝達機序の解析に特に有用であると考ええる。

なお、本研究の一部は文部省科学研究補助金、重点研究(04255213)、および石橋学術振興基金によった。

文 献

- 1) Brown, A. G., The dorsal horn of the spinal cord, *Quarterly J. Exp. Physiol.*, **67** (1982) 193-212.
- 2) Cervero, F., Iggo, A. and Molony, V., Ascending projections of nociceptor-driven lamina I neurons in the cat, *Exp. Brain Res.*, **35** (1979) 135-149.
- 3) Cuello, A. C. and Kumazawa, I., The distribution of substance P immunoreactive fibers in the rat central nervous system, *J. Comp. Neurol.*, **178** (1978) 129-156.
- 4) De Biasi, S. and Rustioni, A., Glutamate and substance P coexist in primary afferent terminals in the superficial laminae of spinal cord, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **85** (1988) 7820-7824.
- 5) Gobel, S., Golgi studies of the neurons in layer II of the dorsal horn of the medulla (trigeminal nucleus caudalis), *J. Comp. Neurol.*, **180** (1978) 395-414.
- 6) Gobel, S., Neural circuitry in the substantia gelatinosa of Rolando: anatomical insights, *Adv. Pain Res. Ther.*, **3** (1979) 175-195.
- 7) Hökfelt, T., Ljungdahl, A., Trenius, L., Elde, R. and Nilsson, G., Immunohistochemical analysis of peptide pathways possibly related to pain and analgesia: enkephalin and substance P, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **74** (1977) 3081-3085.
- 8) Inagaki, N., Kamisaki, Y., Kiyama, H., Horio, Y., Tohyama, M. and Wada, H., Immunohistochemical localization of cytosolic and mitochondrial glutamic oxaloacetic transaminase isoenzymes in rat primary sensory neurons as a marker for the glutamate neuronal system, *Brain Res.*, **402** (1987) 197-200.
- 9) Jahr, C. E. and Jessell, T. M., ATP excites a subpopulation of rat dorsal horn neurones, *Nature*, **304** (1983) 730-733.
- 10) Jahr, C. E. and Yoshioka, K., Ia afferent excitation of motoneurons in the in vitro new-born rat spinal cord is selectively antagonized by kynurenate, *J. Physiol.*, **370** (1986) 515-530.
- 11) Katoh, S., Hisano, S. and Daikoku, S., Ultrastructural localization of immunolabeled substance P and methionin-enkephalin-octapeptide in the surface layer of the dorsal horn of rat spinal cord, *Cell Tiss. Res.*, **253** (1988) 55-60.
- 12) Light, A. R. and Perl, E. R., Peripheral sensory systems. In: P. Dyck, P. Thomas, E. H. Lambert and R. Bunge (Eds.), *Peripheral Neuropathy*, Saunders, Philadelphia, 1984, pp. 210-230.
- 13) Melzack, R. and Wall, P. D., Pain mechanisms: a new theory, *Science*, **150** (1965) 971-979.
- 14) Mugnaini, E. and Oertel, W. H., An atlas of the distribution of gabaergic neurons and terminals in the rat CNS as revealed by GAD immunocytochemistry. In: A. Bjorklund and T. Hokfelt (Eds.), *Handbook of Chemical Neuroanatomy*, Elsevier, Amsterdam, 1985, pp. 436-595.
- 15) Ribeiro-da-Silva, A. and Coimbra, A., Neuronal uptake of [3 H] GABA and [3 H] glycine in laminae I-III (substantia gelatinosa Rolandi) of the rat spinal cord. An autoradiographic study, *Brain Res.*, **188** (1980) 449-464.
- 16) Szentagothai, J., Neuronal and synaptic arrangement in the substantia gelatinosa Rolandi, *J. Comp. Neurol.*, **122** (1964) 219-239.
- 17) Sugiura, Y., Terui, N. and Hosoya, Y., Difference in distribution of central terminals between visceral and somatic unmyelinated (C) primary afferent fibers. *J. Neurophysiol.*, **4** (1989) 834-840.
- 18) Weinberg, R. J., Conti, F., Van Eyck, S. L., Petrusz, P. and Rustioni, A., Glutamate immunoreactivity in superficial laminae of rat dorsal horn and spinal trigeminal nucleus. In: T. P. Hicks, D. Lodge and H. McLennan (Eds.), *Excitatory Amino Acid Transmission*, Alan R. Liss, New York.
- 19) Yoshimura, M. and Jessell, T. M., Primary afferent-evoked synaptic responses and slow potential generation in rat substantia gelatinosa neurons in vitro, *J. Neurophysiol.*, **62** (1989) 96-108.
- 20) Yoshimura, M. and Jessell, T. M., Amino acid-mediated EPSPs at primary afferent synapses with substantia gelatinosa neurones in the rat spinal cord, *J. Physiol.*, **430** (1990) 315-335.
- 21) Yoshimura, M. and Nishi, S., Blind patch-clamp recordings from substantia gelatinosa neurons in adult rat spinal cord slices: pharmacological properties of synaptic currents, *Neuroscience*, **53** (1993) 519-526.

- 22) Yoshimura, M., Shimizu, T., Yajiri, Y., Inokuchi, H. and Nishi, S., Primary afferent-evoked slow EPSPs and responses to substance P of dorsal horn neurons in the adult rat spinal cord slices, *Regulatory Peptides* (1993) (in press).

Address for correspondence : Megumu Yoshimura, M. D., Department of Physiology, Kurume University School of Medicine, 67 Asahi-machi, Kurume 830, Japan.

Telephone : 0942-35-3311