

原 著

神経障害後の脊髄後角におけるシナプス伝達の変化

—膜電位イメージング法を用いて—

獨協医科大学 麻酔科学

五月女俊也

要 旨 末梢神経が障害されると脊髄後角の神経回路網の再構築が起こり、興奮性および抑制性シナプス伝達の変化が生じると考えられている。本研究では、高速イメージングシステムを用いた膜電位変化の観察により、末梢神経障害が脊髄後角表層内の興奮性シナプス伝達に与える影響を検討した。

膜電位感受性色素で染色したマウス脊髄スライス標本の高速蛍光測定を行い、脊髄後根流入部の電気刺激で得られる脊髄後角表層の膜電位変化を観察した。さらに、CNQX および APV 灌流下の変化について調べた。そして、これらの変化における坐骨神経部分結紮による影響についても調べた。

脊髄後根流入部の電気刺激で得られる脊髄後角表層の膜電位変化は、CNQX の灌流によって減弱し、APV の灌流でさらに減弱したが完全には消失しなかった。この現象は、坐骨神経部分結紮を施したマウスでより顕著にみられた。

NMDA 受容体と AMPA 受容体を介する興奮性シナプス伝達が坐骨神経部分結紮によって増大することを高速蛍光測定法で確認した。神経障害によって NMDA 受容体と AMPA 受容体以外の興奮性シナプス伝達が亢進している可能性が示唆された。

Key Words : 膜電位イメージング, 神経障害, 脊髄後角, シナプス伝達

緒 言

末梢神経が障害されると、アロディニアや痛覚過敏などの神経障害性疼痛に特徴的な症状を呈する¹⁾。これらの症状は、第1次求心性線維が入力する脊髄後角表層における興奮性シナプス伝達の変化によって生じると考えられており^{2,3)}、これらの変化の発症機序として、脊髄後角表層における N-methyl-D-aspartate (NMDA) 受容体⁴⁾ や α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionic acid (AMPA) 受容体⁵⁾ などの興奮性シナプス成分の亢進が関与することが電気生理学的に明らかにされている。Seltzer らは、NMDA 受容体阻害薬である MK-801 や DL-2-amino-5-phosphonovaleric acid (APV) のくも膜下投与が神経障害性疼痛による痛み行動を減弱させることを報告している⁴⁾。一方、Paleckova らは、坐骨神経結紮による神経障害性疼痛モデルで、

脊髄後角第1次求心性線維からのアミノ酸の放出増加が非 NMDA 受容体阻害薬 (AMPA 受容体阻害薬) である 6-cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione (CNQX) の灌流によって抑制されることを電気生理学的に明らかにしている⁶⁾。このように脊髄後角 NMDA 受容体および非 NMDA 受容体 (AMPA 受容体) のいずれの興奮性シナプス成分も神経障害性疼痛の発症や持続に関与していることが示唆されている。さらに、脊髄後角において第1次求心性線維からの興奮性シナプス伝達に関与している neurokinin 1 (NK1) 受容体や calcitonin gene-related peptide (CGRP) 受容体の関与を示す研究や⁷⁾、 γ アミノ酪酸 (GABA) やグリシンなどの抑制性シナプス成分の神経障害性疼痛への関与を示す研究も報告されているが^{8,9)}、これらの機序の関連については未だ議論の余地があり、末梢神経障害による脊髄後角におけるシナプス変化は複雑で、かつ不明な部分が多い。

近年、膜電位感受性色素による染色後の高速イメージングシステムを用いて神経細胞の膜電位変化を可視化し、中枢神経のシナプス活動を視覚的に観察することが可能となっており¹⁰⁾、当教室では、このシステムを利用して末梢神経障害による脊髄後角表層における抑制性

平成 27 年 11 月 4 日受付, 平成 27 年 12 月 3 日受理

別刷請求先: 五月女俊也

〒321-0293 栃木県下都賀郡壬生町北小林 880

獨協医科大学 麻酔科学

シナプス伝達の減弱を視覚的に観察して報告した¹¹⁾。

本研究では、神経障害性疼痛の発症機序を電気生理学的に明らかにする目的で、Seltzer法による神経障害性疼痛モデルの脊髄スライス標本を膜電位感受性色素で染色し、脊髄後角表層の電気刺激で誘発された興奮性シナプス伝達および抑制性シナプス伝達の変化を高速イメージングシステムによって視覚的に観察した。

方 法

本研究は獨協医科大学動物実験委員会の承認を得て行われた。

1. 対 象

生後4-6週の雄性ICRマウスを使用した(20-30g)。飼育室の明暗周期を12時間とし、すべての実験は明期に行った。また餌、水分は自由に摂取できるようにした。

2. 神経障害性疼痛モデルの作製

ケタミン100mg/kg、キシラジン10mg/kg麻酔下にSeltzer法による坐骨神経部分結紮を行い、神経障害性疼痛モデルを作製した(坐骨神経結紮群)¹²⁾。一方、対照群は全身麻酔下に坐骨神経の露出のみ(sham手術)を行った。

3. von Frey 試験

結紮3日前から結紮後7日目まで、坐骨神経部分結紮後のマウスの機械的刺激に対する反応をvon Frey filament (No. 2.83, bending force 0.07g)を用いて評価した。Filamentによる機械的刺激を10回加え、それに対して逃避行動を示す回数を連日測定し、測定結果について対照群と坐骨神経結紮群で比較した。

4. 脊髄スライス標本の作製

ケタミン100mg/kg、キシラジン10mg/kg麻酔下にマウスの椎弓を切除して脊髄を摘出した。摘出した脊髄は直ちに95% O₂、5% CO₂で飽和した4℃の水冷クレブス液(組成: NaCl 113mM, KCl 3mM, NaHCO₃ 25mM, NaH₂PO₄ 1mM; CaCl₂ 2mM; MgCl₂ 1mM, D-glucose 11mM, pH 7.4)に浸漬し、マイクロスライサー(Microslicer[®], D.S.K., Japan)を用いて、厚さ450μmの脊髄スライス標本を作製した。

5. 膜電位感受性色素の染色

5%CO₂、/95%O₂をバブリングした常温のクレブス液を浸漬した濾紙上に、脊髄スライスを留置した直径

13mmのメンブランフィルターを並べ、30分間インキュベーションした後、膜電位感受性色素であるdi-4-ANEPPS (5mM) 40μLにクレブス液480μLとfetal bovine serum 480μLを加えたものを100μLずつ滴下し、15~20分間暗所にてインキュベーションした後に色素を洗浄した。

6. 高速蛍光測定による膜電位イメージング

スライス標本を記録用チャンバーに固定し、クレブス液灌流下にCCDカメラ(MiCAM2)を用いた高速蛍光測定法により行われた。対照群および坐骨神経結紮群の脊髄後根流入部位に刺激電極を用いて電気刺激(TRAIN 3,DURATION 1.0ms, INTERVAL 10ms)を加えることで得られた膜電位変化を記録した。さらにGABA_A受容体拮抗薬であるbicucullineおよびグリシン受容体拮抗薬であるstrychnineを灌流させ、抑制性シナプス伝達の影響を遮断した。はじめに①クレブス液のみを灌流させ、膜電位変化(蛍光強度変化)を記録、その次に②bicuculline (10μM)+strychnine (1μM)を追加灌流させ、次に③非NMDA受容体拮抗薬(AMPA受容体阻害薬)であるCNQX (10μM)を、そして④NMDA受容体阻害薬であるAPV (50μM)を追加灌流し、それぞれの薬剤を灌流させたときの膜電位変化を経時的に観察、さらにこれらの変化を対照群と坐骨神経結紮群間で比較した。

7. 統計解析

全ての結果は平均値±標準誤差で示し、対照群と坐骨神経結紮群における後角の蛍光強度変化の比較には二元配置分散分析法(two-way analysis of variance: two-way ANOVA)を用いた。また事後の多重比較検定にはTukey法を用いた。統計処理は統計ソフトPrism[®]を使用し、統計的有意水準はp<0.05とした。

結 果

1. von Frey 試験

図1にvon Frey試験の結果を示す(図1)。

坐骨神経部分結紮前の機械的刺激に対する逃避行動を示す行動は、両群において差はみられなかった。しかし坐骨神経結紮群では結紮直後から7日目まで、filamentの機械的刺激に対する逃避行動の回数が増加しており、アロディニアが発症していることが確認された(対照群:n=8, 坐骨神経結紮群:n=8)。

2. 高速蛍光測定による膜電位イメージング

Sham手術を施行したマウスの脊髄から、高速イメー

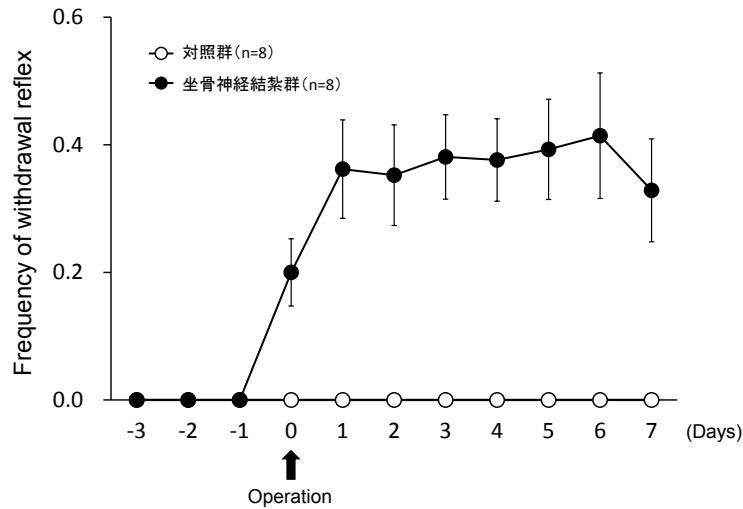


図1 von Frey 試験によるアロディニアの評価

縦軸は10回の機械的刺激に対して逃避行動を示す回数を、横軸は時間経過(日)を、○は対照群、●は坐骨神経結紮群を示す。手術前は両群において機械的刺激に対する逃避行動は認めなかった。手術後も、対照群(sham手術)では逃避行動は見られなかったが、手術後の結紮群においては、手術翌日以後の逃避行動を示す回数の増加(アロディニア)を認めた。

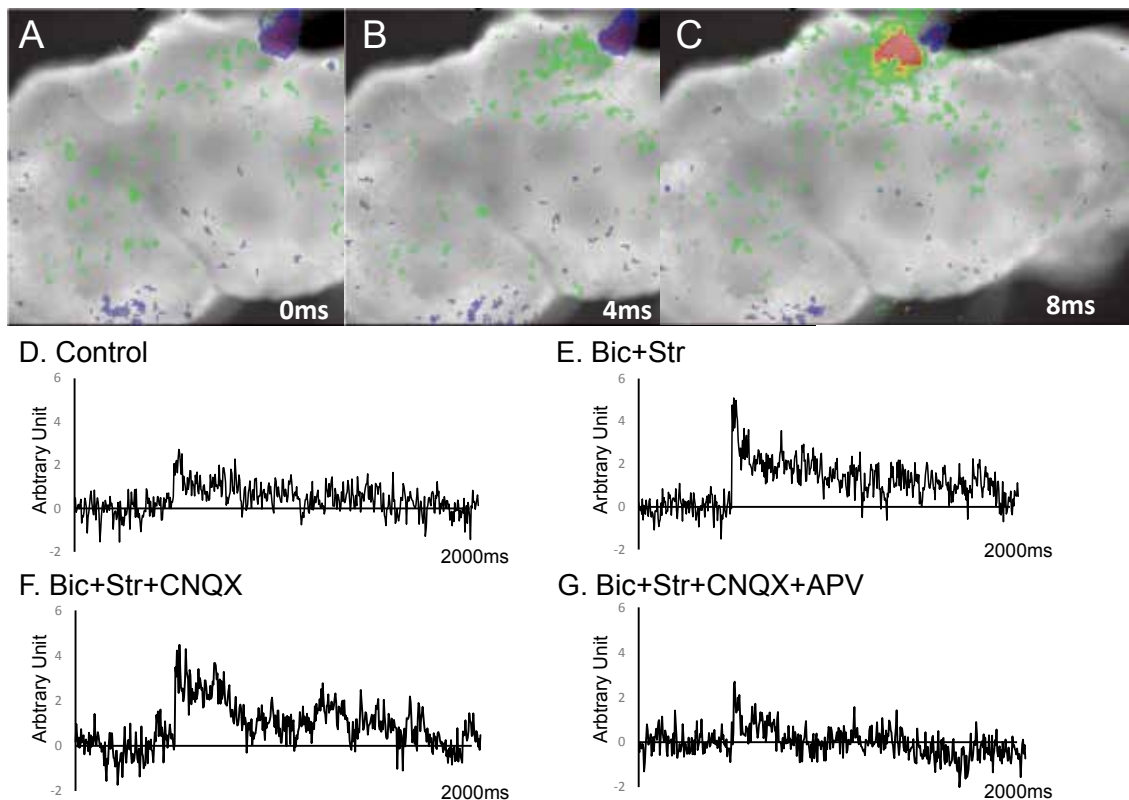


図2 膜電位イメージング法を用いた後根流入部位の電気刺激による脊髄後角興奮性シナプス伝達の変化
 図2A-Cは、灌流前の後根流入部位の電気刺激による経時的膜電位変化(蛍光強度変化)のイメージを示している。図2Aは刺激直後、図2Bは刺激4msec後、図2Cは刺激8msec後を示す。
 図2D-Eは灌流中の膜電位変化を示す。縦軸は蛍光強度変化を、横軸は時間を示す。図2Dは灌流前の膜電位変化を、図2Eはbicuculline, strychnine灌流中の膜電位変化を、図2FはCNQXを、図2GはAPVを追加灌流させたときに得られた膜電位変化を示す(対照群)。

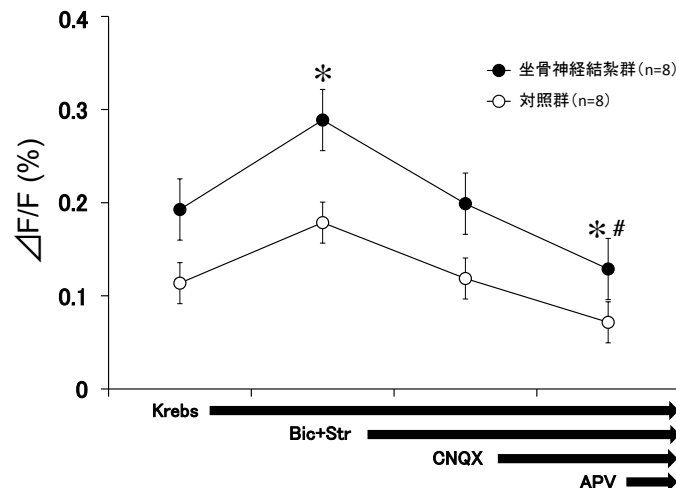


図3 膜電位イメージング法による坐骨神経結紮が脊髄後角興奮性シナプス伝達に与える影響

bicuculline, strychnine, CNQX, APV をそれぞれ灌流させたときの経時的膜電位変化を示す。縦軸は蛍光強度変化を、横軸は灌流させた拮抗薬を、○は対照群、●は坐骨神経結紮群を示す。bicuculline, strychnine を灌流させると坐骨神経結紮群において有意に膜電位変化が増強した (* : $p < 0.05$)。その後、CNQX および APV を灌流させると坐骨結紮群では bicuculline, strychnine を灌流させた時と比べ有意に減弱し (* : $p < 0.05$)、さらに対照群と比べ有意に増大していた (# : $p < 0.05$)。

ジグシステムを用いて得られた膜電位変化の記録を図2に示す。図2A-Cは、灌流前の後根流入部位の電気刺激による経時的膜電位変化(蛍光強度変化)のイメージ、図2Dは灌流前の膜電位変化、図2Eはbicuculline (10 μ M) + strychnine (1 μ M)、図2FはCNQX (10 μ M)、図2GはAPV (50 μ M) をそれぞれ追加灌流し、後根流入部位を電気刺激したときに得られた膜電位変化を示している。bicuculline と strychnine を灌流させたときの膜電位変化は増強し、CNQX の灌流によって減弱し、APV の灌流でさらに減弱したが完全には消失しなかった。

対照群 (n=8) と坐骨神経結紮群 (n=8) における高速イメージングシステムを用いて得られた膜電位変化について比較した結果を図3に示す。灌流前の膜電位変化は、対照群に比して結紮群で増強される傾向にあり、その後、bicuculline と strychnine を灌流させると、結紮群の膜電位変化は対照群に比して有意に増大した ($p < 0.05$)。その後、CNQX を灌流させると、両群ともに膜電位変化は減弱し、さらにAPVを灌流させた結果、bicuculline と strychnine のみの灌流時に比して膜電位変化は有意に減弱した ($p < 0.05$)。また、bicuculline と strychnine 灌流下でのCNQX と APV の灌流による膜電位変化は、対照群に比して坐骨神経結紮群で有意に増

大していた ($p < 0.05$)。

考 察

NMDA 受容体や AMPA 受容体などを介する興奮性シナプス伝達は、神経障害性疼痛の発症機序において重要な役割を持つ。一方、抑制性シナプス伝達成分も神経障害性疼痛の発症と関連していると考えられているが、これらの詳細な機序についてはいまだに不明な部分が多い。

本研究では、各シナプス成分が神経障害性疼痛の発症や持続にどのような影響を与えるのかを明らかにするために、末梢神経障害性疼痛マウスの脊髄後角表層におけるシナプス伝達の変化について、膜電位イメージングによる視覚的手法を用いて評価した。そして、神経障害時に脊髄後角における興奮性シナプス伝達の亢進を捉えることが出来た。また、これまでの電気生理学的手法では得られなかったCNQX と APV の両者の灌流後に残存する蛍光変化を見出し、このシステムが神経障害性疼痛の研究に有効であることを示した。

神経障害性疼痛における興奮性シナプス伝達の変化

本研究では、非NMDA受容体阻害薬 (AMPA受容体阻害薬) であるCNQXを灌流させると増強した膜電位

変化は減弱し、次いでNMDA受容体阻害薬であるAPVを追加投与すると膜電位変化はさらに減弱した。坐骨神経結紮群についても同様の観察を行った結果、対照群と同じ変化が観察された。それぞれの成分について対照群と坐骨神経結紮群で比較したところ、CNQXおよびAPVを灌流させた場合、坐骨神経結紮群において有意に増大していた。このことから、NMDAとAMPAの2つの興奮性シナプス成分は、坐骨神経結紮によって増強していたことになる。

AMPA受容体は中枢神経におけるグルタミン酸受容体であり、一般的に興奮性シナプスの速い情報伝達に関与している¹³⁾。神経障害性疼痛によるシナプス変化においてもその関与が強く疑われており、Gwakらは、AMPA受容体拮抗薬であるNBQXの髄腔内投与は、神経障害性疼痛の症状であるアロディニアを減弱させたと報告している¹⁴⁾。AMPA受容体はGluA1からGluA4の4種類のサブユニットにより構成されており、この構成によってAMPA受容体の電気生理学的性質や、Ca²⁺の透過性などを規定していると考えられている¹⁵⁾。近年、神経障害性疼痛に関与するサブユニットを明らかにした研究がなされ、ChenらはGluA2が神経障害性疼痛に関与していると述べており、神経障害によって脊髄でのGluA2の内在化が増加し、GluA2欠損AMPA受容体が増加することを証明している¹⁶⁾。一方、Luらは、炎症性疼痛において脊髄後角におけるGlu1Aとリン酸化されたGlu1Aは増加したが、神経障害性疼痛ではGlu1Aとリン酸化されたGlu1Aは増加しなかったと述べている¹⁷⁾。このようにAMPA受容体が神経障害性疼痛の発症と持続に強く関与している結果が数多く報告されている。本研究では、AMPA受容体阻害薬であるCNQXの灌流によって膜電位変化が減弱したが、この減弱は坐骨神経結紮群ではさらに減弱することが明らかとなった。このことから、AMPA受容体は神経障害性疼痛において重要な役割を果たしている結論できる。

一方、NMDA受容体は神経伝達物質であるグルタミン酸の受容体であり、興奮性シナプス伝達と神経の可塑性において重要な役割を果たしている¹⁸⁾。そして、神経障害性疼痛の発症にはNMDA受容体の活性化が関与していると言われており¹⁹⁾、特にNMDA受容体のリン酸化が重要な役割を果たすと考えられている²⁰⁾。NMDA受容体はNR1、NR2(NR2A-D)、NR3(NR3A-B)各サブユニットからなり、これらのサブユニット構成により、受容体の薬理的、生理学的活性を定義しているが²¹⁾、この中で、特にNR2Bが神経障害性疼痛発症に関与しているのではないかと考えられている^{22,23)}。

本研究では、NMDA受容体阻害薬であるAPVの灌流により、電気刺激によって生じる膜電位変化は、対照群と比して結紮群で増強されていた。このことは、坐骨神経結紮によってNMDA受容体を介する興奮性シナプス成分は増強していたことを示し、過去の研究結果と矛盾しないものであった。一方、AMPA受容体とNMDA受容体の両者を阻害したにもかかわらず、他の興奮性シナプス成分の残余を示す膜電位変化を認め、この膜電位変化は結紮群では対照群と比して有意に増大していたことから、神経障害性疼痛にはAMPA、NMDA以外の興奮性シナプス成分が関与していると考えられた。

一般に、脊髄後角で求心性線維から2次ニューロンへのシナプス伝達に関与している興奮性神経伝達物質として、サブスタンスPやCGRPなどが挙げられる。脊髄において、サブスタンスPは第1次求心性線維から放出され、2次ニューロンにおけるneurokinin 1(NK1)受容体と結合して内在化することが知られている²⁴⁾。Hökfeltらは、末梢神経の障害によってC線維のサブスタンスPとCGRPのdown-regulationが起こると述べており²⁵⁾、実際に神経障害性疼痛モデルを用いて疼痛行動を評価した実験では、NK1受容体およびCGRP受容体のアンタゴニストの髄腔内投与によりhyperalgesiaを減弱させたと報告している⁷⁾。一方で、神経障害によって脊髄後角のサブスタンスPの放出は減少し、NK1受容体は増加すると結論付けている研究^{26,27)}や、これらのペプチドの減少と神経障害性疼痛とは直接の因果関係はないとする報告などもあり²⁸⁾、これらの研究からも分かるように、神経障害性疼痛に伴う興奮性シナプス変化へのサブスタンスPやCGRPなどの関与は、現在でも明らかにされていない。本研究では、これら興奮性シナプス成分の坐骨神経結紮後の変化について直接評価していない。今後は、本研究で用いた高速イメージングシステムを用いることによって、神経障害性疼痛の発症と持続への関与の可能性が高いサブスタンスPやCGRPを介した興奮性シナプス伝達の変化についても明らかにしていきたい。

膜電位イメージング法を用いた新しいシナプス伝達の観察

膜電位感受性色素による高速蛍光測定システムを用いたシナプスの研究は、既に再現性の高い実験方法として確立されている。以前、当教室において神経障害性疼痛における抑制性シナプスの変化について膜電位感受性色素を用いた高速イメージングにより観察し、GABAを灌流させることで、脊髄後角が過分極することを視覚的に評価した¹¹⁾。そして本研究では、このシステムを用

いて神経障害性疼痛における興奮性シナプス変化を観察した。同様のシステムにより脊髄における膜電位変化を観察した例は過去になく、単一ニューロンにおけるシナプス変化のみが観察可能であった従来の電気生理学的手法とは異なり、脊髄後角全体におけるシナプス変化を観察可能となった。このような点においても本研究で用いた実験方法は極めて新奇的であると言える。

今後、さらに詳細な神経障害性疼痛での興奮性シナプス伝達の変化について、このシステムを用いて検索することが可能となるであろう。

結 論

本研究において、高速蛍光測定によって、NMDA と AMPA 受容体を介する興奮性シナプス伝達が坐骨神経部分結紮により増強することを確認できた。CNQX と APV の両者の灌流後に残存する蛍光変化の起源は現時点では不明だが、神経障害によって AMPA 受容体と NMDA 受容体以外の興奮性シナプス伝達が亢進している可能性が推測された。

文 献

- 1) Woolf CJ, Thompson SW : The induction and maintenance of central sensitization is dependent on N-methyl-D-aspartic acid receptor activation : implications for the treatment of post-injury pain hypersensitivity states. *Pain* **44** : 293-299, 1991.
- 2) Moore KA, Baba H, Woolf CJ : Synaptic transmission and plasticity in the superficial dorsal horn. *Prog Brain Res* **129** : 63-80, 2000.
- 3) Kohno T, Moore KA, Baba H, et al : Peripheral nerve injury alters excitatory synaptic transmission in lamina II of the rat dorsal horn. *J Physiol* **548** : 131-138, 2003.
- 4) Seltzer Z, Cohn S, Ginzburg R, et al : Modulation of neuropathic pain behavior in rats by spinal disinhibition and NMDA receptor blockade of injury discharge. *Pain* **45** : 69-75, 1991.
- 5) Garry EM, Moss A, Rosie R, et al : Specific involvement in neuropathic pain of AMPA receptors and adapter proteins for the GluR2 subunit. *Mol Cell Neurosci* **24** : 10-22, 2003.
- 6) Paleckova V, Palecek J, McAdoo DJ, et al : The non-NMDA antagonist CNQX prevents release of amino acids into the rat spinal cord dorsal horn evoked by sciatic nerve stimulation. *Neurosci Lett* **148** : 19-22, 1992.
- 7) Lee SE, Kim JH : Involvement of substance P and calcitonin gene-related peptide in development and maintenance of neuropathic pain from spinal nerve injury model of rat. *Neurosci Res* **58** : 245-249, 2007.
- 8) Hwang JH, Yaksh TL : 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.
- 9) Cronin JN, Bradbury EJ, Lidierth M : Laminar distribution of GABAA- and glycine-receptor mediated tonic inhibition in the dorsal horn of the rat lumbar spinal cord : effects of picrotoxin and strychnine on expression of Fos-like immunoreactivity. *Pain* **112** : 156-163, 2004.
- 10) Akemann W, Mutoh H, Perron A, et al : Imaging brain electric signals with genetically targeted voltage-sensitive fluorescent proteins. *Nat Methods* **7** : 643-649, 2010.
- 11) 沼田祐貴 : 神経障害性疼痛は脊髄後角神経細胞の Cl⁻ ホメオスタシスを変化させ GABA による抑制性反応を減弱させる. *Dokkyo J Med Sci* **42** : 31-36, 2015.
- 12) Seltzer Z, Dubner R, Shir Y : A novel behavioral model of neuropathic pain disorders produced in rats by partial sciatic nerve injury. *Pain* **43** : 205-218, 1990.
- 13) Borgdorff AJ, Choquet D : Regulation of AMPA receptor lateral movements. *Nature* **417** : 649-653, 2002.
- 14) Gwak YS, Kang J, Leem JW, et al : Spinal AMPA receptor inhibition attenuates mechanical allodynia and neuronal hyperexcitability following spinal cord injury in rats. *J Neurosci Res* **85** : 2352-2359, 2007.
- 15) Mayer ML, Armstrong N : Structure and function of glutamate receptor ion channels. *Annu Rev Physiol* **66** : 161-181, 2004.
- 16) Chen SR, Zhou HY, Byun HS, et al : Nerve injury increases GluA2-lacking AMPA receptor prevalence in spinal cords : functional significance and signaling mechanisms. *J Pharmacol Exp Ther* **347** : 765-772, 2013.
- 17) Lu Y, Sun YN, Wu X, et al : Role of alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionate (AMPA) receptor subunit GluR1 in spinal dorsal horn in inflammatory nociception and neuropathic nociception in rat. *Brain Res* **1200** : 19-26, 2008.
- 18) Dingleline R, Borges K, Bowie D, et al : The gluta-

- mate receptor ion channels. *Pharmacol Rev* **51** : 7-61, 1999.
- 19) Bennett AD, Everhart AW, Hulsebosch CE : Intrathecal administration of an NMDA or a non-NMDA receptor antagonist reduces mechanical but not thermal allodynia in a rodent model of chronic central pain after spinal cord injury. *Brain Res* **859** : 72-82, 2000.
- 20) Gao X, Kim HK, Chung JM, et al : Enhancement of NMDA receptor phosphorylation of the spinal dorsal horn and nucleus gracilis neurons in neuropathic rats. *Pain* **116** : 62-72, 2005.
- 21) Monyer H, Sprengel R, Schoepfer R, et al : Heteromeric NMDA receptors : molecular and functional distinction of subtypes. *Science* **256** : 1217-1221, 1992.
- 22) Boyce S, Wyatt A, Webb JK, et al : Selective NMDA NR2B antagonists induce antinociception without motor dysfunction : correlation with restricted localization of NR2B subunit in dorsal horn. *Neuropharmacology* **38** : 611-623, 1999.
- 23) Iwata H, Takasusuki T, Yamaguchi S, et al : NMDA receptor 2B subunit-mediated synaptic transmission in the superficial dorsal horn of peripheral nerve-injured neuropathic mice. *Brain Res* **1135** : 92-101, 2007.
- 24) 高薄敏史, 濱口眞輔, 山口重樹 : 麻酔関連薬による脊髄サブスタンスP放出制御. *臨床麻酔* **37** : 615-623, 2013.
- 25) Hökfelt T, Zhang X, Wiesenfeld-Hallin Z : Messenger plasticity in primary sensory neurons following axotomy and its functional implications. *Trends Neurosci* **17** : 22-30, 1994.
- 26) Abbadie C, Brown JL, Mantyh PW, et al : Spinal cord substance P receptor immunoreactivity increases in both inflammatory and nerve injury models of persistent pain. *Neuroscience* **70** : 201-209, 1996.
- 27) Malmberg AB, Basbaum AI : Partial sciatic nerve injury in the mouse as a model of neuropathic pain : behavioral and neuroanatomical correlates. *Pain* **76** : 215-222, 1998.
- 28) Na HS, Kim HJ, Sung B, et al : Decrease in spinal CGRP and substance P is not related to neuropathic pain in a rat model. *Neuroreport* **12** : 175-178, 2001.

Evaluation of Changes in Synaptic Transmission in Spinal Dorsal Horn Using Voltage-sensitive Dye Imaging Technique

Toshiya Saotome

Department of Anesthesiology, Dokkyo Medical University, Tochigi Japan

The effect of spinal synaptic change on development of neuropathic pain remains unclear. To determine the effect of sciatic nerve ligation on excitatory synaptic transmission in the spinal dorsal horn, we observed the optical images of fluorescent changes induced by electrical stimulation using voltage-sensitive dye. The sciatic nerve partial ligation was performed in 6 to 8 weeks male ICR mice, according to Seltzer's method under halothane anesthesia. The spinal slices were prepared one week after ligation, and incubated for 20 min with a di-4-ANEPPS to use optical imaging. After rinsing, the slices were placed into the recording chamber on the microscope stage and perfused by Krebs' solution. Fluorescent changes of di-4-ANEPPS in the spinal dorsal horn were measured using MiCAM02.

During the observation, bicuculline, strychnine, CNQX and APV were perfused. The fluorescent changes in the dorsal horn were reduced by perfusion of CNQX and APV. The fluorescent changes were predominant in ligated mice compared to control mice. The blockade of CNQX and APV on excitatory synaptic transmissions was incomplete. These results suggested the implication of excitatory synaptic transmission except AMPA or NMDA were suspected.

Key Words : voltage-sensitive dye imaging, neuropathic pain, spinal cord dorsal horn, synaptic transmission.