

原 著

神経障害性疼痛の発症にともなう 脊髄後角表層における神経回路網の変化

—マルチ電極電位計測システムを用いた電気生理学的観察—

獨協医科大学 麻酔科学

武村 優

要 旨 神経障害性疼痛の発症に伴い脊髄後角の侵害受容性ニューロンの興奮性が増大することが知られており、その機序について遺伝子レベル、シナプスレベル、細胞レベルでの多くの詳細な研究が報告されている。本研究では、神経障害性疼痛発症の脊髄機序について、神経回路網レベルでの検討を試みた。生後6-8週齢の雄性ICRマウスから脊髄スライス標本を作成し、マルチ電極電位計測システムにより脊髄後角表層内の二つのニューロンの活動電位を同時記録し、そのスパイク列の相互相関関(CCH)を求めた。その結果、二つのニューロンに共通の興奮性シナプス入力があることを示唆するCCHと二つのニューロン間に興奮性シナプス結合があることを示唆するCCHが観察され、これらの観察頻度は、神経障害性疼痛の発症に伴って有意に増加した。一方、二つのニューロン間に抑制性シナプス結合があることを示唆するCCHの観察頻度は神経障害により有意に減少した。このような脊髄後角内のシナプス再構築が神経障害性疼痛の発症に関与していると推測された。マルチ電極電位計測システムは中枢神経系内の神経回路網の機能的、解剖学的変化を観察する有用な方法であると考えられた。

Key Words : 神経障害性疼痛, 脊髄後角, マルチ電極電位計測システム, シナプス再構築

緒 言

末梢神経障害によって、痛覚過敏(hyperalgesia, 痛み刺激に対して通常よりも強い痛みを感じる状態)あるいはアロデニア(allodynia, 異痛症, 通常では痛みを引き起こさない程度の弱い刺激に対して痛みを感じる状態)が惹起される。このような病的な状態の発症にともなう、脊髄後角内の侵害受容ニューロンの反応性の増大(central sensitization)が起きていることが知られている¹⁻⁴⁾。この中枢ニューロンの反応性増大の機序について、多くの詳細な研究が報告されているが、神経障害性疼痛の発症機序についてはいまだ不明なことが多い。特に、神経損傷に伴って脊髄後角内の神経回路網がどのような機能的あるいは解剖学的な変化を起こすかは十分には検討されていない。

Biella Gらは、麻酔下のラット脊髄後角表層と深層に分布する二つのニューロンから活動電位を同時に記録し、そのスパイク列の発生タイミングについて相互相関解析を行い、末梢神経損傷によって脊髄後角シナプス活動になんらかの変化が惹起されることを示した⁵⁾。最近、Roza Cらは、マルチ電極電位計測システムを脊髄の急性スライス標本に応用することにより複数の脊髄後角表層ニューロンの活動電位を同時記録した。彼らは二つのニューロンの活動電位のスパイク列に対して相互相関解析を行い、神経障害性疼痛の発症に伴って二つのニューロンの同期性活動が高まることを示した⁶⁾。

今回、我々は脊髄スライス標本にマルチ電極電位計測システムを適応し、脊髄後角表層に分布する複数のニューロン活動を同時記録し、相互相関解析を行った。本研究の目的は、末梢神経損傷によるアロディニアの発症に伴い、脊髄後角表層の神経回路網に再構築が起きていることを電気生理学的に証明する事である。痛覚情報処理に関与する神経回路網の機能的・構造的変化を抑制する方法の開発によって、神経障害性疼痛の発症を防ぐことが可能と考えられた。

平成28年10月31日受付, 平成28年12月6日受理
別刷請求先: 武村 優

〒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

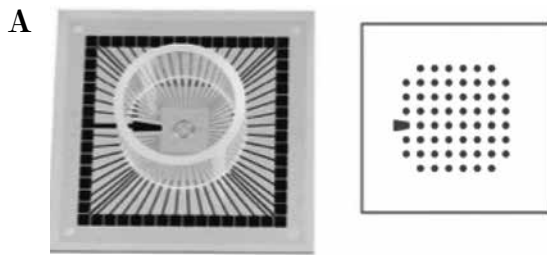
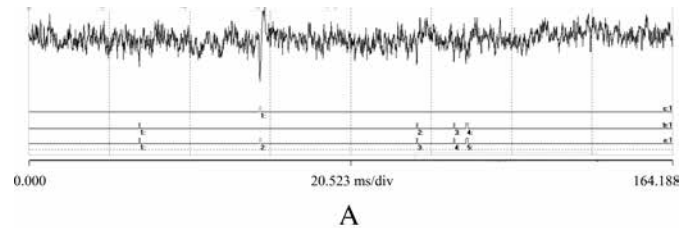


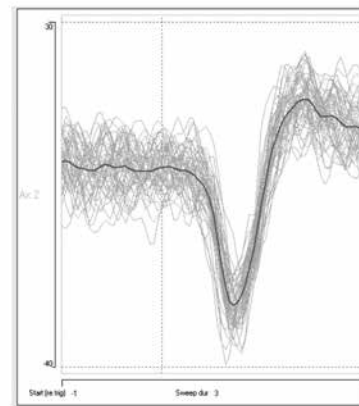
図1 マルチ電極電位計測システム

A: 実際のマルチ電極システムの64チャンネル電極アレーディッシュを示す。

B: 下図は脊髓スライスを載せた様子を示す。



A



B

図2 スパイクソーティング

A: マルチ電極電位計測システムの記録から、振幅を基準にしてスパイクを認識する様子を示す。

B: 振幅を基準として認識したスパイクを重ね書きし、その波形の類似性から単一ニューロンから記録された活動電位であることを確認する様子を示す。

方 法

1. 実験動物

実験動物として生後6から8週齢の雄性ICRマウスを用いた。実験は獨協医科大学動物実験委員会による承認を得て行った。

2. 坐骨神経半結紮マウスの作製

セボフルラン麻酔下で生後6から7週齢ICRマウスの坐骨神経をSeltzerらの方法⁷⁾に従って部分結紮した。その後、von Frey試験を行いアロディニアの発症を確認した。部分結紮手術1週間後(生後7から8週齢の時点)、電気生理学実験を行った。アロディニアの発現が確認されなかったマウスは実験から除外した。

3. 脊髓スライスの作製

ケタミン100mg/kg、キシラジン10mg/kg腹腔内投与による麻酔下に、脊髓腰膨大部を摘出した。マイクロスライサー(堂阪EM; DTK-6000, Japan)を用い、厚さ450 μ mの脊髓スライスを作製した。スライス作製は4 $^{\circ}$ Cに冷却し、グルコースをスクロースに置換しナトリウムイオンを0mMとしたクレブス液内で行った。作製したスライスは37 $^{\circ}$ Cクレブス液内で1時間インキュベートした後、電気生理学実験を行った。

4. マルチ電極電位計測システムによる活動電位の記録

作製したスライス標本をマルチ電極システム(MEA 2100-System: multi channel systems, Germany)の64チャンネル電極アレーディッシュ(Microelectrode Array-Layout: multi channel systems, Germany, 図1A)の上に載せ(図1B)、脊髄後角内に分布する複数のニューロンから活動電位を同時に計測した。64チャンネル電極アレーディッシュの電極間隔は30から200 μ mのものを用いた。電気信号をサンプリング周波数25kHz、ノッチフィルタ50Hzでパーソナルコンピュータに取り込み、実験終了後に解析を行った。

記録中は、95% O₂:5% CO₂混合ガスで飽和したクレブス液(NaCl 113mM, KCl 3mM, NaHCO₃ 25mM, NaH₂PO₄ 1mM, CaCl₂ 2mM, MgCl₂ 1mM, D-glucose 11mM)で持続的に灌流した。

5. 相互相関ヒストグラム(Cross Correlation Histogram: CCH)の作製

記録されたニューロンのうち、脊髄後角表層に分布するニューロンのみを解析対象とした。解析ソフトとして

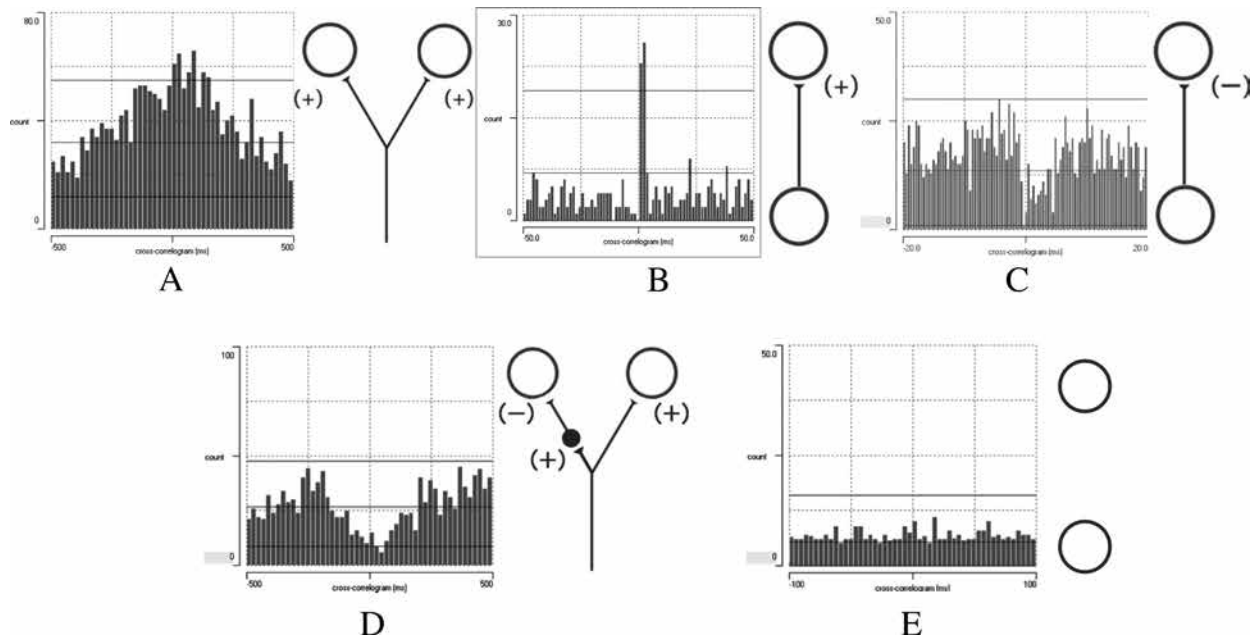


図3 観察されたCCHのパターンおよび推測されるシナプス結合

A : central peak B : lagged peak C : lagged trough D : central trough E : flat histogram 観察されたCCHパターンの、それぞれの一例を示す。右側の挿図は、それぞれのCCHパターンから推察される二つのニューロン間のシナプス結合を示す。

DataView (Heitler WJ, University of St Andrews, Scotland) および Matlab R2010b (Mathworks, USA) を使用した。活動電位の振幅および波形に基づいて、単一のニューロンからの活動電位を抽出した(図2)。同時に記録された二つのニューロンのスパイク列について、相互相関ヒストグラム(Cross Correlation Histogram : CCH)を作製した。

6. 高カリウム刺激およびカプサイシン刺激

脊髄スライス内のニューロンを非選択的に刺激するために、ナトリウムイオンの一部をカリウムイオンに置き換え、カリウムイオン濃度を15mMとしたクレブス液を用いた。また、脊髄スライス内の痛覚伝導路を刺激することを目的として、TRPV1 (Transient Receptor Potential Vanilloid 1) 受容体の作動薬であるカプサイシン4 μ Mを含有したクレブス液を用いた。

7. 統計解析

CCHの様々なパターンの出現頻度の比較のため、m \times n分割表を作製し、 χ^2 二乗検定とその後の残差分析を行った。p<0.05を有意差有りと判定した。

結 果

1. 観察されたCCHのパターン

脊髄後角表層ニューロンペアにおいてCCHを作成し

た結果、ヒストグラムの0ミリ秒を中心にしたピーク(central peak)を示すもの(図3A)、0ミリ秒からずれたピーク(lagged peak)を示すもの(図3B)、0ミリ秒からずれた谷(lagged trough)を示すもの(図3C)、0ミリ秒を中心にした谷(central trough)を示すもの(図3D)が観察された。また、このような有意な相関を示さないもの(flat histogram, 図3E)も多く見られた。

2. 坐骨神経非結紮群におけるCCHパターンの出現頻度

坐骨神経非結紮群(コントロール群)において、164のニューロンペアについてCCHを作成しそのパターンについて検討した(表1)。その結果、flat histogramが164ペア中97ペア(60%)と最も多く観察された。次にcentral peakが164例中29例(17%)、central troughが164例中18例(11%)、lagged troughが14例(9%)、lagged peakが164例中6例(3%)観察された。

3. CCHパターンの出現頻度に対する坐骨神経結紮の影響

Seltzer法により坐骨神経を半結紮シアロディニアの発生を確認したマウス(坐骨神経結紮群)において、168のニューロンペアについてCCHを作成し、そのパターンの出現頻度をコントロール群と比較した(表1)。

坐骨神経損傷はCCHのパターンの出現頻度に対して

表1 CCHのパターンの出現頻度と坐骨神経結紮群の影響

	コントロール群 (n=164 pairs)	坐骨神経結紮群 (n=168 pairs)
flat correlogram	97 (60%)	85 (51%)
central peak	29 (17%)	47 (29%)
lagged trough	14 (9%)	6 (3%)
lagged peak	6 (3%)	12 (7%)
central trough	18 (11%)	18 (10%)

統計的に有意な影響をおよぼすことが確認された (χ^2 乗検定, $p < 0.05$). 坐骨神経損傷がそれぞれのパターンの出現頻度にどのような影響を及ぼすかについて残差分析を行った結果, central peak がコントロール群 17% に対し坐骨神経結紮群では 29% と有意な増加を示した ($p < 0.05$). また, lagged trough がコントロール群 9% に対し, 坐骨神経結紮群は 3% と有意な減少を示した ($p < 0.05$). さらに, lagged peak がコントロール群 3% に対し, 坐骨神経結紮群は 7% と増加し ($p < 0.05$), flat histogram はコントロール群 60% に対し, 坐骨神経結紮群は 51% と減少傾向を示した. また, central trough はコントロール群と坐骨神経結紮群でほとんど変化がなかった.

4. 高カリウムおよびカプサイシン刺激の影響

カリウムイオン濃度 $15 \mu\text{M}$ の Krebs 液を灌流すると, それぞれのニューロンに発生する活動電位はその頻度が著明に増加した. さらに, CCH のそれぞれのパターンの出現頻度を検討すると, 正常カリウム濃度下に比べて flat histogram の出現頻度が有意な増加を示した (表 2).

カプサイシン $4 \mu\text{M}$ を灌流投与すると, それぞれのニューロンに発生する活動電位はその頻度が著明に増加した. さらに, CCH のそれぞれのパターンの出現頻度を検討すると, カプサイシン非投与群に比べて flat histogram の出現頻度が有意に減少し ($p < 0.05$), lagged peak の出現頻度が著明に増加し ($p < 0.05$), central peak の出現頻度も有意に増加した ($p < 0.05$).

考 察

複数のニューロンから活動電位を同時に記録し, 二つのニューロンから記録されたスパイク列の時間的な関係を示す CCH を解析する方法は, ニューロン間のシナプス結合を解析するために広く用いられている⁸⁻¹¹). Moore GP らによれば¹⁰), flat histogram はニューロン

表2 坐骨神経非結紮マウスにおける高カリウムの影響

	n=15 pairs
flat correlogram	12
central peak	2
lagged trough	0
lagged peak	1
central trough	0

ペア間にシナプス結合がないことを示している (図 3-E, 右側の挿図). Central peak はニューロンペア間に, 共通性の興奮性シナプス入力があることを示している (図 3-A, 右側の挿図). Lagged trough はニューロンペアの片方のニューロンが他方のニューロンに抑制性のシナプス結合をしていることを示している (図 3-C). Lagged peak は, ニューロンペアの片方のニューロンが他方のニューロンに興奮性のシナプス結合をしていることを示している (図 3-B). Central trough は, 第三のニューロンがニューロンペアの片方のニューロンに抑制性, 他方のニューロンに興奮性のシナプス入力をしていることを示唆している (図 3-D).

今回の研究では, Seltzer らの方法⁷⁾による坐骨神経部分結紮をすることによって神経障害性疼痛モデルマウスを作製した. 神経障害性疼痛マウス群では, central peak および lagged peak を示す CCH の比率が有意に増加していた. このことは, 神経障害性疼痛マウスにおいて, 脊髄後角表層内において興奮性シナプス活動が増強していることを示唆している.

第一次求心性 $A\beta$ 線維が脊髄内において発芽・分枝し, 脊髄後角表層の侵害受容性ニューロンに新しいシナプスを形成することが, 神経障害性疼痛 (特にアロディニア) の発症機序のひとつであることが示唆されている¹²⁻¹⁵). しかし, そのような $A\beta$ 線維の発芽は起きていないとする報告も見られる¹⁶⁻¹⁸). 今回の実験で神経障害性疼痛マウスにおいて central peak を示す CCH が増加したことは, $A\beta$ 線維の発芽・分枝, シナプス新生を反映している可能性が考えられる.

神経障害にともなって脊髄後角内の興奮性シナプスの密度が増加することが報告されている¹⁹⁻²²). 我々は, 末梢神経障害にともなって, 細胞膜のトラフィック (trafficking) に関与している syntaxin 1A の発現が減少, 脊髄後角ニューロン突起の発芽・分枝が増強, 興奮性シナプス密度の増加が惹起されることを示した²²). 今回の実験で観察された lagged peak の観察頻度の増加

表3 坐骨神経非結紮マウスにおける
カプサイシンの影響

	n = 32 pairs
flat correlogram	14
central peak	9
lagged trough	3
lagged peak	4
central trough	2

は、末梢神経障害によって脊髄後角ニューロンの神経突起が発芽・分枝し、脊髄後角ニューロンの間に興奮性シナプスが新生されることを反映していると推測される。しかし、神経障害性疼痛にともなう脊髄後角内の興奮性シナプス密度の増加が、 $A\beta$ 線維の発芽によるものか¹²⁻¹⁵⁾、脊髄後角内の介在ニューロンの神経突起の発芽によるものか^{13,23,24)}、その詳細については不明である。

神経障害性疼痛マウスでは、クロライドイオントランスポーター KCC2 および NKCC1 の発現レベルが変化し²⁵⁻²⁷⁾、細胞内外のクロライドイオン濃度比が変化し、クロライドイオンの平衡電位が脱分極側に変わることが知られている²⁸⁾。この結果として抑制性シナプスの機能が減弱あるいは興奮性シナプスとして機能することが、神経障害性疼痛の発症機序のひとつであることが示唆されている²⁸⁻³²⁾。さらに、末梢神経障害によって脊髄後角内の抑制性介在ニューロンが死滅することも神経障害性疼痛の原因であることも示唆されている³³⁻³⁵⁾。このような抑制性シナプスの機能的あるいは解剖学的な変化が、今回の実験で観察された lagged trough の観察比率の減少に反映されていると推測される。

高カリウム刺激を加えると、flat histogram の観察比率が有意な増加を示した。一方、カプサイシン灌流刺激では、flat histogram の比率が減少し、central peak および lagged peak の比率が増加を示した。カプサイシンは TRPV1 受容体を活性化する³⁶⁻³⁸⁾。TRPV1 受容体は、侵害受容求心性線維の終末端に発現していることが知られている^{36,39,40)}。さらに、脊髄後角内介在ニューロンに発現していることが報告されている⁴¹⁻⁴³⁾。今回の実験で観察されたカプサイシン灌流による CCH の発現パターンの変化は、脊髄内の侵害情報伝導路の TRPV1 受容体が刺激されたことによると考えられる。一方、高カリウム刺激による flat histogram の観察比率の増加は、高カリウムにより脊髄内ニューロンが非選択的に刺激されたことによると考えられる。

Roza C らは、脊髄スライス標本にマルチ電極電位計

測システムと相互相関解析を適応し、末梢神経損傷により central peak の比率が増大することを示した⁶⁾。また、Eblen-Aajjur と Sandkuhler は、麻酔下のラットの脊髄後角に分布する二つのニューロン活動を細胞外記録し、相互相関解析を適応した⁴⁴⁾。彼らは炎症性疼痛の発症に伴って、二つのニューロンの同期性活動が増強することを示した⁴⁴⁾。末梢神経損傷により central peak の比率が増大するという今回の我々の実験結果は、これらの報告と一致するものである。さらに、我々の実験結果は、ニューロンの同期的活動の増強 (central peak の比率の増大) に加えて、ニューロン間の興奮性シナプス結合の機能的・解剖学的増強 (lagged peak の比率の増大)、ニューロン間の抑制性シナプス結合の機能的・解剖学的減弱 (lagged trough の比率の減少) が起きていることを示唆している。

マルチ電極電位計測システムを脊髄のスライス標本に應用することにより、神経障害性疼痛の発症にともなう脊髄後角表層内の神経回路網の機能的・解剖学的変化をとらえることが可能であった。その結果、神経障害性疼痛の発症にともなう脊髄後角内の興奮性シナプス結合が増強することが確認された。また、脊髄後角内の興奮性介在ニューロンが、末梢神経損傷にともなう発芽・分枝し、後角内の近傍のニューロンに興奮性シナプスを新たに形成する可能性が強く示唆された。このような神経回路網の変化が、神経障害性疼痛の発症に強く関与していると考えられる。

結 論

マルチ電極電位計測システムを中枢神経スライス標本に適用し、記録されたスパイク列の相互相関ヒストグラムを作成することにより、神経回路網の変化を電気生理学的に検討できることが示された。この方法を脊髄スライス標本に應用することにより、神経障害性疼痛の発症にともなう脊髄後角表層の神経回路網が機能的、解剖学的な変化を示すことが明らかとなった。

謝 辞 稿を終えるにあたり、ご指導賜りました獨協医科大学生理学(生体情報)教室 堀雄一教授および浅川徹也助手、麻酔科学講座 山口重樹教授および高薄敏史准教授をはじめ、御協力賜りました先生方に感謝を申し上げます。

学会発表：本研究の一部は第63回日本麻酔科学会(開催地：福岡)において発表した。

引用文献

- 1) Costigan M, Scholz J, Woolf CJ : Neuropathic pain : a maladaptive response of the nervous system to damage. *Annu Rev Neurosci* **32** : 1-32, 2009.
- 2) Latremoliere A, Woolf CJ : Central sensitization : a generator of pain hypersensitivity by central neural plasticity. *J Pain*. **10** : 895-926, 2009.
- 3) Treede RD : Gain control mechanisms in the nociceptive system. *Pain* **157** : 1199-1204, 2016.
- 4) West SJ, Bannister K, Dickenson AH, et al : Circuitry and plasticity of the dorsal horn-toward a better understanding of neuropathic pain. *Neuroscience* **300** : 254-275, 2015.
- 5) Biella G, Riva L, Sotgiu ML : Interaction between neurons in different laminae of the dorsal horn of the spinal cord. A correlation study in normal and neuropathic rats. *Eur J Neurosci* **9** : 1017-1025, 1997.
- 6) Roza C, Mazo I, Rivera-Arconada I, et al : Analysis of spontaneous activity of superficial dorsal horn neurons in vitro : neuropathy-induced changes. *Pflugers Arch* **468** : 2017-2030, 2016.
- 7) 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.
- 8) Aertsen AM, Gerstein GL : Evaluation of neuronal connectivity : sensitivity of cross-correlation. *Brain Res* **340** : 341-354, 1985.
- 9) Gerstein GL, Aertsen AM : Representation of cooperative firing activity among simultaneously recorded neurons. *J Neurophysiol* **54** : 1513-1528, 1985.
- 10) Moore GP, Segundo JP, Perkel DH, et al : Statistical signs of synaptic interaction in neurons. *Biophys J* **10** : 876-900, 1970.
- 11) Perkel DH, Gerstein GL, Moore GP : Neuronal spike trains and stochastic point processes II Simultaneous spike trains. *Biophys J* **7** : 419-440, 1967.
- 12) Nakamura S, Myers RR : Myelinated afferents sprout into lamina II of L3-5 dorsal horn following chronic constriction nerve injury in rats. *Brain Res* **818** : 285-290, 1999.
- 13) Soares S, et al : Extensive structural remodeling of the injured spinal cord revealed by phosphorylated MAP1B in sprouting axons and degenerating neurons. *Eur J Neurosci* **26** : 1446-1461, 2007.
- 14) Soares S, Barnat M, Salim C, et al : Phosphorylated MAP1B is induced in central sprouting of primary afferents in response to peripheral injury but not in response to rhizotomy. *Eur J Neurosci* **16** : 593-606, 2002.
- 15) Woolf CJ, Shortland P, Coggeshall RE : Peripheral nerve injury triggers central sprouting of myelinated afferents. *Nature* **355** : 75-78, 1992.
- 16) Komori K, Nonaka T, Okada A, et al : Absence of mechanical allodynia and Abeta-fiber sprouting after sciatic nerve injury in mice lacking membrane-type 5 matrix metalloproteinase. *FEBS Lett* **557** : 125-128, 2004.
- 17) Shehab SA, Spike RC, Todd AJ : Evidence against cholera toxin B subunit as a reliable tracer for sprouting of primary afferents following peripheral nerve injury. *Brain Res* **964** : 218-227, 2003.
- 18) Woodbury CJ, Kullmann FA, McIlwrath SL, et al : Identity of myelinated cutaneous sensory neurons projecting to nociceptive laminae following nerve injury in adult mice. *J Comp Neurol* **508** : 500-509, 2008.
- 19) Crosby ND, Zaucke F, Kras JV, et al : Thrombospondin-4 and excitatory synaptogenesis promote spinal sensitization after painful mechanical joint injury. *Exp Neurol* **264** : 111-120, 2015.
- 20) Lin JY, Peng B, Yang ZW : Number of synapses increased in the rat spinal dorsal horn after sciatic nerve transection : a stereological study. *Brain Res Bull* **84** : 430-433, 2011.
- 21) Peng B, Lin JY, Shang Y, Yang ZW, et al : Plasticity in the synaptic number associated with neuropathic pain in the rat spinal dorsal horn : A stereological study. *Neurosci Lett* **486** : 24-28, 2010.
- 22) Takasusuki T, Fujiwara T, Yamaguchi S, et al : Enhancement of synaptic transmission and nociceptive behaviour in HPC-1/syntaxin 1A knockout mice following peripheral nerve injury. *Eur J Neurosci* **26** : 2179-2187, 2007.
- 23) Kerschensteiner M, Stadelmann C, Buddeberg BS, et al : Targeting experimental autoimmune encephalomyelitis lesions to a predetermined axonal tract system allows for refined behavioral testing in an animal model of multiple sclerosis. *Am J Pathol* **164** : 1455-1469, 2004.
- 24) Tetzlaff W, Fouad K, Kwon B : Be careful what you

- train for. *Nat Neurosci* **12** : 1077-1079, 2009.
- 25) Boulenguez P, Liabeuf S, Bos R, et al : Down-regulation of the potassium-chloride cotransporter KCC2 contributes to spasticity after spinal cord injury. *Nat Med* **16** : 302-307, 2010.
- 26) Miletic G, Miletic V : Loose ligation of the sciatic nerve is associated with TrkB receptor-dependent decreases in KCC2 protein levels in the ipsilateral spinal dorsal horn. *Pain* **137** : 532-539, 2008.
- 27) Zhang W, Liu LY, Xu TL : Reduced potassium-chloride co-transporter expression in spinal cord dorsal horn neurons contributes to inflammatory pain hypersensitivity in rats. *Neuroscience* **152** : 502-510, 2008.
- 28) Coull JA, Boudreau D, Bachand K, et al : Trans-synaptic shift in anion gradient in spinal lamina I neurons as a mechanism of neuropathic pain. *Nature* **424** : 938-942, 2003.
- 29) Cramer SW, Baggott C, Cain J, et al : The role of cation-dependent chloride transporters in neuropathic pain following spinal cord injury. *Mol Pain* **4** : 36, 2008.
- 30) Gwak YS, Hulsebosch CE : GABA and central neuropathic pain following spinal cord injury. *Neuropharmacology* **60** : 799-808, 2011.
- 31) Price TJ, Cervero F, Koninck Y : Role of cation-chloride-cotransporters (CCC) in pain and hyperalgesia. *Curr Top Med Chem* **5** : 547-555, 2005.
- 32) Price TJ, Cervero F, Gold MS, et al : Chloride regulation in the pain pathway. *Brain Res Rev* **60** : 149-170, 2009.
- 33) Meisner JG, Marsh AD, Marsh DR : Loss of GABAergic interneurons in laminae I-III of the spinal cord dorsal horn contributes to reduced GABAergic tone and neuropathic pain after spinal cord injury. *J Neurotrauma* **27** : 729-737, 2010.
- 34) Mirauccourt LS, Dallel R, Voisin DL : Glycine inhibitory dysfunction turns touch into pain through PKC-gamma interneurons. *PLoS One* **2** : e1116, 2007.
- 35) Scholz J, Broom DC, Youn DH, et al : Blocking caspase activity prevents transsynaptic neuronal apoptosis and the loss of inhibition in lamina II of the dorsal horn after peripheral nerve injury. *J Neurosci* **25** : 7317-7323, 2005.
- 36) Caterina MJ, Schumacher MA, Tominaga M, et al : The capsaicin receptor : a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature* **389** : 816-824, 1997.
- 37) Gunthorpe MJ, Benham CD, Randall A, et al : The diversity in the vanilloid (TRPV) receptor family of ion channels. *Trends Pharmacol Sci* **23** : 183-191, 2002.
- 38) Helliwell RJ, McLatchie LM, Clarke M, et al : Capsaicin sensitivity is associated with the expression of the vanilloid (capsaicin) receptor (VR1) mRNA in adult rat sensory ganglia. *Neurosci Lett* **250** : 177-180, 1998.
- 39) Bevan S, Szolcsanyi J : Sensory neuron-specific actions of capsaicin : mechanisms and applications. *Trends Pharmacol Sci* **11** : 330-333, 1990.
- 40) Holzer P : Capsaicin : cellular targets, mechanisms of action, and selectivity for thin sensory neurons. *Pharmacol Rev* **43** : 143-201, 1991.
- 41) Fernandes ES, Fernandes MA, Keeble JE : The functions of TRPA1 and TRPV1 : moving away from sensory nerves. *Br J Pharmacol* **166** : 510-521, 2012.
- 42) Mezey E, Tóth ZE, Cortright DN, et al : Distribution of mRNA for vanilloid receptor subtype 1 (VR1), and VR1-like immunoreactivity, in the central nervous system of the rat and human. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97** : 3655-3660, 2000.
- 43) Valtschanoff JG, Rustioni A, Guo A, et al : Vanilloid receptor VR1 is both presynaptic and postsynaptic in the superficial laminae of the rat dorsal horn. *J Comp Neurol* **436** : 225-235, 2001.
- 44) Eblen-Zajjur AA, Sandkuhler J : Synchronicity of nociceptive and non-nociceptive adjacent neurons in the spinal dorsal horn of the rat : stimulus-induced plasticity. *Neuroscience* **76** : 39-54, 1997.

Cross-correlation Analysis of the Neuronal Circuits in the Spinal Superficial Dorsal Horn : The Application of a Multi-electrode Array

Yu Takemura

Department of Anesthesiology, Dokkyo Medical University, Tochigi Japan

In the present experiment, we recorded spike activities simultaneously from multiple neurons in the spinal superficial dorsal horn (SDH) using a multi-electrode array system (MEA2100-System : multi-channel systems, Germany), and performed cross-correlation analysis of the spike trains to further characterize the synaptic circuits underlying nociceptive processing in the spinal cord. Cross-correlograms between spontaneous spike trains of simultaneously recorded neurons in the SDH were constructed using DataView (Heitler WJ, University of St Andrews, Scotland) and MATLAB R2010b (MathWorks, USA). The most frequent pattern observed in cross-correlograms was a flat histogram. However, a considerable

number of neuron pairs exhibited significantly correlated activities. The incidence of significant cross-correlation between neural activities was increased in mice subjected to partial sciatic nerve ligation. The present observations seem to indicate that neurons in the SDH make excitatory and/or inhibitory synapses on the nearby neurons and that synaptic connections among neurons in the SDH might change significantly after the development of neuropathic pain.

Key Words : neuropathic pain, spinal dorsal horn, a multi-electrode array system, synaptic rearrangement