

## ラット脊髄後角におけるヒスタミンの作用について — 脊髄 IR-DIC スライスパッチクランプ法を用いて —

大 石 芳 彰

広島大学大学院医歯薬学総合研究科創生医科学専攻  
病態探究医科学講座神経生理学 (主任: 緒方宣邦教授)

受付: 平成15年12月14日

受理: 平成16年1月7日

ヒスタミンならびにヒスタミンレセプターが脊髄後角に高濃度に存在することが明らかになっており, ヒスタミンが痛みの伝達に何らかの調節機構を有していると考えられている。そこでラット脊髄横断スライス標本を作製し, 赤外線微分干渉型顕微鏡システムを併用したパッチクランプ法による電気生理学的手法を用いて脊髄後角第2層細胞 (膠様質細胞) におけるヒスタミンの作用を検討した。保持電位を $-70$  mVとすると, 膠様質細胞からは自発性の興奮性シナプス後電流が観察された。さらに後根神経入力部に電気刺激を加えると誘発興奮性シナプス後電流が観察された。また保持電位を浅く $0$  mVに保持すると, 自発性の抑制性シナプス後電流が観察された。これらのシナプス後電流に対するヒスタミンの効果を電気生理学的に検討した。自発性興奮性シナプス後電流に対しては, 頻度の相対変化率がヒスタミン投与後に $122 \pm 39\%$ となり, 軽度の増加がみられたものの, 統計学的に明らかな有意差はみられず, 振幅の増大もみられなかった。ヒスタミンはH1受容体に結合し, protein kinase C (PKC) 系に作用し, 何らかの作用をおこすと考えられているため, PKC系の活性化剤である phorbol 12,13-dibutyrate (PDBu) を投与したが, 明らかな変化はみられなかった。後根神経入力部電気刺激による誘発興奮性シナプス後電流, ならびに自発性抑制性シナプス後電流においても頻度や振幅の明らかな変化はみられなかった。今回の電気生理学的な検討からは有意な変化をとらえることができず, 脊髄後角膠様質細胞における電気活動に対してヒスタミンが顕著な作用を有する可能性は低いと考えられた。

**Key words:** Histamine, Pain, Spinal cord, Patch clamp

知覚神経系はさまざまな刺激を中枢神経系へ伝達することにより生体の防御系として重要な働きをしている。炎症や組織損傷などによって生じたブラジキニン, プロスタグランジン, ヒスタミン, セロトニンなどのいわゆる発痛関連物質によって侵害受容器が刺激され, この情報が侵害受容神経線維を介して脊髄後角へと伝えられ, ここから放出されるグルタミン酸, サブスタンスP, CGRP (Calcitonin Gene-Related Peptide) などの神経伝達物質を介して脊髄に入力した後, 大脳皮質に投射されて侵害受容性疼痛として感じられる。

ヒスタミンは発痒物質のひとつである<sup>5)</sup>が, 発痛物質としても作用することが古くから知られている<sup>22)</sup>。発痒物質としてのヒスタミンは知覚神経終末に存在す

るH1受容体に作用することが示唆されており<sup>4)</sup>, この感覚は伝導速度の遅い一次知覚ニューロン, すなわちA $\delta$ 線維やC線維により中枢に伝えられる<sup>11,24)</sup>。その一方でヒスタミン受容体は末梢だけでなくこのA $\delta$ 線維やC線維が入力する脊髄後角にも高濃度に分布しており<sup>7,19,25,31)</sup>, H1受容体遺伝子ノックアウトマウスを用いた研究<sup>17)</sup>からも脊髄レベルにおいてシナプス伝達の調整に関与していると思われるが, これらを生理機能の観点から検討した報告は少ない。我々は脊髄後角におけるヒスタミンのシナプス伝達における役割を明らかにするため, ラット脊髄横断スライス標本を作製し, 赤外線微分干渉型顕微鏡システムを併用したパッチクランプ法による電気生理学的手法を用いて脊

髄後角第2層細胞（膠様質細胞）におけるヒスタミンの作用を検討した。

## 材料および方法

### 使用動物

実験には生後10～20日，雌雄のSprague-Dawley系ラット（20～40 g）を用いた。ラットは広島大学医学部動物実験施設において恒温（22±2℃）かつ12時間－12時間の明暗サイクルの環境下で飼育されたものを用い，水と飼料は自由に摂取させた。すべての実験は広島大学動物実験指針で定める方法に準じて行った。

### 脊髄横断スライス標本の作成

ウレタン腹腔内投与（1.2～1.5 g/kg）により深麻酔を施行し，酸素投与下に胸腰移行部から仙椎部まで椎弓切除を行い，同部の脊髄を取り出し，速やかに95%O<sub>2</sub>，5%CO<sub>2</sub>で飽和し，2～3℃に水冷したクレブス液にて冷却した。実体顕微鏡下に硬膜，前根，後根，くも膜および軟膜を除去した後，ブロック状の寒天に溝を形成し，この溝に脊髄を固定した。不要な両端を切除したのち，寒天ブロックとともにステージ上に固定し，マイクロスライサー DTK-1000 (DOSAKA EM Co. Ltd.) を用いて厚さ500 μmの脊髄横断スライスを作製した。これを記録用チャンバー内に移し，U字型の銀線にナイロン線をグリッド状に配した固定器でスライスをチャンバー底面に固定し，95%O<sub>2</sub>，5%CO<sub>2</sub>で飽和したクレブス液を10～20 ml/minの流速で還流した。クレブス液の組成は NaCl 117, KCl 3.6, CaCl<sub>2</sub> 2.5, MgCl<sub>2</sub> 1.2, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.2, NaHCO<sub>3</sub> 25, glucose 11 (mM) であった。

### 脊髄後角細胞からのパッチクランプ記録

赤外線微分干渉型検鏡システム（infrared differential interference contrast system：以下IR-DIC system）を装備した固定式正立顕微鏡 BX51W1 (OLYMPUS Co. Ltd.) を用いて，テレビモニター下に膠様質細胞からホールセルパッチクランプ記録を行った。IR-DIC systemには赤外線感知ビデオカメラNewvicon C2741 (Hamamatsu Photonics) を使用した。まず低倍率（7倍）にてテレビモニター下に脊髄スライス標本を観察すると，後角第2層はやや明るい層として確認，同定可能であった。その後，水浸対物レンズに切り替え高倍率（80倍）とすると，直径5 μmから15 μmの大きさで，紡錘形から円形の形をした第2層の膠様質細胞がモニター下に観察できた。IR-DIC systemにおいてはブラインド法と異なり，細胞を同定し，その状態を観察しながらパッチ操作を行う事が可能であった。このIR-DIC systemを装備したホールセルパッチクラン

プ法を用いて単一細胞から電気応答を記録した。記録用電極にはPiller PP-83 (Narishige, Inc.) を用いて作製したパッチクランプ用電極にK-gluconate 135, KCl 5, CaCl<sub>2</sub> 0.5, MgCl<sub>2</sub> 2, EGTA 5, HEPES 5, Mg-ATP 5 (mM) を充填した先端電極抵抗6～10 MΩの電極を用いた。抑制性シナプス後電流の計測にあたってはK channel に由来する電流を抑制するため，K-gluconate をCs-acetate で置換し，さらにTEA 5 mMを加えてKチャンネル透過性をブロックした条件で検討した。電圧固定記録にはAxopatch 200B amplifier (Axon Instrument, Inc.) を用い，データを5 kHzのローパスフィルターを用いてノイズをキャンセルし，サンプリング周波数25～100 kHzでサンプリングを行い，データ記録および解析用ソフトPower Lab 2/20 (ADI instruments, Inc.) を用いて記録，ならびに解析した。検定はWilcoxon法にて行い，危険率5% (p<0.05) をもって有意と判定した。

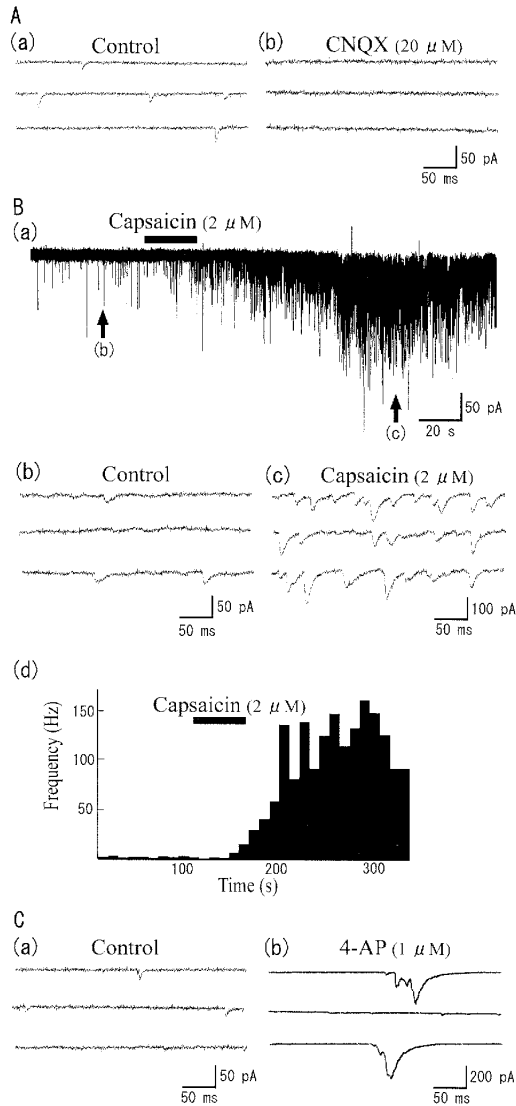
## 結 果

### 興奮性シナプス後電流の観察

脊髄後角膠様質細胞にパッチ形成後，膜電位固定法にて－70 mVに電位固定し，ホールセル記録を行うとほとんどの細胞で0.5～15 Hz程度の自発性の内向き電流が観察された（図1-A-a）。この内向き電流はグルタミン酸受容体阻害薬の6-cyano-7nitroquinoxaline-2,3-dione (CNQX) (20 μM) を還流投与するとほぼ完全に消失し（図1-A-b），グルタミン酸受容体を介した自発性興奮性シナプス後電流（spontaneous excitatory post synaptic current：sEPSC）によるものと考えられた。Yangら<sup>30)</sup>はカプサイシンがシナプス前終末においてvanilloid receptor 1 (VR1) 受容体に作用しsEPSCの増加を引き起こすことを報告しており，この実験系がシナプス後電流の変化を捉えうることを確かめるため，カプサイシンの投与実験を行った。カプサイシン（2 μM）を投与したところ，いくつかの細胞ではsEPSCは著明に増加した（図1-B-a,b,c,d）。さらに4-aminopyridine (4-AP) はKチャンネルを抑制し，sEPSCの増大を引き起こすことがよく知られており，4-AP（1 μM）を投与したところ，sEPSCの頻度の増加はみられなかったが，振幅の著明な増大がみられた（図1-C-a,b）。これらの実験により，本手技において脊髄膠様質細胞の電気生理学的応答をとらえられることが判明し，以下の実験に移った。

### 興奮性シナプス後電流に対するヒスタミンの作用

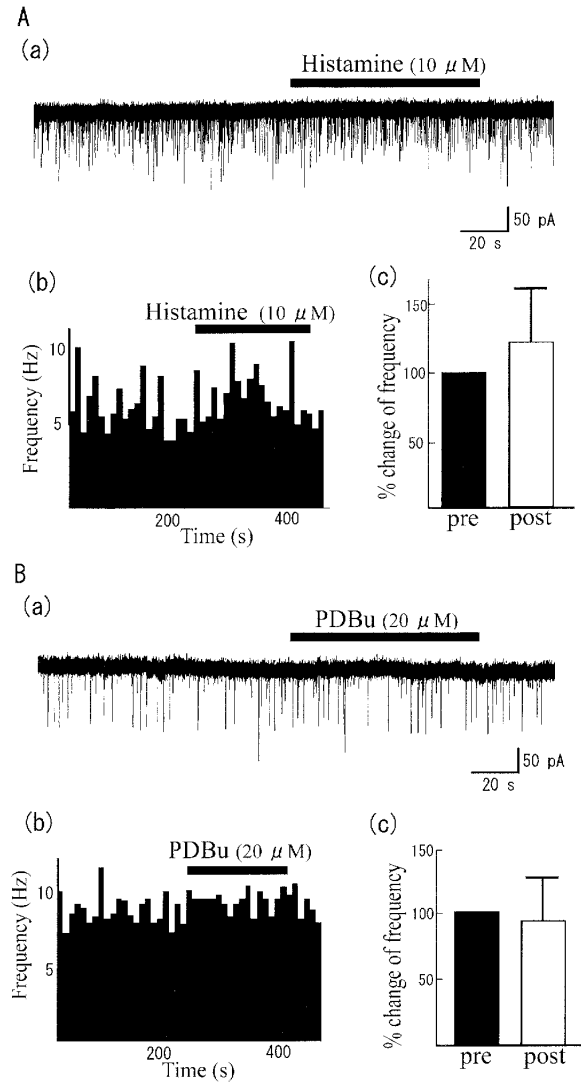
脊髄膠様質細胞にパッチ形成後，ヒスタミン（0.1 μM～1 mM）の還流投与を行った。明らかにEPSCの



**Fig. 1.** Spontaneous excitatory post synaptic currents (sEPSCs) recorded from substantia gelatinosa neurons.

A : The membrane currents at a holding potential of  $-70$  mV. Three consecutive traces were shown. In this and subsequent figures, downward deflection represents negative polarity. (a) Downward deflections indicate sEPSCs. (b) In the presence of CNQX ( $20 \mu\text{M}$ ). B : (a) A long lasting recording of the membrane currents from substantia gelatinosa neuron. The sharp downward deflections reflect sEPSCs. Capsaicin ( $2 \mu\text{M}$ ) was applied at the period indicated by a bar. Recordings at points indicated by arrows are shown with an expanded time scale in (b) and (C). (d) The frequency of sEPSC was plotted before and after application of capsaicin. C : sEPSCs were recorded from substantia gelatinosa neuron before (a) and after application of  $1 \mu\text{M}$  4-AP (b).

頻度が増加する細胞はみられず、カプサイシンや 4-AP が引き起こすような変化は見られなかった (図2-A-a,b)。25個の細胞に投与実験を行い、投与前後の sEPSC の変化を検討した。頻度相対変化率は  $122 \pm 39\%$  と軽度の増加はみられたが、統計学的に明らかな有意差を認めることはできず (図2-A-c)、また振幅の



**Fig. 2.** The effects of histamine on sEPSC.

A : (a) Histamine ( $10 \mu\text{M}$ ) was applied at the period indicated by a bar. (b) The frequency of sEPSC was plotted before and during application of histamine. (c) The percent change of sEPSC frequency after application of histamine. ( $n=25$ ) B : (a) Phorbol 12, 13-dibutyrate (PDBu), an activator of protein kinase C (PKC) was applied at the period indicated by a bar. (b) The frequency of sEPSC was plotted before and after application of PDBu. (c) The percent change of sEPSC frequency after application of PDBu. ( $n=5$ )

変化もみられなかった。

H1 受容体に結合したヒスタミンは protein kinase C (PKC) 系に作用し, 何らかの作用をおこすと考えられており, PKC 系の活性化剤である Phorbol 12,13-dibutyrate (PDBu)(20  $\mu\text{M}$ ) を投与した。しかし明らかな変化はみられず (図2-B-a,b), sEPSC の頻度相対変化率も  $96 \pm 33\%$  と統計学的有意差を認めることはできなかった ( $n=5$ )(図2-B-c)。

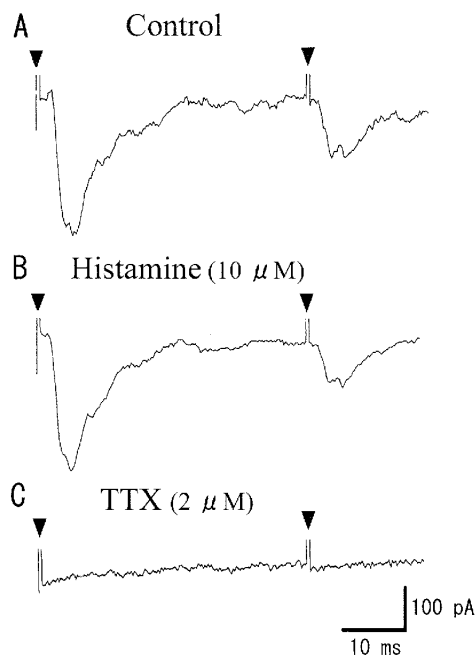
#### 後根神経入力部電気刺激による誘発興奮性シナプス後電流に対するヒスタミンの作用

さらに後根神経入力部を電気刺激して得られる誘発 EPSC を検討した。脊髄後側方の後根神経入力部に双極刺激電極を置き, 電気刺激装置 SEN3201 (Nihon kohden Co. Ltd) にて刺激強度 1 mA, 刺激持続時間 0.1 ms, 刺激間隔 40 ms の連発刺激を行った。刺激開始時より 1 ms 程度の潜時をもって内向きの電流が観察された (図3-A)。ヒスタミン投与下にこの後根神経入力部電気刺激による誘発 EPSC を観察したが, 誘発された興奮性シナプス後電流の振幅や波形に明らかな

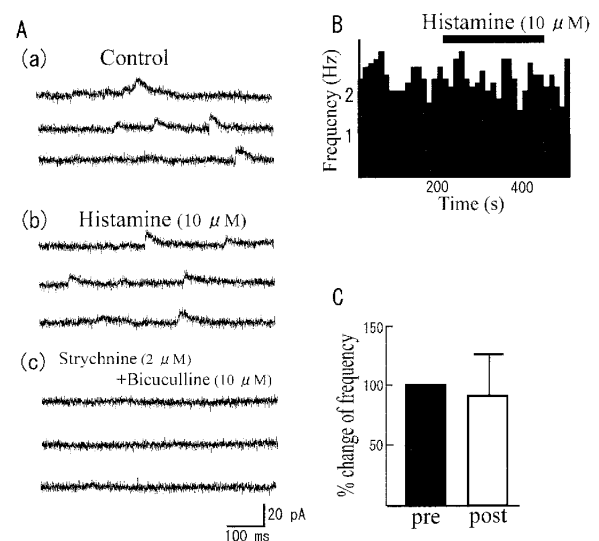
変化はみられなかった (図3-B)。さらにテトロドトキシン (2  $\mu\text{M}$ ) を還流投与したところ誘発 EPSC は速やかに消失した (図3-C)。このことは軸索由来の刺激がシナプスを介してシナプス後細胞に入力されていたと考えられたが, ヒスタミンによる明らかな変化を見いだすに至らなかった。

#### 抑制性シナプス後電流に対するヒスタミンの作用

興奮性シナプス電流に明らかな変化がみられなかったことから抑制系への影響を検討することとした。パッチ形成後 0 mV に膜電位を固定すると自発性の外向き電流が観察される (図4-A-a)。この外向き電流はグリシン受容体阻害薬であるストリキニーネ (2  $\mu\text{M}$ ) と, GABA<sub>A</sub> 受容体阻害薬であるビククリン (10  $\mu\text{M}$ ) により抑制された (図4-A-c)。このことからこの外向き電流はグリシンおよび GABA<sub>A</sub> 受容体の活性化による自発性抑制性シナプス後電流 (spontaneous inhibitory post synaptic current : sIPSC) によるものと考えられた。この IPSC を観察し, ヒスタミン投与を行った。しかし明らかな変化は見られず (図4-A-



**Fig. 3.** The effects of histamine on the EPSC evoked by paired electrical stimuli delivered to an entrance of the dorsal root. Evoked EPSC was recorded as a large negative wave. Three sets of traces show evoked EPSCs in the control (A), in the presence of 10  $\mu\text{M}$  histamine (B) and in the presence of 2  $\mu\text{M}$  tetrodotoxin (C).  $\blacktriangledown$ : Paired electrical stimuli. (intensity: 1 mA, duration: 0.1 ms, interval: 40 ms)



**Fig. 4.** The effects of histamine on spontaneous inhibitory post synaptic current (sIPSC). A: The membrane currents of substantia gelatinosa neuron at a holding potential of 0 mV. Upward deflections indicate sIPSCs. (a) sIPSC in the control. (b) In the presence of 10  $\mu\text{M}$  histamine. (c) In the presence of 2  $\mu\text{M}$  strychnine plus 10  $\mu\text{M}$  bicuculline. B: Histamine was applied at the period indicated by a bar. C: The percent change of sIPSC frequency after application of histamine. ( $n=5$ )

a,b,B,C), sIPSCの頻度相対増加率も $91 \pm 30\%$ と明らかな統計学的有意差を認めなかった ( $n=5$ )。

## 考 察

ヒスタミンは最もよく知られた発痒物質の一つである<sup>5)</sup>が、この作用は知覚神経末梢における H1 受容体を介するものと考えられている。この H1 受容体が発現している知覚神経はオピオイド受容体も多く存在していること<sup>22)</sup>、さらにC線維に多くみられること<sup>11,24)</sup>、H1受容体の選択的作動薬の投与によって侵害受容の亢進がおこること<sup>16)</sup>などから痛みにも関与している可能性が示唆されてきた。臨床的にも抗ヒスタミン剤が反射性交感神経性ジストロフィーなどの慢性疼痛を有する症例に有効であったり<sup>23)</sup>、実験的に作製した神経腫に伴うラットの自傷行為を抗ヒスタミン剤が抑制する<sup>26)</sup>など、ヒスタミンは痛みの調節に何らかの関与を有していると思われる<sup>21)</sup>。さらに最近の H1 受容体遺伝子ノックアウトマウスを用いた研究<sup>18)</sup>ではこのマウスが野生型と比較して熱刺激、圧刺激、化学刺激に対する侵害反応が低下しており、ヒスタミンが痛みに関与する可能性が一層確かなものになってきた。

また一次知覚ニューロンにおけるヒスタミン受容体の発現を調べた報告はいくつかあげられる<sup>14,19,24)</sup>が、モルモットの三叉神経節において52%ものニューロンがヒスタミンに対して脱分極性の応答を示すと報告<sup>9)</sup>されているものの、サルの後根神経節においては7%のニューロンしか陽性を示さず<sup>19)</sup>、ラットの後根神経節を用いた *in situ* ハイブリダイゼーション法においても約10%のニューロンしか H1 受容体遺伝子を発現しておらず<sup>27)</sup>、その発現頻度は決して高いものではない。さらにこのニューロンの特異性を検討した報告<sup>11)</sup>では、このニューロンがサブスタンスPやCGRPを含有せず、さらにカプサイシンにも反応しないことを報告しており、C線維の中でも特異なサブグループによるものと位置付けている。

一方、二次知覚ニューロンが存在すると思われる脊髄においてはヒスタミンが存在することが確認されており<sup>20)</sup>、H1受容体の存在も様々な方法で調べられ<sup>7,19,25,31)</sup>、ヒスタミン含有神経線維も脊髄後角に存在することがわかってきた<sup>3,10,21)</sup>。Ninkovic ら<sup>19)</sup>は放射性リガンドを用いた結合実験によって H1 受容体が脊髄後角第2層に高濃度に存在することを報告しており、さらに興味深いことに後根を切離すると H1 受容体が第2層より消失したとしている。同様の変化は末梢神経障害時における後根神経節においても観察されており<sup>11)</sup>、神経障害時には末梢レベルだけでなく脊髄

レベルまで広範囲に変化が起きているものと推測される。また H1 受容体ノックアウトマウスにモルヒネを硬膜外投与した最近の研究<sup>17)</sup>では、モルヒネによって得られる抗侵害受容作用をヒスタミン H1 受容体は脊髄レベルで抑制することが判明しており、脊髄後角第2層におけるヒスタミンの作用が H1 受容体を介するものである可能性が示唆された。

これらの報告からヒスタミンは脊髄後角第2層において H1 受容体を介して作用しているものと考えられるが、これまでこれを電気生理学的に捉えた報告はない。今回、IR-DIC system を装備したホールセルパッチクランプ法を用いて、脊髄後角第2層の神経細胞を同定した上で、その単一細胞からの電気応答を記録した。一次知覚ニューロンには H1 受容体の存在が証明されていることから、H1 受容体がシナプス前に存在し、その興奮がシナプス後細胞に伝達され、sEPSCの増加が観察されるものと推測された。しかしながらヒスタミンを投与してもシナプス後細胞では明らかな電気生理学的変化を捉えることができなかった。前述のようにヒスタミンに反応する神経細胞の占める割合は決して多いものではないため、今回の実験で捉えられなかった可能性もあるが、25細胞での記録中、1細胞も明らかな変化がみられず、数だけの問題とは考えにくい。さらに H1 受容体は PKC 系を介して作用すると考えられており<sup>12,29)</sup>、これを活性化する PDBu の投与実験も行ったが、これにても明らかな電気生理学的変化はみられなかった。今回の実験において、カプサイシンや 4-AP の投与では sEPSC の変化を捉えることができたが、ヒスタミン投与の反応を捉えるには何らかの細胞内の条件を整えてやる必要があるのかもしれない。

ヒスタミンは主に H1 受容体に作用していると考えられているが、Harasawa ら<sup>6)</sup>は後根を電気刺激して引き起こされた nociception-related slow ventral potential の計測から H1, H2, H3 受容体ともに脊髄レベルにおいて痛みに影響していると報告している。脳幹では H2 受容体サブタイプが抗侵害受容メカニズムとしてオピオイドシステムと関連して働いており<sup>1,2,8)</sup>、さらに脊髄においても H2 受容体の活性化によって抗侵害受容作用を示すことが報告されていることから<sup>15)</sup>、H2 受容体の関与もあげられる。また中枢神経系においては H3 受容体がオートレセプターとしてヒスタミンの放出を調整し、さらにヒスタミンだけでなく他のノルアドレナリンやセロトニンなどの神経伝達物質の放出の調節を行っている<sup>13)</sup>。このように H2, H3 受容体も脊髄レベルにおいて、何らかの作用を有

していると考えられるが、今回の検討からは、その電気生理学的な関与は考えにくいと思われた。

今回のパッチクランプ法を用いた検討は sEPSC だけでなく、後根神経入力部電気刺激による誘発 EPSC や、sIPSC の検討も行ったが、有意な結果を得るに至らなかった。観測細胞の量的な問題、観測至適条件の設定の問題、さらにヒスタミンの作用が電気生理学的に引き起こされるものではなく、他のシグナル伝達系を介する可能性もあるが、今回の検討からは、脊髄後角における電気生理学的活動に対して、ヒスタミンが単独で顕著な作用を有する可能性は低いと思われた。しかしながら今回の実験は脊髄後角第2層に限定した検討であり、ヒスタミン作動性ニューロンが第1層にも投射しているとの報告<sup>28)</sup>もあることから、第2層以外での反応も検討する必要もあると思われる。ヒスタミンが脊髄後角において何らかの痛みの調節機能に関与している可能性は否定できず、電気生理学的検討だけでなく他の手法を用いたさらなる検討が必要だと思われる。

#### 謝 辞

最後に本研究を遂行するにあたり、ご指導、ご鞭撻を賜りました広島大学大学院医歯薬学総合研究科神経生理学・緒方宣邦教授ならびに厚生連広島総合病院整形外科・藤本吉範先生に深く感謝いたします。

そして終始実験にご協力頂きました神経生理学ならびに整形外科学教室の方々に感謝いたします。

#### 参 考 文 献

1. **Barke, K.E. and Hoough, L.B.** 1992. Morphine-induced increases of extracellular histamine levels in the periaqueductal gray in vivo : microdialysis study. *Brain Res.* **572** : 146-153.
2. **Barke, K.E. and Hoough, L.B.** 1994. Characterization of basal and morphine-induced histamine release in the rat periaqueductal gray. *J. Neurochem.* **63** : 238-244.
3. **Bouthenet, M.L., Ruat, M., Sales, N., Garbarg, M. and Schwartz, J.C.** 1988. A detailed mapping of histamine H1-receptor in guinea pig central nervous system established by autoradiography with [<sup>125</sup>I] iodobolpylamine. *Neurosci.* **26** : 553-600.
4. **Douglas, W.W.** 1985. Histamine and 5-hydroxytryptamine (serotonin) and their antagonists, p. 605-638. *In* A.G.Goodman, L.S.Goodman, T.W. Rall and F. Murad (eds.), *The Pharmacological Basis of Therapeutics*, Macmillan, New York.
5. **Handwerker, H.O., Foster, C. and Kirchhoff, C.** 1991. Discharge patterns of human C-fibers induced by itching and burning stimuli. *J. Neurophysiol.* **66** : 307-315.
6. **Harasawa, K.** 2000. Does the histaminaergic system play a role in spinal nociception? . *北海道医誌.* **75** : 275-281.
7. **Hill, S.J., Emson, P.C. and Young, J.M.** 1978. The binding of [<sup>3</sup>H] mepyramine to histamine H1 receptors in guinea-pig brain. *J. Neurochem.* **31** : 997-1004.
8. **Hough, L.B. and Nalwalk, J.W.** 1992. Modulation of morphine antinociception by antagonism of H2 receptors in the periaqueductal gray. *Brain Res.* **588** : 58-66.
9. **Hutcheon, B., Puil, E. and Spigelman, I.** 1993. Histamine actions and comparison with substance P effects in trigeminal neurons. *Neurosci.* **55** : 521-529.
10. **Inagaki, N., Yamatodani, A., Ando-Yamamoto, M., Tohyama, M., Watanabe, T. and Wada, H.** 1988. Organization of histaminergic fibers in the rat brain. *J. Comp. Neurol.* **273** : 283-300.
11. **Kashiba, H., Fukui, H., Morikawa, Y. and Senba, E.** 2001. Gene expression of histamine H1 receptor in guinea pig primary sensory neurons- a relationship between H1 receptor mRNA-expressing neurons and peptidergic neurons. *Mol. Brain Res.* **66** : 24-34.
12. **Leurs, R., Smit, M.J. and Timmerman, H.** 1995. Molecular pharmacological aspects of histamine receptors. *Pharmacol. Ther.* **66** : 413-463.
13. **Leurs, R., Vollinga, R.C. and Timmerman, H.** 1995. The medicinal chemistry and therapeutic potentials of ligands of H3 receptor. *Pro. Drug Res.* **45** : 107-165.
14. **MacDonald, S.M., Mezei, M. and Mezei, C.** 1981. Effect of Wallerian degeneration on histamine concentration of the peripheral nerve. *J. Neurochem.* **36** : 9-16.
15. **Malmberg-Aiello, P., Lamberti, C., Ghelardini, C., Giotti, A. and Bartolini, A.** 1994. Role of histamine in rodent antinociception. *Br. J. Pharmacol.* **111** : 1269-1279.
16. **Malmberg-Aiello, P., Lamberti, C., Ipponi, A. and Bartolini, A.** 1998. Evidence for hypernociception induction following histamine H1 receptor activation in rodents. *Life Sci.* **63** : 463-476.
17. **Mobarakeh, J.I., Sakurada, S., Hayashi, T., Orito, T., Okuyama, K., Sakurada, T., Kuramasu, A., Watanabe, T., Watanabe, T. and Yanai, K.** 2002. Enhanced antinociception by intrathecally-administered morphine in histamine H1receptor gene knockout mice. *Neuropharmacol.* **42** : 1079-1088.
18. **Mobarakeh, J.I., Sakurada, S., Katsuyama, S.,**

- Kutsuwa, M., Kuramasu, A., Lin, Z.Y., Watanabe, T., Hashimoto, Y. and Yanai, K.** 2000. Role of Histamine H1receptor in pain perception: a study of the receptor gene knock out mice. *Euro. J. Pharmacol.* **391** : 81-89.
19. **Ninkovic, M., Hunt, S.P. and Gleave, J.R.** 1982. Localization of opiate and histamine H1-receptors in the primate sensory ganglia and spinal cord. *Brain Res.* **241** : 197-206.
20. **Oishi, R., Nishibori, M. and Saeki, K.** 1983. Regional distribution of histamine and tele-methyl-histamine in the rat, mouse and guinea pig brain. *Brain Res.* **280** : 172-175.
21. **Panula, P., Flugge, G., Fuch, E., Pirvola, U., Auvinen, S. and Airaksinen, M.S.** 1989. Histamine-immunoreactive nerve fibers in mammalian spinal cord. *Brain Res.* **484** : 234-239.
22. **Rosenthal, S.R.** 1964. Histamine as a chemical mediator for cutaneous pain. *Fed. Proc.* **23** : 1109-1111.
23. **Rumore, M.M. and Schichting, D.A.** 1986. Clinical efficacy of antihistaminics as analgesics. *Pain* **25** : 7-22.
24. **Schmidt, R., Schmelz, M., Forster, C., Ringkamp, M., Torebjork, E. and Handwerker, H.** 1995. Novel classes of responsive and unresponsive C nociceptors in human skin. *J. Neurosci.* **15** : 333-341.
25. **Schwartz, J.C., Arrang, J.M., Garbarg, M., Pollard, H. and Ruat, M.** 1991. Histaminergic transmission in the mammalian brain. *Physiol. Rev.* **71** : 1-51.
26. **Seltzer, Z., Paran, Y., Eisen, A. and Ginzburg, R.** 1991. Neuropathic pain behavior in rats depends on the afferent input from nerve-end neuroma including histamine-sensitive C-fibers. *Neurosci. Lett.* **128** : 203-206.
27. **Senba, E. and Kashiba, H.** 1996. Sensory afferent processing in multi-responsive DRG neurons, p.387-410. *In* T. Kumazawa, L. Kruger and K. Mizumura (eds.), the polymodal receptor: a gateway to pathological pain. Vol 113, progress in Brain Res., Elsevier, Amsterdam.
28. **Steven, L.J. and Carstens, E.** 2000. Superficial dorsal horn neurons identified by intracutaneous histamine: Chemonociceptive responses and modulation by morphine. *J. physiol.* **84** : 616-627.
29. 渡邊建彦, 福井裕行, 谷内一彦 1997. ヒスタミン受容体. 蛋白質・核酸・酵素 **42** : 131-138.
30. **Yang, K. and Kumamoto, E.** 1988. Capsaicin facilitates excitatory but inhibitory synaptic transmission in substantia gelatinosa of the rat spinal cord. *Neurosci. Lett.* **255** : 135-138.
31. **Young, W.S. and Kuhar, M.J.** 1979. A new method for receptor autoradiography [<sup>3</sup>H] opioid receptors in rat brain. *Brain Res.* **179** : 255-270.

## Effects of Histamine on the Electrical Activities of Spinal Dorsal Horn Neurons *in Vitro*

Yoshiaki OHISHI

Department of Neurophysiology, Division of Integrated Medical Science, Graduate School of Biomedical  
Sciences, Hiroshima University (Director: Prof. Nobukuni OGATA)

Histamine and its receptors are densely localized in the dorsal horn of the spinal cord, where primary afferent fibers terminate. These findings suggest that histamine may be involved in the regulation of pain sensation in the spinal cord. Therefore, we studied the effect of histamine on synaptic transmission in substantia gelatinosa neurons of the rat spinal cord. Electrical activities of substantia gelatinosa neurons were observed using the whole cell patch clamp technique combined with infrared differential interference contrast system. We recorded spontaneous excitatory post synaptic currents (sEPSCs) and EPSCs evoked by paired electrical stimuli delivered to an entrance of the dorsal root. In addition, spontaneous inhibitory post synaptic currents (sIPSCs) were examined. Although the frequency of sEPSC was slightly increased after application of histamine in concentrations of  $0.1 \mu\text{M} - 1 \text{ mM}$  ( $122 \pm 39\%$ ), this increase was not statistically significant. While it has been reported that histamine activates protein kinase C (PKC) system through H1 receptor, the frequency of sEPSC was not affected by phorbol 12,13-dibutyrate (PDBu), an activator of PKC. Furthermore, histamine had no detectable effect on evoked EPSC or sIPSC. These observations might indicate that histamine does not play an important role in the electrical activity of substantia gelatinosa neurons.