



Nagoya City University Academic Repository

学位の種類	博士（薬科学）
報告番号	甲第1696号
学位記番号	第342号
氏名	山田 彬博
授与年月日	平成31年3月25日
学位論文の題名	脊髄膠様質細胞におけるエタノールの抑制性シナプス伝達増強メカニズムについて
論文審査担当者	主査： 山村 壽男 副査： 糸 和彦，服部 光治，田中 正彦，大澤 匡弘

名古屋市立大学学位論文

脊髄膠様質細胞におけるエタノールの抑制性シナプス伝達増強メカニズムについて

平成 30 年度（西暦 2019 年 3 月）

薬学研究科博士後期課程 創薬生命科学専攻

氏名:山田 彬博

本論文は、平成 30 年度（2019 年 3 月）名古屋市立大学大学院薬学研究科において審査されたものである。

主査 山村 寿男 教授

副査 条 和彦 教授

服部 光治 教授

田中 正彦 准教授

大澤 匡弘 准教授

本論文は、学術情報雑誌に掲載された次の報文を基礎とするものである。

1. Yamada A, Koga K, Kume K, Ohsawa M, Furue H : Ethanol-induced enhancement of inhibitory synaptic transmission in the rat spinal substantia gelatinosa.

Molecular Pain. 2018 Jan-Dec 14:1744806918817969.

2. Choi S, Yamada A, Kim W, Kim SK, Furue H.

Noradrenergic inhibition of spinal hyperexcitation elicited by cutaneous cold stimuli in rats with oxaliplatin-induced allodynia: electrophysiological and behavioral assessments.

Journal of Physiological Science. 2017 May;67(3):431-438.

本論文の基礎となる研究は、条 和彦教授、古江 秀昌教授の指導の下に名古屋市立大学大学院薬学研究科、兵庫医科大学において行われた。

目次

1. Introduction	6
1.1 エタノールの中枢神経系での作用	6
1.2 末梢から脊髄における痛みの伝達経路	6
1.3 本研究の目的	7
2. Material and Methods	9
2.1 実験動物	9
2.2 スライス作製法	9
2.3 ホールセルパッチクランプ法	9
2.4 <i>in vivo</i> 標本における細胞外神経活動記録法	10
2.5 統計	11
3. Results	12
3.1 SG 神経細胞においてエタノールは抑制性シナプス伝達を増加させる	12
3.2 SG 神経細胞においてエタノールは興奮性シナプス伝達を変化させない	23
3.3 エタノールは VGAT-Venus 陽性細胞の自発発火を促進させた	27

3.4 エタノールは機械刺激に対する WDR 神経細胞の応答変化を減弱させた	30
4. Discussion	34
4.1 本研究のまとめ	34
4.2 エタノールの濃度依存的な SG 介在性神経細胞への影響	34
4.3 エタノールのシナプス近傍への作用ではない抑制性介在神経細胞の興奮作用 ..	35
4.4 機械刺激誘発性 WDR 神経細胞での After discharged 発火抑制	36
4.5 本研究結果の生理学的意義.....	37
5. Summary	39
6. Acknowledgements	40
7. References	41

略語

AP	Action Potential
mIPSCs	miniature Inhibitory Postsynaptic Currents
sEPSCs	spontaneous Excitatory Postsynaptic Currents
sIPSCs	spontaneous Inhibitory Postsynaptic Currents
VGAT-Venus	Vesicle GABA Transporter - Venus
WDR	Wide Dynamic Range

1. Introduction

1.1 エタノールの中樞神経系での作用

エタノールは古くからいろいろな用途に使用されてきた。エタノールは中枢神経系に直接作用していると考えられており、気分、認知、運動、鎮静や鎮痛など多岐にわたる作用を示す。最近の研究では、エタノールが、前頭前野、扁桃体、海馬、側坐核、脊髄などの様々な中枢神経系の領域において直接影響を与えていることが示されており、その主な作用機序として、シナプス伝達の抑制作用が提唱されている^{3,21}。例えば、前頭前野では、エタノールが GABA 受容体を介した Cl⁻電流を増強し、神経活動を抑制することが報告されている^{1,34,46}。また、海馬や扁桃体では、エタノールが電気刺激により誘発された GABA 作動性の電流を増強する^{35,37,40}。小脳や脊髄前角などでは、抑制性シナプス伝達をエタノールが増強する^{10,52}。さらに、興奮性シナプス伝達に対しても、エタノールの抑制作用が報告されており、前頭前野や海馬では、興奮性シナプス伝達を抑制する^{27,45}。この他に、エタノールはシナプス伝達だけでなく、一部の脳領域における神経細胞活動性に対しても影響することが報告され、側坐核の一部の細胞でみられる自発発火を示す細胞群が、エタノールにより発火頻度を増加させる^{15,24}。また、小脳ゴルジ細胞の自発発火もエタノール処置により増加する¹⁰。海馬においても同様に、介在神経細胞の神経発火をエタノールが増加させる⁴⁴。このように、エタノールは、中枢神経系の各領域で、抑制性シナプス伝達を増加させる作用の他、一部の領域で、神経細胞の興奮性を増加させる働きも報告されている。

1.2 末梢から脊髄における痛み伝達経路

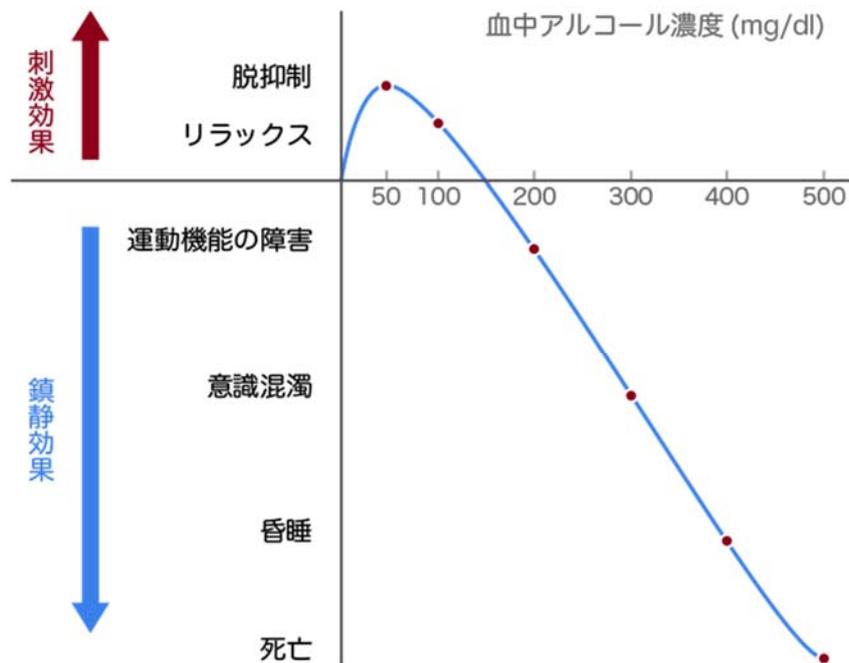
脊髄後角 II 層に位置する Substantia Gelatinosa(SG)神経細胞群は、痛覚伝達における重要な領域であることが知られている^{23,41}。SG 神経細胞群は興奮性と抑制性介在神経細胞

胞で構成されており、末梢の支配領域からの感覚入力の手御を行っている^{18,25,49}。神経障害性疼痛モデルを解析すると、SG 神経細胞群のシナプス伝達が変化しており、触覚入力などが痛覚として伝達される¹³。また、脊髄V層に存在する Wide Dynamic Range (WDR) 細胞も、痛覚伝達を評価する上で重要であり⁴⁷、疼痛モデルの解析によりそれら細胞に特徴的である After-Discharged 発火が増加する^{12,48}。

しかし、急性のエタノール処置による SG 神経細胞のシナプス伝達ならびに痛覚伝達に対する影響は全く分かっていない。

1.3 本研究の目的

本研究では、脊髄後角での痛みの情報伝達に対するエタノールの急性処置の影響を明らかにすることを目的とした。また、それぞれのエタノール濃度において、急性期に脊髄のシナプス伝達、神経活動においてどのような作用があるか明らかにすることを目的とした。本目的を達成するため、次の3つの電気生理学的手法を用いて検討を行った。まず、ブラインド法を用いたホールセルパッチクランプ記録を利用して、脊髄後角における抑制性と興奮性シナプス伝達に対するエタノールの影響を検討した。次に、蛍光物質である Venus を発現する遺伝子改変ラット、Vesicle GABA Transporter (VGAT) - Venus ラットを用いて、微分干渉顕微鏡を利用したホールセルパッチクランプ記録により、Venus 陽性細胞に対するエタノール急性投与の影響を検討した。最後に、麻酔下ラットにおいて、*in vivo* 細胞外記録法を用いて、エタノールが実際に痛覚伝達に対してどのような影響を及ぼすか検討した。



厚生労働省ホームページより引用

参考図表:

本研究で、エタノールの濃度は、低濃度 (~10 mM)、中濃度(20~50 mM)、高濃度(100 mM)と定義している。上図に従い計算すると、低濃度 (~10 mM) で約 50 mg/dl 以下の血中濃度、中濃度(20~50 mM)で約 100~250 mg/dl 程の血中濃度、高濃度(100 mM)で約 500 mg/dl 程度の血中濃度となる。実際には、体内動態などで、エタノールの血中濃度は、長時間一定にはならないと考えられるが、定量的な検討を行うため、本研究においては、一定濃度のエタノールを還流投与した。

2. Material and Methods

2.1 実験動物

本研究では、6週齢の Sprague-Dawley(SD)系統雄性ラットと2-4週齢の VGAT-Venus Wister 系統の雄雌性ラットを用いた。飼育環境は、給餌水を整えたケージ内に動物を収容し、室温 20°C、12 時間の明暗サイクルで飼育した。すべての実験は、名古屋市立大学、自然科学機構 生理学研究所、兵庫医科大学の動物実験管理委員会における動物実験承認を受けて行った。3R の原則に則って、使用動物削減をできるだけ行い、実験後不必要な苦痛を動物に与えないため、ウレタン (2-4g/kg) または吸入麻酔イソフルラン (1.2-1.5 g/kg) を使用し安楽死させた。

2.2 スライス作製法

パッチクランプ記録に用いる脊髄スライス作成には、2-4週齢の SD ラットまたは、VGAT-Venus ラットを使用した^{42,43}。ウレタン(1.2-1.5 g/kg)を腹腔内に投与した後、椎弓切除術を行った。脊髄を体内から取り出し、腰椎および仙椎領域の脊髄をトリミングした後、1-3°Cで保たれた冷 Krebs 液内に静置した。Krebs 液の組成は以下の通りとした (in mM: 117 NaCl, 3.6 KCl, 2.5 CaCl₂, 1.2 MgCl₂, 1.2 NaH₂PO₄, 25 NaHCO₃, and 11 glucose)。冷 Krebs 液内で十分に冷やした脊髄から、血管、脊髄後根、硬膜、くも膜、軟膜を取り除き、寒天内に固定した後、ビブラトームスライサー (VT1200S; Leica)にセットした。スライス厚は、ブラインドホールセルパッチクランプ法では 500 μm、微分干渉顕微鏡を使用したパッチクランプ法では 300 μm とした。脊髄スライスは、36°Cの 95% 酸素、5%二酸化酸素で飽和した Krebs 液を流速 10 ml/min で灌流したチャンバーで一時間、回復させた。

2.3 ホールセルパッチクランプ法

SG 神経細胞から記録はブラインドパッチクランプ法に従って行った。脊髄スライスに強い光を与えたとき、灰白色に透ける領域を SG 領域とした。ピペット内液の組成は、EPSCs 記録時には potassium solution (K-gluconate 135, CaCl₂ 0.5, MgCl₂ 2, KCl 5, EGTA 5, Mg-ATP 5, HEPES 5, pH 7.2) を利用した。また、IPSCs 記録時には、Cesium solution (Cs₂SO₄ 110, TEA-Cl 5, CaCl₂ 0.5, MgCl₂ 2, EGTA 5, ATP-Mg 5, HEPES-CsOH 5, pH 7.2) 内液を使用した。EPSCs および IPSCs の記録では、電位固定法により保持電位をそれぞれ -70 mV と 0 mV とした。VGAT-Venus 陽性細胞からの膜電位記録は、電流固定法により記録を行った。VGAT-Venus 陽性細胞は、infrared differential interference contrast (IR-DIC) 微分干渉顕微鏡 (U-MWIGA3; Olympus) を用いて同定し、Venus 専用蛍光フィルターを用いて蛍光の確認を行った。エタノールなどの薬物は、Krebs 液に混合させ、還流液として作用させた。

神経活動はパッチクランプ増幅器 (Axopatch 200B, Molecular Devices) で増幅し、5k Hz のローパスフィルターを用いた。また、サンプリングは 500 kHz で行い、Digidata 1322 (Molecular Devices) により A/D 変換を用いて 10 – 20 kHz で波形をデジタル値に変換した後 PC で記録した。シナプス伝達は minianalysis (version 6.0.7, Synaptosoft, Fort Lee, NJ, USA) を用いて解析した。エタノールに感受性のある細胞は、コントロールの応答に対して ±50% 以上変化したものとした。

2.4 *in vivo* 動物における脊髄での細胞外記録法

6 週齢の SD 系統ラットにウレタン (1.2 -1.5 g/kg) を腹腔内投与し、体温維持などで体状態を良好な状態に維持した。椎弓切除術により、T13-L2 領域の椎弓を剥離し、L3-L5 領域の脊髄を露出した。我々は開発した脊髄専用定位固定装置を用いて、*in vivo* 脊髄剥離標本として定位固定した後、Krebs 液を灌流し細胞外記録を行うためのチャンバーを脊髄上で作成した。エタノールなどの薬物は、Krebs 液に混合させ、脊髄上に灌流投与を行った。また、

記録電極刺入は硬膜を一部外して行った。神経活動の複合記録には、10M Ω のタングステン電極を使用し、細胞外記録用アンプ（EX1; Dagan 社）で増幅させた。スパイク記録のために、バンドパスフィルターにより 300–3000 Hz の間の周波数帯域のシグナルを記録した。A/D コンバーターなどの装置は、パッチクランプ法と同じ digidata1322 を使用し、記録周波数は 25000 Hz としデジタル変換後、パーソナルコンピュータへ波形を記録した。神経活動スパイクの記録に成功した後、WDR 神経細胞の同定のため、記録を行っている脊髄の同側の後肢に弱い触刺激を与え、刺激に顕著な応答を示した場合、von Frey フィラメントの 26 g および 60 g の刺激強度を使用して、その応答性が刺激強度依存的に増加すれば WDR 神経細胞であると同定した。

2.5 統計

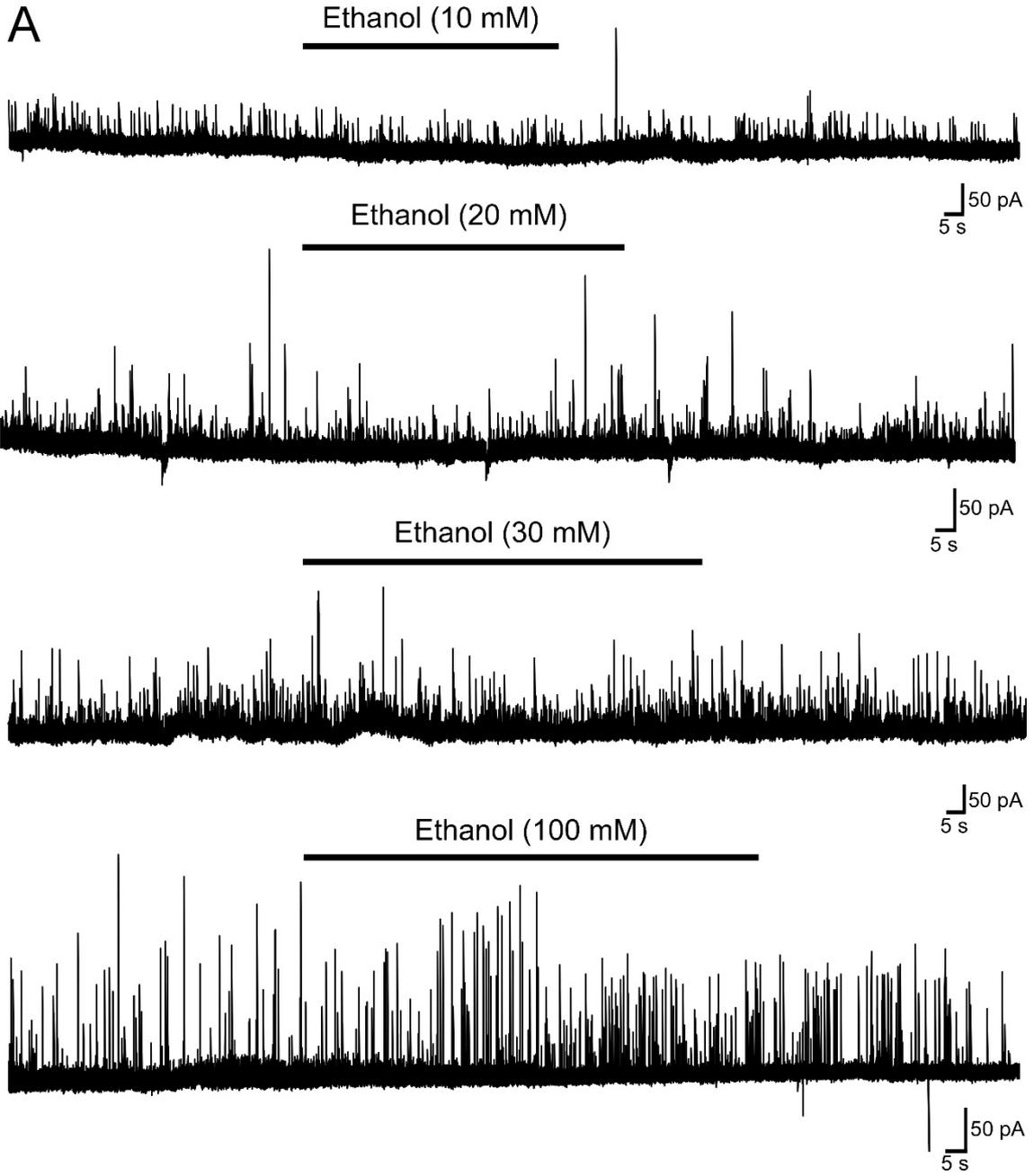
統計的有意差は、paired または unpaired t-test を使用した。累積分布配列の検定には Kolmogorov-Smirnov test を使用した。有意水準は $p < 0.05$ とした。n は記録した神経細胞の数を表す。

Results

3.1 エタノールは SG 神経細胞における抑制性シナプス伝達を増加させた

まず、エタノールの急性適用による脊髄 SG 領域の神経細胞機能への作用を検討するため、脊髄スライス標本を用いて 3 種類の異なる濃度のエタノールを適用した際のシナプス伝達への影響を観察した (低濃度、中濃度、高濃度; 10 mM、20–50 mM、100 mM)。SG 領域の神経細胞から自発的な sIPSCs が記録することができ、その頻度と振幅はそれぞれ、 5.4 ± 1.2 Hz および 39.3 ± 6.3 pA ($n = 24$)であった (Fig. 1A)。次に、sIPSCs に対するエタノールの急性適用の影響を検討した。低濃度のエタノール適用では、sIPSCs の頻度と振幅に有意な影響は見られなかった (frequency, $105.9 \pm 9.8\%$ of control; amplitude, $101.3 \pm 9.8\%$ of control; $n = 8$)。一方、Fig. 1B で示すように中濃度のエタノール適用では、一部の細胞において sIPSCs の顕著な増加が認められた。この時の sIPSCs の振幅の分布は Fig. 1C で示したように、大きな振幅の sIPSCs のイベント (> 25 pA)が増加していた。自発性 sIPSCs の decay 時間を解析すると、エタノールを作用させる前後で、それぞれ、 14.9 ± 4.0 ms と 14.9 ± 5.2 ms であった (Fig. 1C 右上)。また、低濃度から高濃度エタノールを適用した時に sIPSCs の頻度が 150%以上増加したものの細胞の割合は、低濃度においては 0%、中濃度においては 28.6%、高濃度においては 56.5%であった (Fig. 1D)。中濃度のエタノール適用により頻度が 150%以上増加した sIPSCs の頻度と振幅はコントロールと比較するとそれぞれ $227.5 \pm 38.8\%$ および $129.6 \pm 17.9\%$ ($n = 6$)であった。一方、頻度が 150%以上変化しなかったものの頻度と振幅はコントロールと比較するとそれぞれ $107.1 \pm 6.2\%$ および $101.9 \pm 5.6\%$ ($n=10$)であった。高濃度のエタノール適用では、頻度が 150%以上増加した sIPSCs の頻度と振幅はコントロールと比較するとそれぞれ $254.0 \pm 40.1\%$ および $116.6 \pm 12.0\%$ ($n=13$)であった。一方、頻度が 150%以上変化しなかった IPSCs の頻度と振幅はコントロールと比較するとそれぞれ $106.4 \pm 12.0\%$ および $107.5 \pm 11.6\%$ ($n = 10$)であった (Fig. 1E, F)。

A



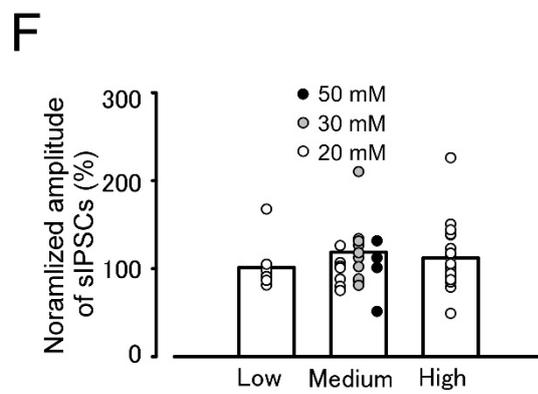
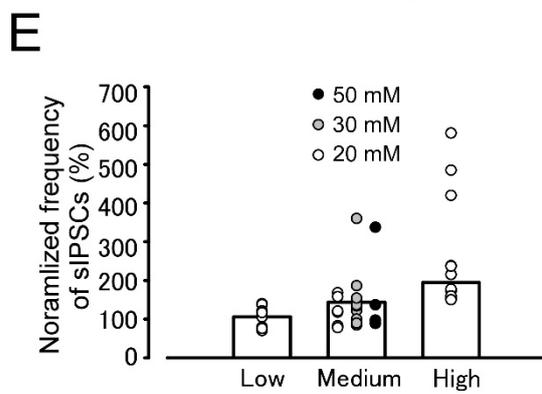
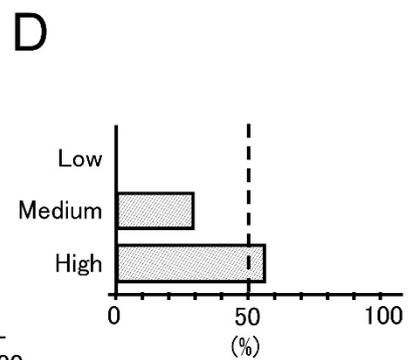
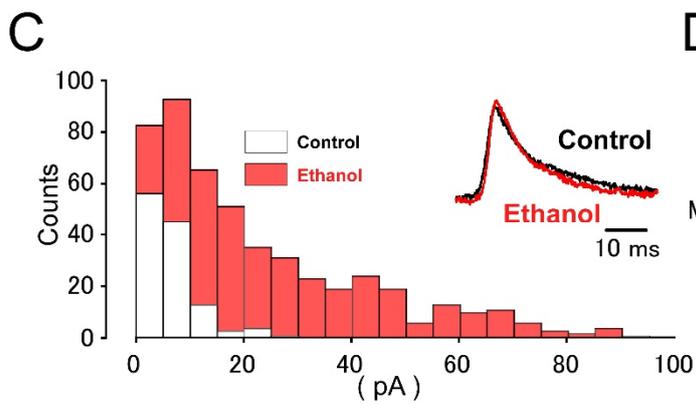
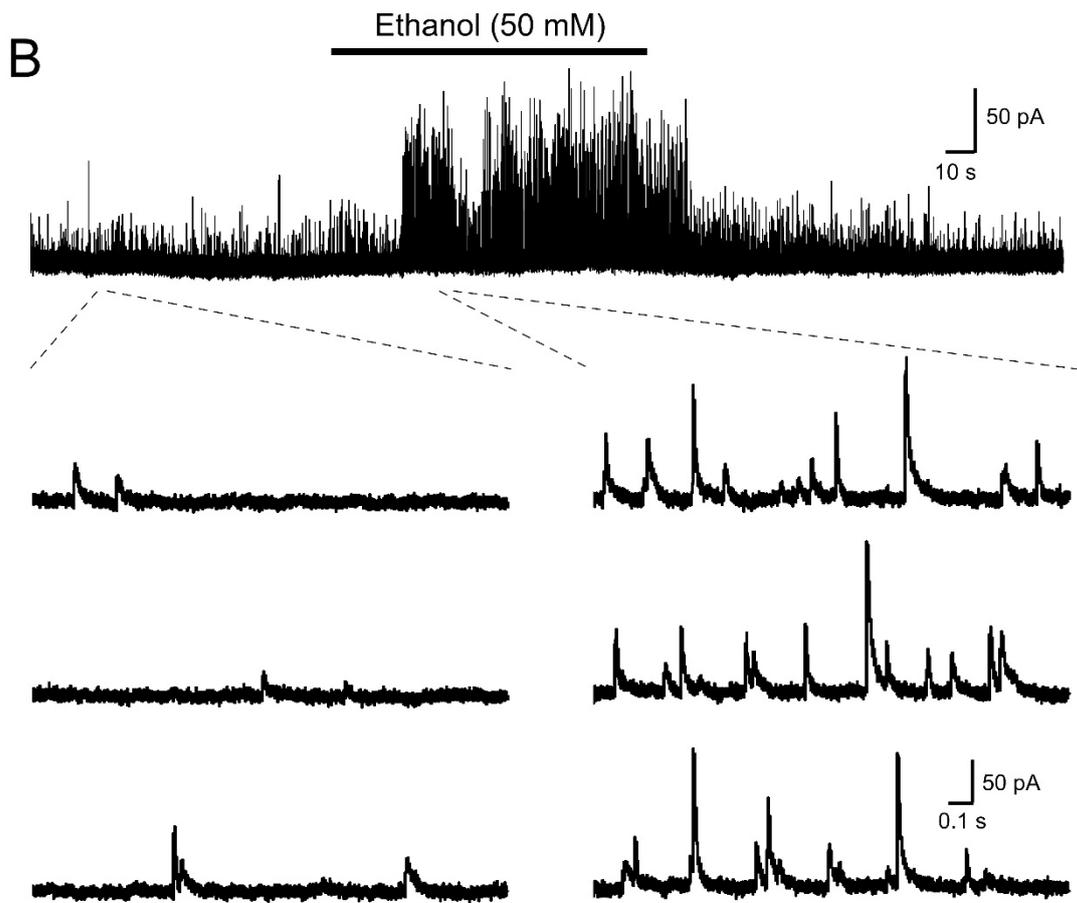


Figure 1. 脊髄 SG 領域の神経細胞に見られる自発性 IPSCs に対するエタノールの影響

- (A) SG 領域の神経細胞において、保持電位 0 mV で自発性 IPSCs を記録し、エタノールを 10 mM、20 mM、30 mM、100 mM と急性適用させた時の反応例。
- (B) SG 領域の神経細胞において、保持電位 0 mV で自発性 IPSCs を記録したときに 50 mM のエタノールを急性適用した際の細胞の反応例。下図は、時間軸を拡大させ、エタノールを急性適用させた前後での変化を比較した波形を示す。
- (C) エタノールを急性適用させた前後での、自発性 IPSCs の振幅の分布。横軸に振幅(pA)を、縦軸に自発性 IPSCs のイベント数を示す。右上の図は、自発性 IPSCs の振幅で標準化した際の自発性 IPSCs のカイネティクスを比較したトレースを示す。
- (D) 各濃度のエタノールにおいて作用前後で、自発性 IPSCs の頻度が 150%以上増加した細胞の割合。
- (D, E) 各濃度における神経細胞の自発性 IPSCs の頻度、振幅についてエタノール適用前を 100%とした場合での変化率(低濃度: n = 8、中濃度: n = 16、高濃度 n = 23)。

sIPSCs を引き起こす神経伝達物質には、GABA と Glycine がある。そこで、高濃度エタノールにより頻度の増加が認められる sIPSCs が、どちらの神経伝達物質により引き起こされているかについて同定を試みた。Glycine 受容体拮抗薬である strychnine (3 μ M) または GABA_A 受容体拮抗薬である bicuculine (10 μ M) を灌流適用し、GABA 性と Glycine 性の sIPSCs を分離したところで、それぞれの拮抗薬存在下で、高濃度エタノールにより sIPSCs の頻度が 150%以上増加した細胞が存在した (Fig. 2)。Strychnine 存在下で、高濃度エタノールを灌流適用すると、GABA 性の sIPSCs が増加した (control, 1.1 ± 0.4 Hz; ethanol, 2.3 ± 0.5 Hz; n = 5)。次に、bicuculine 存在下で、高濃度エタノールを灌流適用した際にも Glycine 性の sIPSCs は増加した (control, 1.8 ± 0.4 Hz; ethanol, 3.3 ± 0.7 Hz; n = 5)。また、strychnine (3 μ M) と bicuculine (10 μ M) 両拮抗薬を同時還流すると、sIPSCs は完全に見られなくなった。これらの結果から、エタノールは、SG 神経細胞に対し、GABA 性または Glycine 性の sIPSCs の増加を引き起こすことが明らかになった。

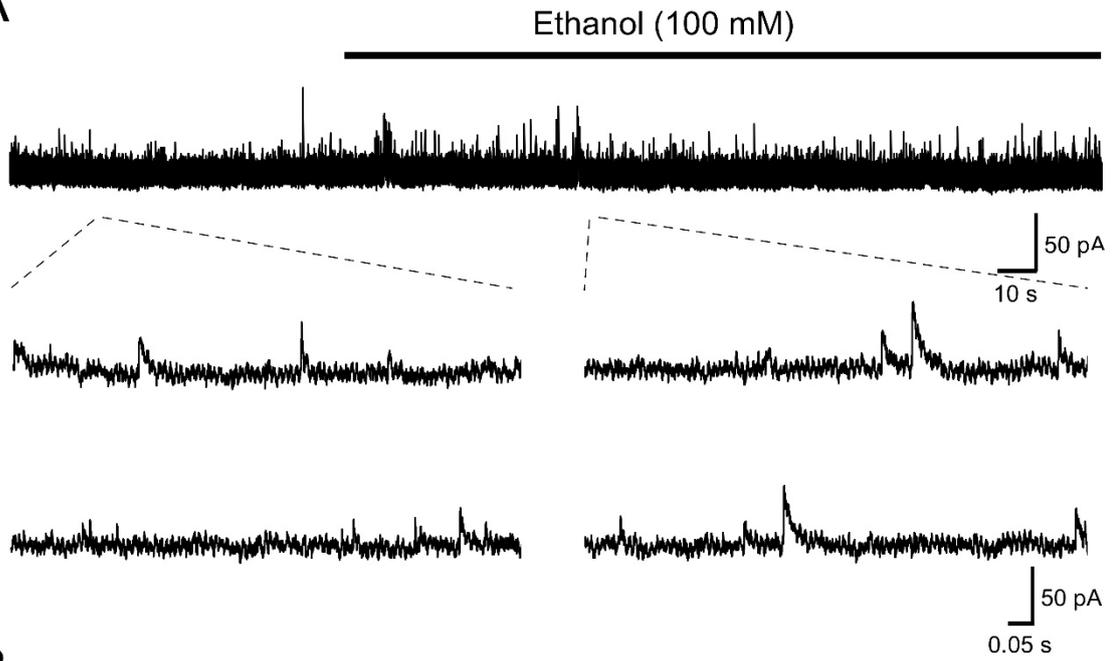
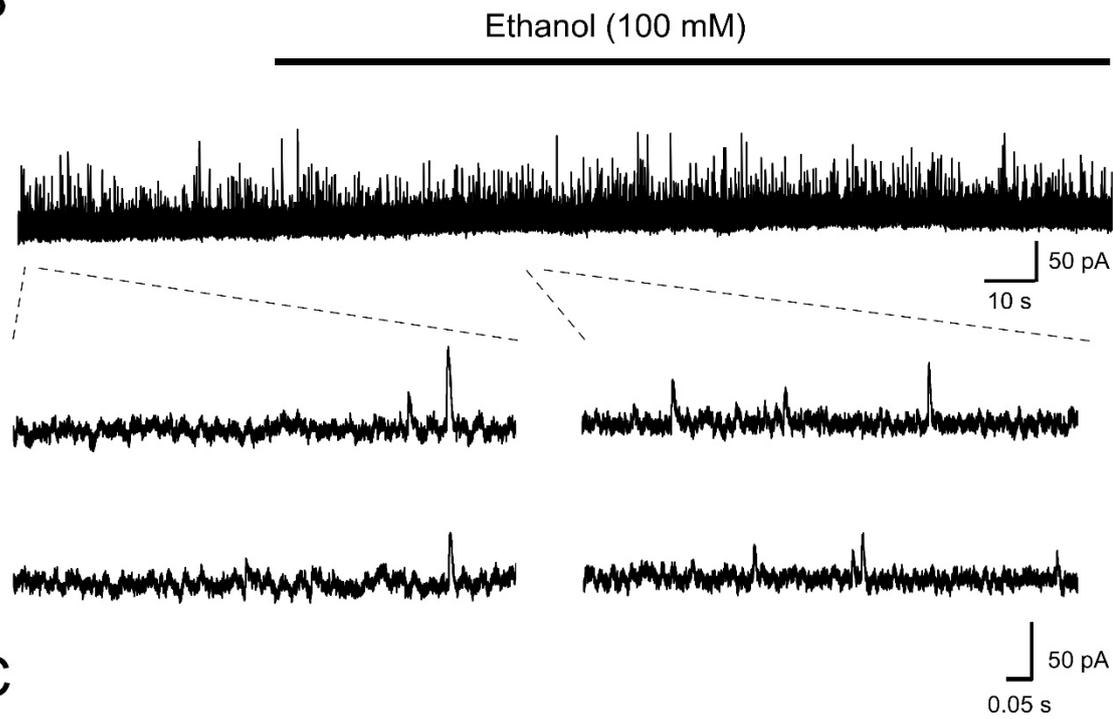
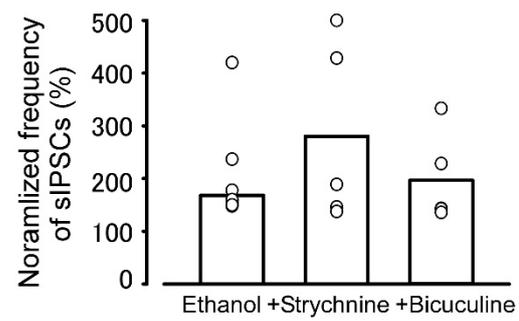
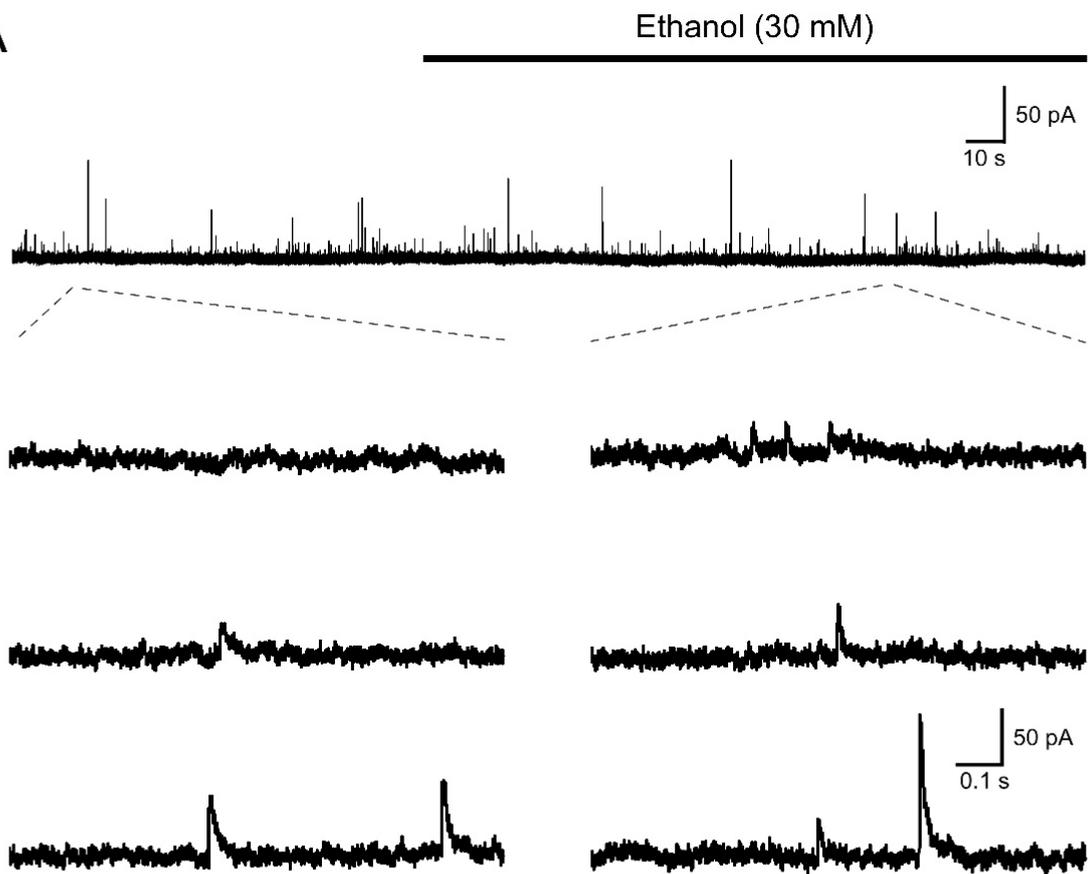
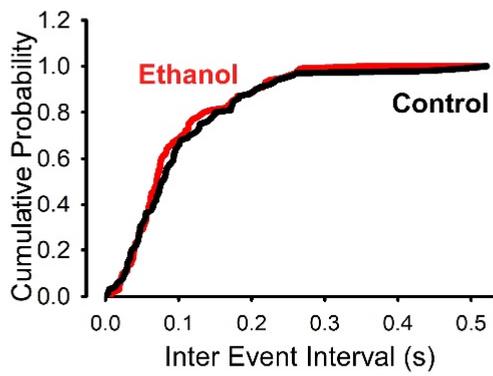
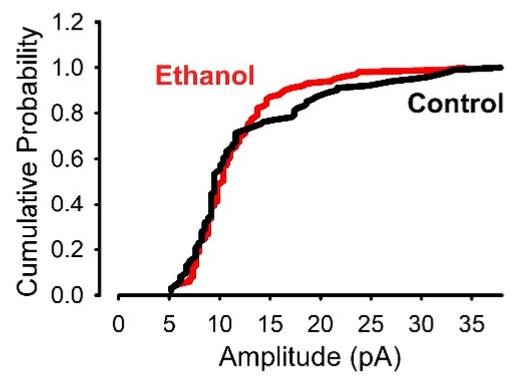
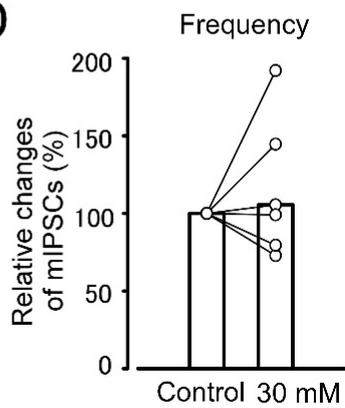
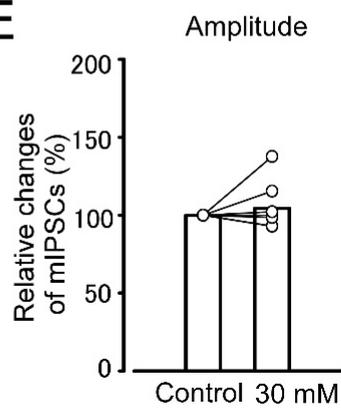
A**B****C**

Figure 2. strychnine または bicuculine 存在下における高濃度エタノールの sIPSC に対する効果

- (A) 電位固定下、保持電位 0 mV、strychnine (3 μ M) 存在下で sIPSCs を記録した際、高濃度エタノール 100 mM を作用させたときの反応例。下図は、エタノール適用前後の拡大図を示す。
- (B) 電位固定下、保持電位 0 mV、bicuculine (10 μ M) 存在下で sIPSCs を記録した際、高濃度エタノール 100 mM を作用させたときの反応例。下図は、エタノール適用前後の拡大図を示す。
- (C) 高濃度エタノール(100 mM)を作用させた時の、自発性 IPSCs の頻度の相対的变化をエタノール単独、strychnine 存在下、bicuculine 存在下にて算出した結果(ethanol 単独: n = 10、ethanol + strychnine: n = 5、ethanol + bicuculine: n = 5)。

次に、微小 IPSCs (miniature IPSCs, mIPSCs) に対して、高濃度エタノールの急性適用の影響を検討した。TTX 存在下で、SG 領域の神経細胞から mIPSCs を記録すると、その発火頻度と振幅はそれぞれ、 1.9 ± 0.5 Hz および 23.5 ± 2.6 pA であった ($n = 16$)。まず、中濃度エタノール (30 mM) を急性適用させると、1 細胞以外で頻度の増加が見られなかった (Fig. 3D)。頻度と振幅の変化率はコントロールと比較して、それぞれ $105.6 \pm 13.6\%$ ならびに $104.4 \pm 8.4\%$ であった ($n = 7$)。

また、高濃度エタノールにおいて、微小 IPSCs の頻度が 150% 以上増加した細胞は存在しなかった (Fig. 3G)。頻度と振幅の変化率はコントロールと比較して、それぞれ $111.1 \pm 9.3\%$ ならびに $98.5 \pm 3.9\%$ であった ($n = 6$)。

A**B****C****D****E**

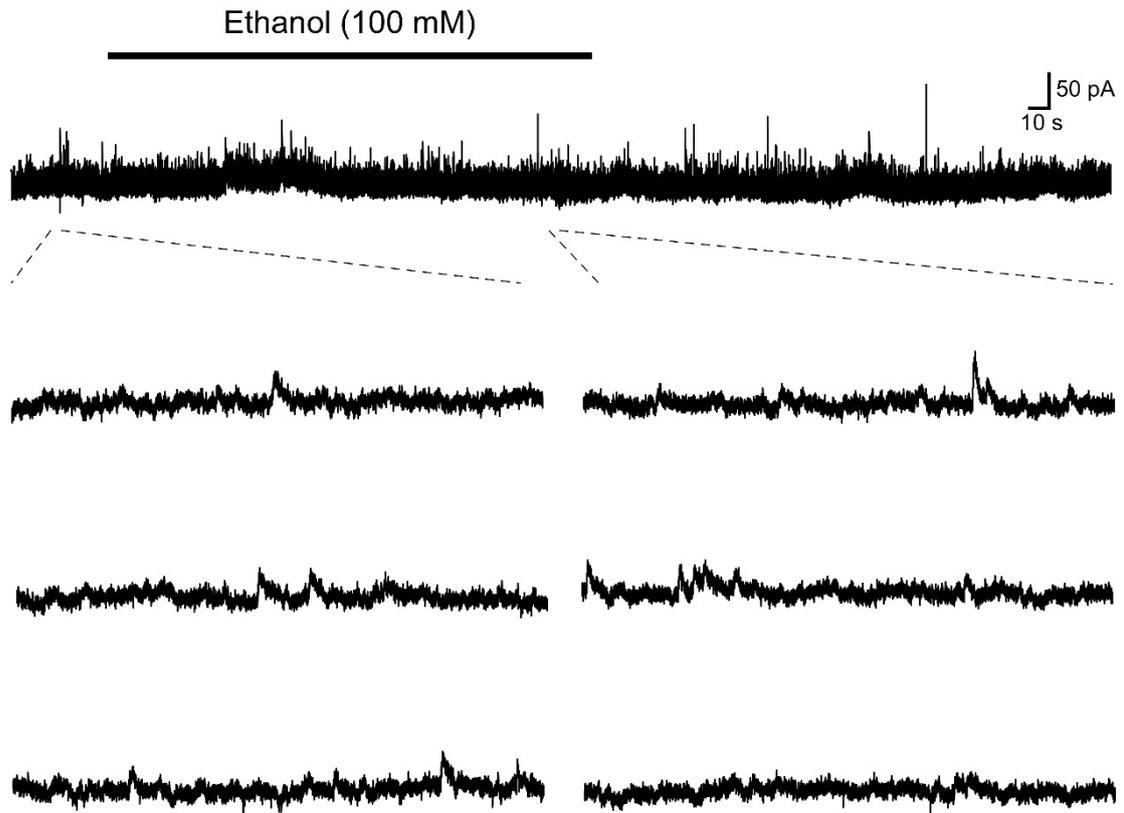
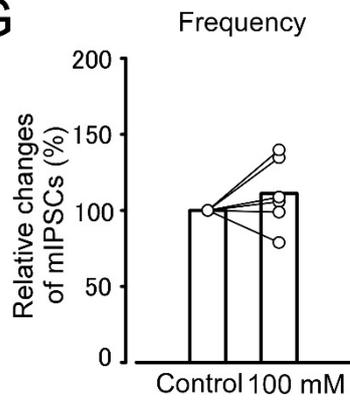
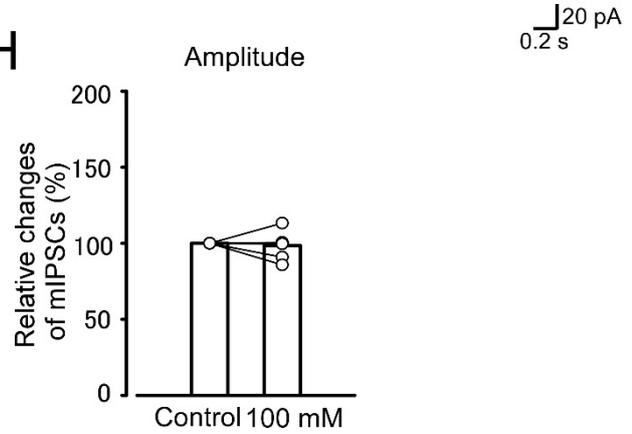
F**G****H**

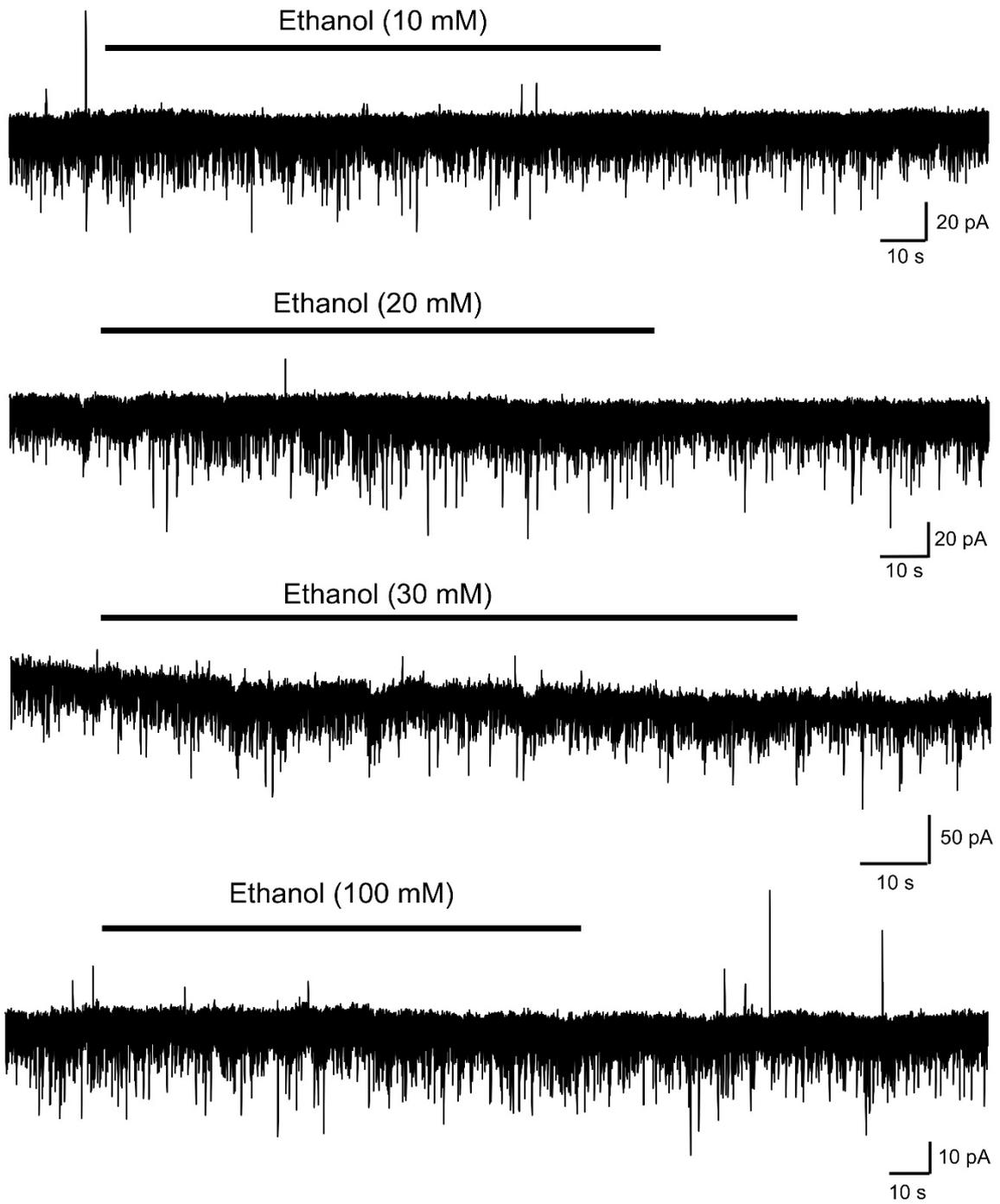
Figure 3. 高濃度エタノールの急性適用による mIPSCs に対する影響

- (A) SG 領域の神経細胞において、保持電位 0 mV にて、TTX (1 μ M)存在下で認められる mIPSCs に対して、中濃度エタノール (30 mM) を急性適用した際の反応の典型例。下図は、時間軸を拡大させ、エタノールの急性適用前後での波形の変化を比較した図を示す。
- (B, C) SG 領域の神経細胞における mIPSC の発生頻度の間隔と振幅をエタノール急性適用前後で比較した図。エタノールの急性適用では、神経活動間隔と振幅のいずれに対しても変化は認められなかった。(Inter event interval; $p = 0.56$ 、振幅; $p = 0.35$)
- (D, E) 中濃度エタノール(30 mM)を急性適用した時の、mIPSCs の頻度と振幅の相対的変化をエタノールの急性適用前を 100%とした時の変化割合($n = 7$)。
- (F) SG 領域の神経細胞において、保持電位 0 mV にて、TTX (1 μ M)存在下で認められる mIPSCs に対して、高濃度エタノール (100 mM) を急性適用した際の反応の典型例。下図は、時間軸を拡大させ、エタノールの急性適用前後での波形の変化を比較した図を示す。
- (G, H) 高濃度エタノール(100 mM)を急性適用した時の、mIPSCs の頻度と振幅の相対的変化をエタノールの急性適用前を 100%とした時の変化割合 ($n = 6$)。

3.2 エタノールは SG 領域の神経細胞における興奮性シナプス伝達に影響与えない

SG 領域の神経細胞で見られる sEPSC は、3 種類の異なる濃度のエタノールを適用した際のシナプス伝達への影響を観察した（低濃度、中濃度、高濃度; 10 mM、20–50 mM、100 mM）。SG 領域の神経細胞から自発的な sEPSCs が記録することができ、その頻度と振幅がそれぞれ、 9.2 ± 2.4 Hz および 23.7 ± 5.9 pA ($n = 14$)であった(Fig. 4)。低濃度のエタノール適用では、sEPSCs の頻度と振幅に有意な影響は見られなかった (frequency, $104.7 \pm 19.5\%$ of control; amplitude, $100.2 \pm 5.8\%$ of control; $n = 7$)。一方、Fig. 4B で示すように中濃度のエタノール適用では、一部の細胞において sIPSCs の顕著な増加が認められた。中濃度のエタノール適用により頻度が 150%以上増加した sIPSCs の頻度と振幅はコントロールと比較するとそれぞれ $159.2 \pm 5.1\%$ および $108.5 \pm 6.1\%$ ($n = 3$)であった。一方、頻度が 150%以上変化しなかったものの頻度と振幅はコントロールと比較するとそれぞれ $97.4 \pm 5.6\%$ および $95.5 \pm 6.0\%$ ($n = 12$)であった。高濃度のエタノール適用では、頻度が 150%以上増加した sIPSCs の頻度と振幅はコントロールと比較するとそれぞれ $221.0 \pm 35.8\%$ および $100.7 \pm 16.5\%$ ($n = 2$)であった。一方、頻度が 150%以上変化しなかった IPSCs の頻度と振幅はコントロールと比較するとそれぞれ $109.2 \pm 16.0\%$ および $92.1 \pm 7.3\%$ ($n = 7$)であった (Fig. 4C, D)。

A



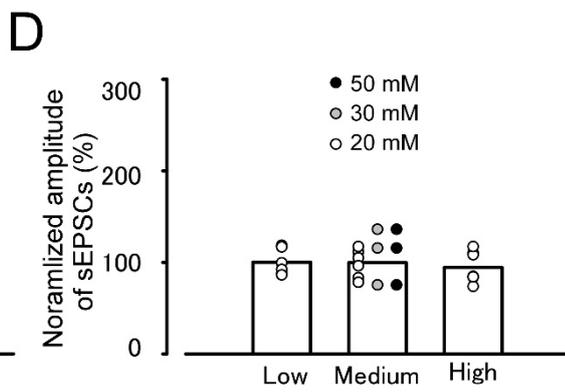
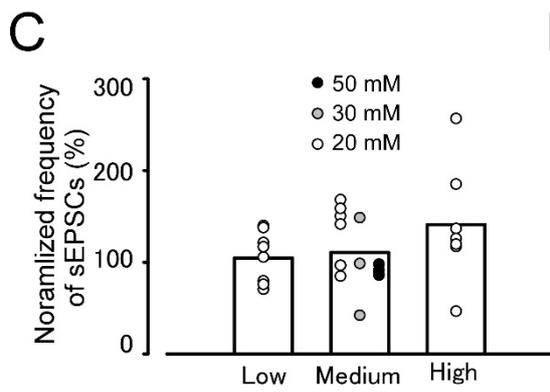
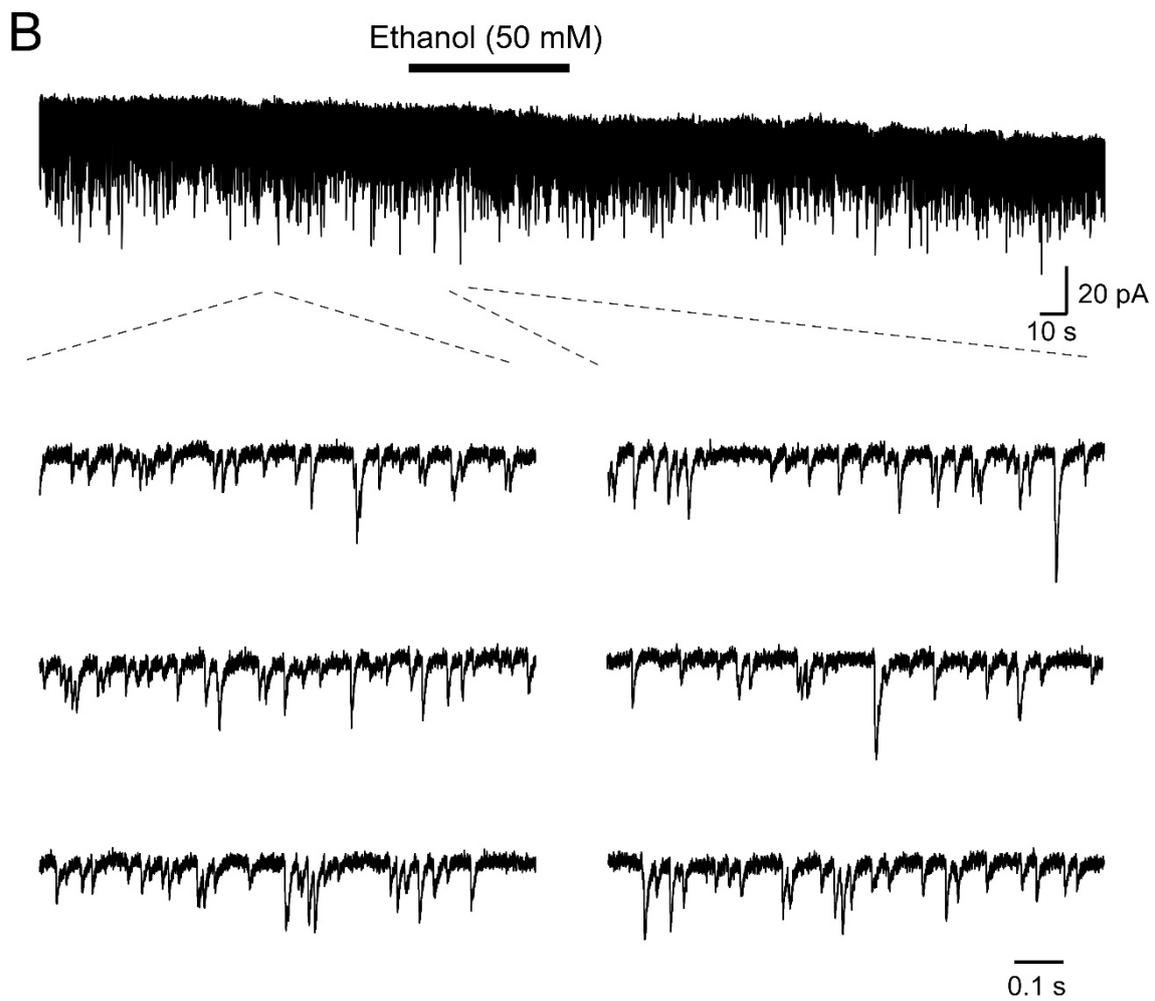


Figure 4. エタノールは、sEPSCs に対して有意な影響を与えなかった

(A) SG 領域の神経細胞において、保持電位-70 mV で自発性 EPSCs を記録し、エタノールを 10 mM、20 mM、30 mM、100 mM と急性適用させた時の反応例。

(B) SG 領域の神経細胞において、保持電位-70 mV で、中濃度エタノール (50 mM) を急性適用した時の反応の典型例。下図は、時間軸を拡大させ、エタノールの急性適用前後での波形変化を示す。

(C, D) 各濃度における神経細胞の自発性 EPSCs の頻度、振幅についてエタノール適用前を 100%とした場合での変化率(低濃度: n = 7、中濃度: n = 15、高濃度: n = 9)。

3.3 エタノールは VGAT-Venus 陽性細胞の発火を促進させた

これまでの結果より、エタノールが抑制性シナプス伝達を増強することが示された。また、その効果が TTX 存在下で見られなかったことから、エタノールによる抑制性シナプス伝達増強反応の要因が、活動電位由来であると示唆される。そこで、VGAT-Venus ラットを用いて、GABA 作動性神経細胞におけるエタノールによる活動電位の変化を検討した。Fig. 5A および B は IR-DIC 顕微鏡を用いたパッチクランプ法での典型的な実験例を示す。電流固定法により、VGAT-Venus 陽性細胞から自発発火を記録すると、発火頻度は 0.7 ± 0.4 Hz ($n = 7$) であった。また、中濃度エタノールの急性灌流適用により自発発火が増加する細胞が存在した。中濃度エタノールの急性適用による発火頻度はコントロールと比較して、 $308.8 \pm 132.8\%$ ($p < 0.05, n = 7$) であった。電気生理学的性質（発火頻度、input resistance）の解析を行ったが、エタノール還流投与前後で、変化は観察されなかった（誘発された発火頻度 control, 21.3 ± 4.8 Hz; ethanol, 21.6 ± 5.0 Hz; $p > 0.05, n = 7$ 、input resistance, control, 0.8 ± 0.2 M Ω ; ethanol, 0.7 ± 0.2 M Ω ; $p > 0.05, n = 7$)。これらの結果より、エタノールは自発発火を示す脊髄 GABA 作動性神経細胞の発火頻度を上昇させることが示された。

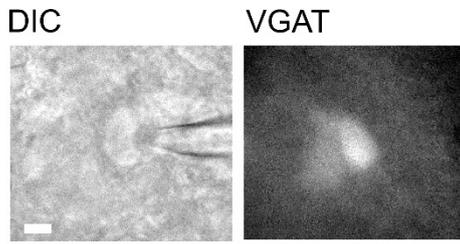
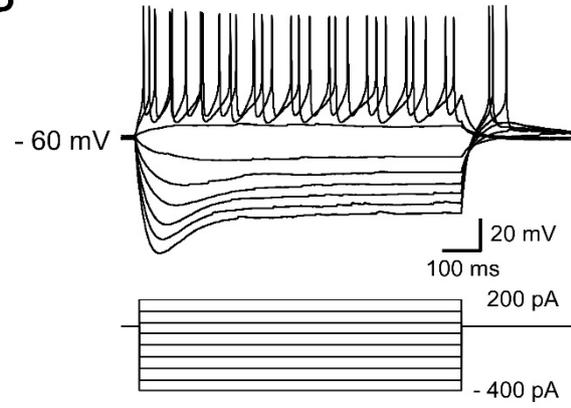
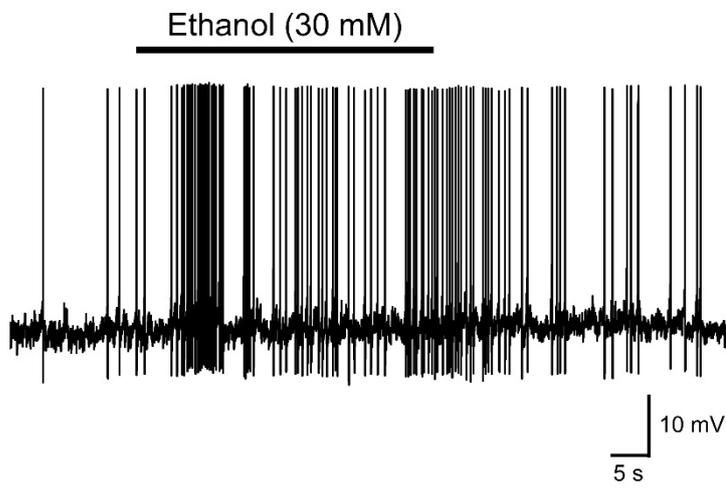
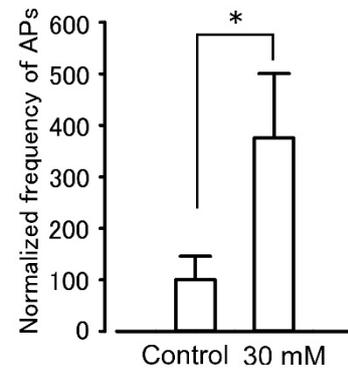
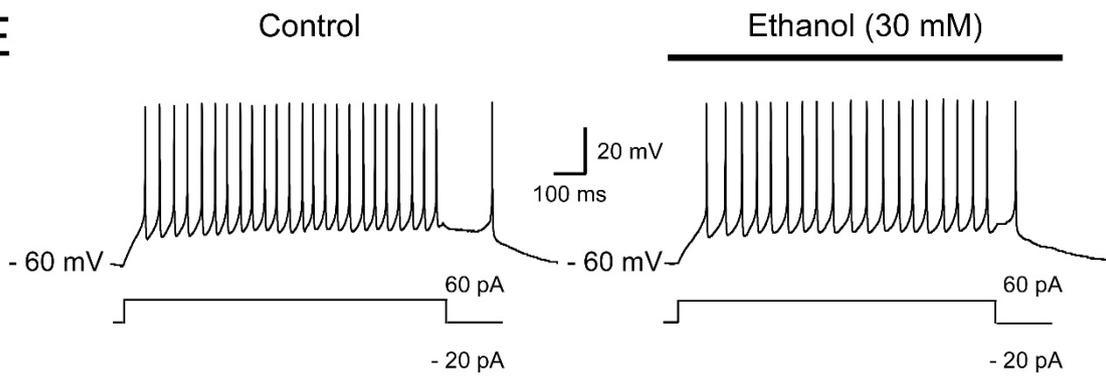
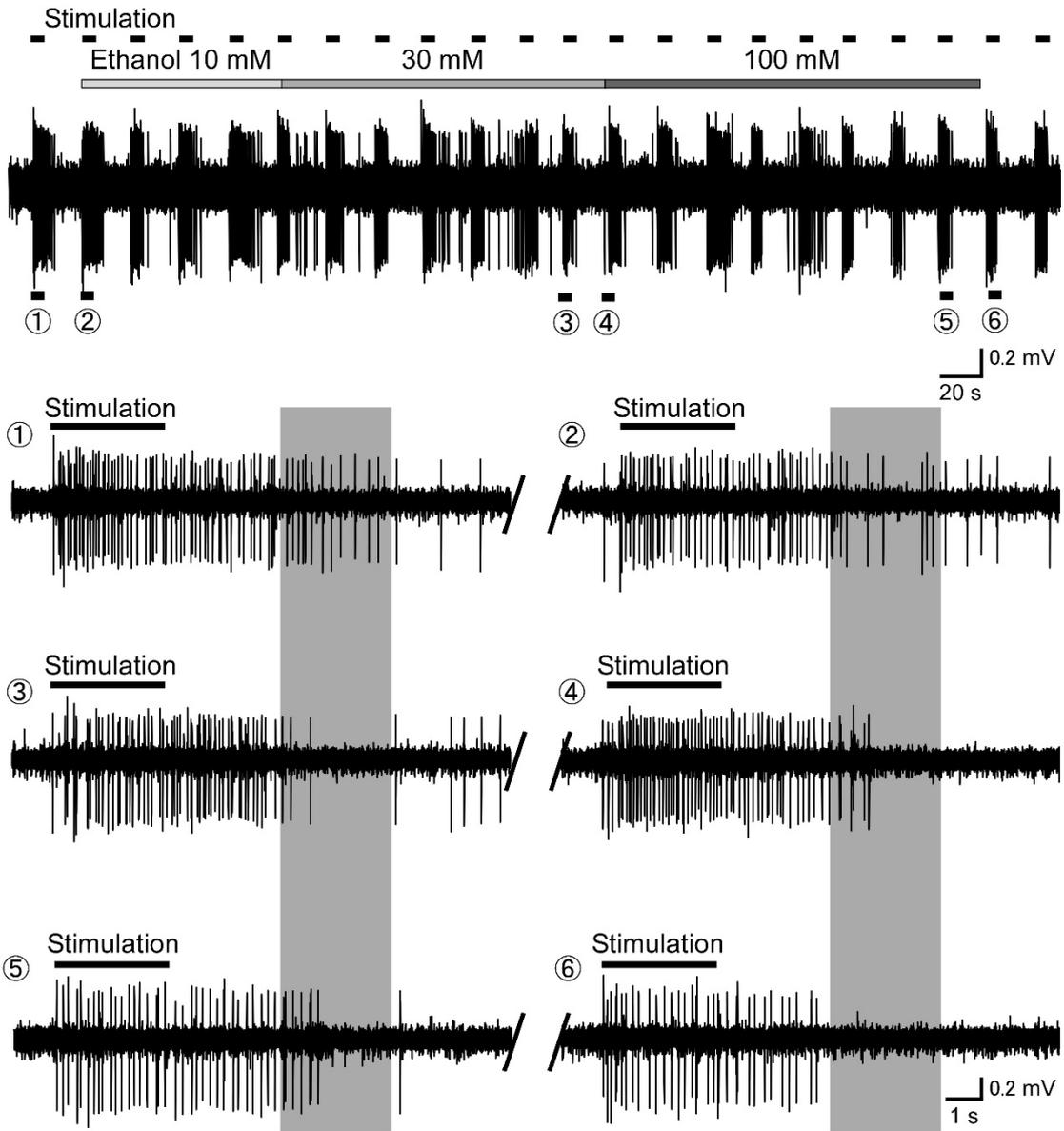
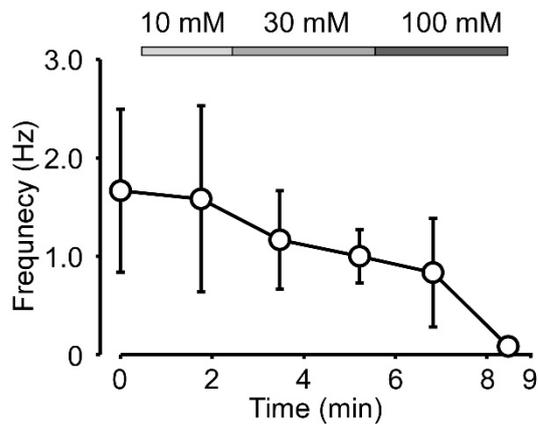
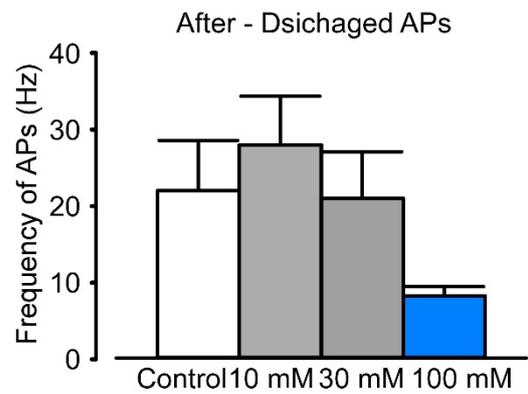
A**B****C****D****E**

Figure 5. エタノールは、VGAT - Venus 陽性細胞の活動電位の頻度を増加させた

- (A) IR-DIC 顕微鏡下により脊髄後角細胞に対しガラス電極を接近させている像と（左図） Venus 蛍光を観察している像（右図）。
- (B) Venus 陽性細胞に対して、電極から電流注入により膜電位を変化させた時の膜電位変化。
- (C) Venus 陽性細胞の自発性発火に対する中濃度エタノール (30 mM)の急性適用による代表的な反応例。
- (D) 自発性発火に対するエタノールの急性適用の影響をエタノール適用前の頻度を 100%としたときの変化率を示した結果 ($n = 7, *p < 0.05$)。
- (E) 電流注入法により活動電位を誘発した際のエタノールの急性適用前（左図）と適用後（右図）の代表例。脱分極により誘発された活動電位に対して、エタノールの急性灌流適用は有意な影響を与えなかった。

3.4 エタノールは機械刺激に対する WDR 神経細胞の応答を減弱させた

ここまでの実験から、エタノールが脊髄後角における GABA 作動性神経細胞を興奮させ、sIPSCs を増加させることが明らかになった。そこで、このエタノールによる抑制性神経細胞の興奮作用が感覚情報伝達に対し、どのような影響を与えるのか検討した。機械侵害受容刺激 (60 g の von Frey Filament を適用) によりラット後肢を刺激し WDR 神経を同定した。WDR 神経の同定はその感覚支配神経を応答性の有無により判別した。高濃度のエタノールを脊髄表面に灌流適用しても、侵害受容刺激中に見られる神経発火に抑制は認められなかったが、WDR 神経に特徴的な応答である侵害受容刺激後に見られる放電発火 (After-Discharged 発火) が減弱した。そこで、連続的にラット後肢に機械刺激を与え、エタノールの濃度を増加させ灌流適用させたところ、濃度依存的な After-Discharged 発火の抑制が観察された (Fig. 6A, B)。各濃度において、After - Discharged 発火の頻度をしたところ、高濃度エタノール(100 mM)で、発火頻度の減少が見られた(n=2)。そこで、他の細胞でも解析を行うと、高濃度エタノールは、After-Discharged 発火を有意に抑制し、刺激中断後 3 秒間および 3~6 秒間の After-Discharged 発火を抑制した(0-3 s, $76.0 \pm 4.2\%$ of control, n = 13; 3-6 s, $67.0 \pm 10.8\%$, n = 12; $p < 0.05$) (Fig. 6D)。さらに、After-Discharged 発火時間の短縮が見られた (control, 25.6 ± 4.6 s; ethanol, 14.6 ± 2.6 s, n = 5; $p < 0.05$)。

A**B****C**

D

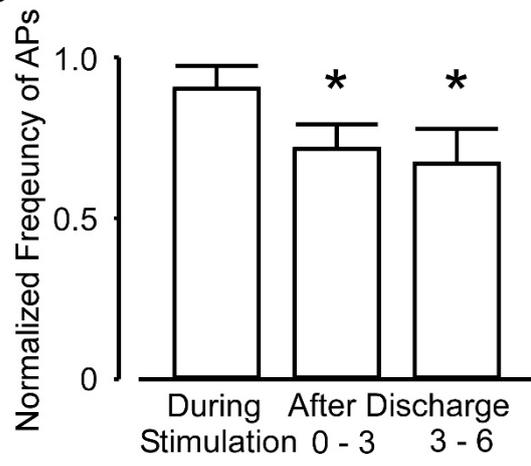


Figure 6. エタノールは *in vivo* での皮膚への侵害受容刺激による脊髄後角における痛覚伝達を抑制した

- (A) 機械刺激に対する脊髄後角の wide dynamic range (WDR)細胞の代表的な応答例。von Frey filament (60 g)による後肢に対する3秒間刺激を20秒間のインターバルごとに連続的に与えた際の脊髄後角 WDR 細胞の応答波形（上）。下図は、侵害受容刺激中と刺激後の WDR 神経細胞の応答を、各濃度のエタノールを灌流適用した際の波形を示す。灰色の網掛け部は、エタノールのより効果的に活動電位の発生が抑制された刺激後3~6秒の時間を示す。
- (B) (A)で示した細胞から得られた After discharged 発火に対するエタノールの灌流適用前後の変化を、機械刺激後3秒から6秒の間で、経時的に表した図。
- (C) 各エタノール濃度において、After – Discharged 発火の頻度を解析し、比較した図(n = 2)。
- (D) 侵害受容刺激による活動電位の頻度に対する高濃度エタノールの効果を、機械刺激中、刺激後0秒から3秒間、刺激後3秒から6秒間の時間に分けて解析した結果(n = 14)。

4. Discussion

4.1 本研究のまとめ

エタノールの急性適用による脳への影響は、これまでに多くの研究が行われている。本研究は、エタノールの急性適用による脊髄 SG 領域に存在する神経細胞のシナプス伝達に対する影響と、*in vivo* 標本を用いて機械刺激により誘発された神経応答に対する影響を初めて明らかにした。本研究の主要な発見は以下の3つである。1) 中濃度以上のエタノールは、GABA 作動性または Glycine 作動性のシナプス伝達を亢進し、SG 領域の神経細胞に対する抑制を増強させた。2) 中濃度エタノールは、VGAT-Venus 陽性細胞の活動電位の発生を増加させた。3) 高濃度エタノールは WDR 細胞の After-discharged 発火を抑制した。これらの結果から、エタノールによる鎮痛作用は、脊髄における感覚伝達において、抑制性の介在神経の活性化を促すことによると示唆された。

4.2 エタノールの濃度依存的な SG 領域の介在性神経細胞への影響

エタノールの作用による酔いや行動変化は血中エタノール濃度と相関している^{2,39}。エタノールの血中濃度が 10 mM 程度までの低濃度であると、抗不安や陶酔感などの症状が認められる。また、15 mM まで血中濃度が増加すると、鎮静効果や軽度の運動障害などを示す。さらに 50 mM を超えると、強い鎮静効果と重篤な運動障害を引き起こし、認知機能障害も引き起こす。過去の動物による行動実験でも、人と同様なエタノール血中濃度で、鎮痛効果を含めた症状が実証されている^{6,8}。ラットへ 2 g/kg のエタノールを腹腔内投与した際には、エタノール血中濃度は 2 時間ほどで 20–30 mM 程度まで増加し、この濃度において熱刺激に対する反応潜時が延長された²⁶。

本研究においても、脊髄後角シナプス伝達においてエタノールの濃度依存的な抑制作用が認められた。中濃度である 20 mM のエタノールでは、行動試験では急性痛の抑制が報告

されており⁶、本研究の脊髓スライス標本を用いた実験でもエタノールの急性適用により抑制性シナプス伝達が亢進することが明らかになった。また、高濃度エタノールでは、動物行動試験で鎮静効果が著しく、運動障害や睡眠様行動が誘発され、鎮痛効果の評価が困難とされている²⁹。本研究の脊髓スライス標本を用いた検討により、SG領域の神経細胞において抑制性シナプス伝達の顕著に増加することが初めて明らかになった。

4.3 エタノールは脊髓における抑制性介在神経の興奮させる

エタノールは GABA_A 受容体を介する抑制性電流を増強することが示されている⁴。このシナプス後電流の増強は広い脳領域で観察されている^{5,17,35}。本研究においても、脊髓後角 SG 領域の神経細胞にみられる自発性 IPSCs の増強は確認されたが、TTX 存在下の mIPSCs に関しては影響 (mIPSCs の頻度、振幅などへの影響) が観察されなかった。このことより、脊髓後角において、エタノールは抑制性シナプスに対して影響を与えない可能性が示された。また、海馬などでは見られるエタノール急性適用による mIPSCs の時定数の増加作用も⁴、脊髓 SG 領域の神経細胞では観察されなかった (Fig. 1B 右上波形参照)。これらのことから、エタノールによる自発性 IPSCs の増強反応の成因として、脊髓における抑制性神経細胞の発火亢進作用による可能性が示された。

抑制性神経に特異的に Venus を発現する VGAT-Venus ラットにおける、Venus 陽性細胞へパッチクランプ記録を行うと、エタノールにより自発発火の増加が認められた。このエタノールによる発火誘発作用は、側坐核や小脳ゴルジ細胞でも観察されている^{10,15,24}。このエタノールによる抑制性シナプス伝達亢進は中枢神経系の広い領域で報告されているが、未だそのメカニズムについては不明である。これまでの報告で指摘されている最も有力な作用点に電位依存性または Ca²⁺依存性に活性化する BK channel がある。BK channel はエタノールが作用できるイオンチャネルの候補としてよく研究がされており、神経活動を興奮

または抑制することが知られている^{9,14,16}。しかし、脊髄後角の神経細胞における BK チャネルの発現量は非常に少なく本研究で見られたエタノールの作用において中心的な作用点としては考えにくい¹¹。別の候補の1つとして、G-protein-coupled inwardly rectifying K⁺ channel も挙げられている^{7,19}。さらに最近の報告では、プロテインキナーゼ C 欠損マウスにおいて、エタノールによる GABA 放出増加作用が阻害されることも報告されている^{36,38}。これらの結果からエタノールの作用点の候補として細胞内情報伝達分子も考えられる。エタノールがどのように介在神経の活動性を亢進するかについては、さらなる研究が必要である。

4.4 エタノールによる WDR 神経細胞での侵害受容性機械刺激誘発 After-discharged 発火の抑制作用

エタノールが痛覚情報伝達を抑制するか明らかにするため、*in vivo* 標本による感覚応答の抑制作用を電気生理学的に検討した。中濃度から高濃度のエタノールを脊髄後角表面に直接灌流適用すると、機械刺激により誘発された WDR 細胞特有の After-discharged 発火が有意に抑制されたことから、エタノールは脊髄において鎮痛作用を示すことが明らかになった。また、脊髄スライスの結果から、エタノールにより活動電位誘発性の自発性 IPSCsのうち、振幅の大きな応答が誘発されることが明らかになった。このシナプス後の抑制反応は、抑制性のシナプス後電位の発生や興奮性電位の抑制により、脊髄における痛覚伝達を調節している^{33,51}。WDR 神経細胞における機械刺激誘発応答による発火は、抑制性シナプス伝達により減弱することが示されている^{20,28}。つまり、エタノールによる脊髄における抑制性介在神経の興奮による自発性 IPSCs 頻度の増加は、WDR 神経の After-Discharge 発火を抑制している可能性が高い。しかし、機械刺激中の WDR 神経の神経の発火はエタノールによ

り抑制されなかったことから、エタノールには痛覚伝達の強い抑制作用はないことが考えられる。

エタノールによる抑制が After-discharged 発火のみに認められ、機械刺激中の神経発火においては認められなかった理由として、これら生理応答の発生機構における違いが考えられる。機械刺激中の WDR 細胞は、A δ 線維などの感覚神経からの直接入力や、SG 神経細胞を介した間接的な入力による情報伝達を受けている^{18,32,50}。効率的な EPSP の抑制のためには単発的な IPSP では不十分である²²。本研究でのエタノール存在下における自発性 IPSCs の inter-event-interval の数値は 83.0 ± 3.4 ms であり、過去の報告では、C 繊維に由来する遅延性の痛覚伝達により引き起こされる興奮性シナプス伝達の半減時間が、40 ms 以下である。これらより、エタノールによる自発性 IPSCs では、機械刺激中に見られる EPSP に対する抑制作用を示すには十分な頻度でなかったと考えられる。After-discharged 発火は WDR 細胞の自発的発火によるプラトー電位と呼ばれる誘発電位により発生することから³¹、エタノールにより誘発される自発性 IPSCs により After-discharged 発火が選択的に抑制されたと推察される。これらの結果から、エタノールの鎮痛効果は、急性の鋭い痛みを消し去ってしまうものではなく、その痛みの後に引き続き感じられる持続的な痛みを抑える作用があると考えられる。

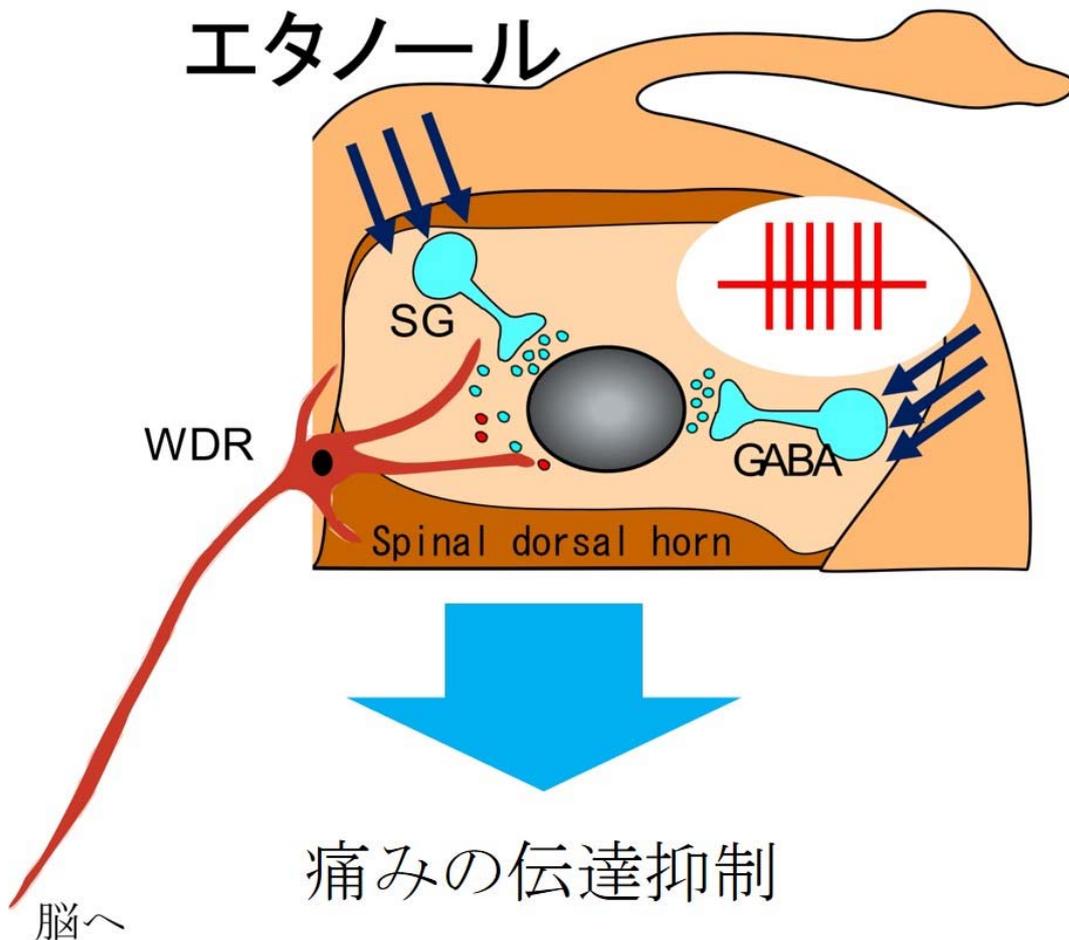
4.5 本研究の生理学的意義

慢性的なエタノールの摂取により、エタノール性末梢神経障害性疼痛を発症することが知られている³⁰。その発症機構は脊髄後根節などの末梢神経系の伝達異常に由来すると考えられている。このため、重症患者では、末梢神経系の伝達異常による感覚情報の亢進が起これ、難治性の症状を呈する。本研究で明らかになった、急性期でのエタノールによる中枢神経系の変化が重度のエタノール性神経障害性疼痛患者でどの

程度引き起こされているかは不明であるが、その症状の緩解や治療ターゲットとして本研究が一助となることを期待する。

5. Summary

本研究で、エタノールは、脊髄後角の SG 領域細胞に存在する抑制性細胞において、活動性を増加させ、WDR を介する痛みの情報伝達を抑制することが明らかになった。



6. Acknowledgement

本研究の遂行とそれに対する指針を頂いた糸和彦教授ならびに、大澤匡弘准教授には御礼申し上げます。また、実験遂行に関して、尽力して頂いた兵庫医科大学の古江秀昌教授に御礼申し上げます。

論文作成において、ロンドン大学の A. E. Pickering 教授、生理学研究所井本敬二教授から貴重のご意見をいただきました。御礼申し上げます。生理学研究所の川口泰雄教授と群馬大学大学院医学研究科の柳川右千夫教授から VGAT-Venus ラットの提供を受けました。

学位審査において、主査を務めて頂いた山村寿男教授に御礼申し上げます。

副査を務めていただいた、服部光治教授に御礼申し上げます。

副査を務めていただいた、田中正彦准教授に御礼申し上げます。

7. References

- 1 Abernathy, K., Chandler, L. J. & Woodward, J. J. Alcohol and the prefrontal cortex. *Int Rev Neurobiol* **91**, 289-320, doi:10.1016/s0074-7742(10)91009-x (2010).
- 2 Abrahao, K. P., Chancey, J. H., Chan, C. S. & Lovinger, D. M. Ethanol-Sensitive Pacemaker Neurons in the Mouse External Globus Pallidus. *Neuropsychopharmacology* **42**, 1070-1081, doi:10.1038/npp.2016.251 (2017).
- 3 Abrahao, K. P., Salinas, A. G. & Lovinger, D. M. Alcohol and the Brain: Neuronal Molecular Targets, Synapses, and Circuits. *Neuron* **96**, 1223-1238, doi:10.1016/j.neuron.2017.10.032 (2017).
- 4 Aguayo, L. G. & Pancetti, F. C. Ethanol modulation of the gamma-aminobutyric acidA- and glycine-activated Cl⁻ current in cultured mouse neurons. *J Pharmacol Exp Ther* **270**, 61-69 (1994).
- 5 Ariwodola, O. J. *et al.* Ethanol modulation of excitatory and inhibitory synaptic transmission in rat and monkey dentate granule neurons. *Alcohol Clin Exp Res* **27**, 1632-1639, doi:10.1097/01.alc.0000089956.43262.17 (2003).
- 6 Bass, M. B., Friedman, H. J. & Lester, D. Antagonism of naloxone hyperalgesia by ethanol. *Life Sci* **22**, 1939-1946 (1978).
- 7 Bodhinathan, K. & Slesinger, P. A. Molecular mechanism underlying ethanol activation of G-protein-gated inwardly rectifying potassium channels. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**, 18309-18314, doi:10.1073/pnas.1311406110 (2013).
- 8 Brick, J., Sun, J. Y., Davis, L. & Pohorecky, L. A. Ethanol and the response to electric shock in rats. *Life Sci* **18**, 1293-1298 (1976).
- 9 Bukiya, A. N. *et al.* An alcohol-sensing site in the calcium- and voltage-gated, large conductance potassium (BK) channel. *Proc Natl Acad Sci U S A* **111**, 9313-9318, doi:10.1073/pnas.1317363111 (2014).
- 10 Carta, M., Mameli, M. & Valenzuela, C. F. Alcohol enhances GABAergic transmission to cerebellar granule cells via an increase in Golgi cell excitability. *J Neurosci* **24**, 3746-3751, doi:10.1523/jneurosci.0067-04.2004 (2004).
- 11 Chen, S. R., Cai, Y. Q. & Pan, H. L. Plasticity and emerging role of BKCa channels in nociceptive control in neuropathic pain. *J Neurochem* **110**, 352-362, doi:10.1111/j.1471-4159.2009.06138.x (2009).
- 12 Choi, S., Yamada, A., Kim, W., Kim, S. K. & Furue, H. Noradrenergic inhibition of spinal hyperexcitation elicited by cutaneous cold stimuli in rats with oxaliplatin-induced allodynia: electrophysiological and behavioral assessments. *J Physiol Sci* **67**, 431-438,

- doi:10.1007/s12576-016-0505-9 (2017).
- 13 Coull, J. A. *et al.* Trans-synaptic shift in anion gradient in spinal lamina I neurons as a mechanism of neuropathic pain. *Nature* **424**, 938-942, doi:10.1038/nature01868 (2003).
- 14 Davis, S. J., Scott, L. L., Hu, K. & Pierce-Shimomura, J. T. Conserved single residue in the BK potassium channel required for activation by alcohol and intoxication in *C. elegans*. *J Neurosci* **34**, 9562-9573, doi:10.1523/jneurosci.0838-14.2014 (2014).
- 15 Deehan, G. A., Jr. *et al.* Peripheral Administration of Ethanol Results in a Correlated Increase in Dopamine and Serotonin Within the Posterior Ventral Tegmental Area. *Alcohol Alcohol* **51**, 535-540, doi:10.1093/alcalc/agw037 (2016).
- 16 Dopico, A. M., Anantharam, V. & Treistman, S. N. Ethanol increases the activity of Ca⁽⁺⁺⁾-dependent K⁺ (mslo) channels: functional interaction with cytosolic Ca⁺⁺. *J Pharmacol Exp Ther* **284**, 258-268 (1998).
- 17 Eggers, E. D., O'Brien, J. A. & Berger, A. J. Developmental changes in the modulation of synaptic glycine receptors by ethanol. *J Neurophysiol* **84**, 2409-2416 (2000).
- 18 Furue, H., Narikawa, K., Kumamoto, E. & Yoshimura, M. Responsiveness of rat substantia gelatinosa neurones to mechanical but not thermal stimuli revealed by in vivo patch-clamp recording. *J Physiol* **521 Pt 2**, 529-535 (1999).
- 19 Glaaser, I. W. & Slesinger, P. A. Dual activation of neuronal G protein-gated inwardly rectifying potassium (GIRK) channels by cholesterol and alcohol. *Sci Rep* **7**, 4592, doi:10.1038/s41598-017-04681-x (2017).
- 20 Gwak, Y. S. *et al.* Activation of spinal GABA receptors attenuates chronic central neuropathic pain after spinal cord injury. *J Neurotrauma* **23**, 1111-1124, doi:10.1089/neu.2006.23.1111 (2006).
- 21 Harrison, N. L. *et al.* Effects of acute alcohol on excitability in the CNS. *Neuropharmacology* **122**, 36-45, doi:10.1016/j.neuropharm.2017.04.007 (2017).
- 22 Hausser, M. & Clark, B. A. Tonic synaptic inhibition modulates neuronal output pattern and spatiotemporal synaptic integration. *Neuron* **19**, 665-678 (1997).
- 23 Ito, A. & Yoshimura, M. Mechanisms of the analgesic effect of calcitonin on chronic pain by alteration of receptor or channel expression. *Mol Pain* **13**, 1744806917720316, doi:10.1177/1744806917720316 (2017).
- 24 Koyama, S., Brodie, M. S. & Appel, S. B. Ethanol inhibition of m-current and ethanol-induced direct excitation of ventral tegmental area dopamine neurons. *J Neurophysiol* **97**, 1977-1985, doi:10.1152/jn.00270.2006 (2007).
- 25 Light, A. R. & Perl, E. R. Spinal termination of functionally identified primary afferent

- neurons with slowly conducting myelinated fibers. *J Comp Neurol* **186**, 133-150, doi:10.1002/cne.901860203 (1979).
- 26 Livy, D. J., Parnell, S. E. & West, J. R. Blood ethanol concentration profiles: a comparison between rats and mice. *Alcohol* **29**, 165-171 (2003).
- 27 Lovinger, D. M., White, G. & Weight, F. F. NMDA receptor-mediated synaptic excitation selectively inhibited by ethanol in hippocampal slice from adult rat. *J Neurosci* **10**, 1372-1379 (1990).
- 28 Medrano, M. C., Dhanasobhon, D., Yalcin, I., Schlichter, R. & Cordero-Erausquin, M. Loss of inhibitory tone on spinal cord dorsal horn spontaneously and nonspontaneously active neurons in a mouse model of neuropathic pain. *Pain* **157**, 1432-1442, doi:10.1097/j.pain.0000000000000538 (2016).
- 29 Mendelson, W. B. & Hill, S. Y. Effects of the acute administration of ethanol on the sleep of the rat: a dose-response study. *Pharmacol Biochem Behav* **8**, 723-726 (1978).
- 30 Miyoshi, K., Narita, M., Narita, M. & Suzuki, T. Involvement of mGluR5 in the ethanol-induced neuropathic pain-like state in the rat. *Neurosci Lett* **410**, 105-109, doi:10.1016/j.neulet.2006.08.083 (2006).
- 31 Morisset, V. & Nagy, F. Nociceptive integration in the rat spinal cord: role of non-linear membrane properties of deep dorsal horn neurons. *Eur J Neurosci* **10**, 3642-3652 (1998).
- 32 Nakatsuka, T., Furue, H., Yoshimura, M. & Gu, J. G. Activation of central terminal vanilloid receptor-1 receptors and alpha beta-methylene-ATP-sensitive P2X receptors reveals a converged synaptic activity onto the deep dorsal horn neurons of the spinal cord. *J Neurosci* **22**, 1228-1237 (2002).
- 33 Narikawa, K., Furue, H., Kumamoto, E. & Yoshimura, M. In vivo patch-clamp analysis of IPSCs evoked in rat substantia gelatinosa neurons by cutaneous mechanical stimulation. *J Neurophysiol* **84**, 2171-2174 (2000).
- 34 Nestoros, J. N. Ethanol specifically potentiates GABA-mediated neurotransmission in feline cerebral cortex. *Science* **209**, 708-710 (1980).
- 35 Nie, Z. *et al.* Ethanol augments GABAergic transmission in the central amygdala via CRF1 receptors. *Science* **303**, 1512-1514, doi:10.1126/science.1092550 (2004).
- 36 Pany, S. & Das, J. Alcohol binding in the C1 (C1A+C1B) domain of protein kinase C epsilon. *Biochim Biophys Acta* **1850**, 2368-2376, doi:10.1016/j.bbagen.2015.07.005 (2015).
- 37 Roberto, M., Madamba, S. G., Moore, S. D., Tallent, M. K. & Siggins, G. R. Ethanol

- increases GABAergic transmission at both pre- and postsynaptic sites in rat central amygdala neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 2053-2058, doi:10.1073/pnas.0437926100 (2003).
- 38 Ron, D. & Barak, S. Molecular mechanisms underlying alcohol-drinking behaviours. *Nat Rev Neurosci* **17**, 576-591, doi:10.1038/nrn.2016.85 (2016).
- 39 Schechter, M. D. Ability of 3-carboxysalsolinol to produce ethanol-like discrimination in rats. *Psychopharmacology (Berl)* **68**, 277-281 (1980).
- 40 Smith, S. S. & Gong, Q. H. Ethanol effects on GABA-gated current in a model of increased $\alpha 4\beta 2\delta$ GABA_A receptor expression depend on time course and preexposure to low concentrations of the drug. *Alcohol* **41**, 223-231, doi:10.1016/j.alcohol.2007.04.007 (2007).
- 41 Todd, A. J. Neuronal circuitry for pain processing in the dorsal horn. *Nat Rev Neurosci* **11**, 823-836, doi:10.1038/nrn2947 (2010).
- 42 Uematsu, M. *et al.* Quantitative chemical composition of cortical GABAergic neurons revealed in transgenic venus-expressing rats. *Cereb Cortex* **18**, 315-330, doi:10.1093/cercor/bhm056 (2008).
- 43 Ueta, Y., Otsuka, T., Morishima, M., Ushimaru, M. & Kawaguchi, Y. Multiple layer 5 pyramidal cell subtypes relay cortical feedback from secondary to primary motor areas in rats. *Cereb Cortex* **24**, 2362-2376, doi:10.1093/cercor/bht088 (2014).
- 44 Uta, D. *et al.* TRPA1-expressing primary afferents synapse with a morphologically identified subclass of substantia gelatinosa neurons in the adult rat spinal cord. *Eur J Neurosci* **31**, 1960-1973, doi:10.1111/j.1460-9568.2010.07255.x (2010).
- 45 Weitlauf, C. & Woodward, J. J. Ethanol selectively attenuates NMDAR-mediated synaptic transmission in the prefrontal cortex. *Alcohol Clin Exp Res* **32**, 690-698, doi:10.1111/j.1530-0277.2008.00625.x (2008).
- 46 Woodward, J. J. & Pava, M. Ethanol inhibition of up-states in prefrontal cortical neurons expressing the genetically encoded calcium indicator GCaMP3. *Alcohol Clin Exp Res* **36**, 780-787, doi:10.1111/j.1530-0277.2011.01674.x (2012).
- 47 Yamamoto, S., Honda, M., Tanabe, M. & Ono, H. Spinal ventral root after-discharges as a pain index: involvement of NK-1 and NMDA receptors. *Brain Res* **1082**, 115-123, doi:10.1016/j.brainres.2006.01.097 (2006).
- 48 Yamamoto, S., Ohsawa, M. & Ono, H. Contribution of TRPV1 receptor-expressing fibers to spinal ventral root after-discharges and mechanical hyperalgesia in a spared nerve injury (SNI) rat model. *J Pharmacol Sci* **121**, 9-16 (2013).

- 49 Yoshimura, M. & Jessell, T. Amino acid-mediated EPSPs at primary afferent synapses with substantia gelatinosa neurones in the rat spinal cord. *J Physiol***430**, 315-335 (1990).
- 50 Yoshimura, M. & Jessell, T. M. Primary afferent-evoked synaptic responses and slow potential generation in rat substantia gelatinosa neurons in vitro. *J Neurophysiol***62**, 96-108 (1989).
- 51 Yoshimura, M. & Nishi, S. Primary afferent-evoked glycine- and GABA-mediated IPSPs in substantia gelatinosa neurones in the rat spinal cord in vitro. *J Physiol***482 (Pt 1)**, 29-38 (1995).
- 52 Ziskind-Conhaim, L., Gao, B. X. & Hinckley, C. Ethanol dual modulatory actions on spontaneous postsynaptic currents in spinal motoneurons. *J Neurophysiol***89**, 806-813, doi:10.1152/jn.00614.2002 (2003).