

Thesis

酸化型ガレクチン-1による神経因性疼痛の抑制 ー ラット坐骨神経切断モデルを用いた検討 ー

埼玉医科大学総合医療センター麻酔科

(指導：宮尾 秀樹教授)

会田 由紀男

神経因性疼痛は末梢神経あるいは中枢神経の機能異常により生じる機能的疼痛である。その発症メカニズムは複雑で治療に難渋することもあり、今回我々はラットを用いて坐骨神経切断モデルを作製し、その坐骨神経切断部に末梢神経再生促進因子である酸化型ガレクチン-1を $0.84\mu\text{g}$ 、単回直接投与した。そして末梢神経傷害後の神経再生と神経因性疼痛の発症抑制の関連および酸化型ガレクチン-1の神経因性疼痛治療としての可能性について検討した。

坐骨神経を切断して酸化型ガレクチン-1を投与した14日後に、自傷行動を判定した。また後根神経節を含む坐骨神経およびその入力相当レベルの脊髄を摘出して、抗サブスタンスP受容体(NK1R)抗体を用いたウェスタンブロット解析と、抗サブスタンスP抗体、抗NK1R抗体、抗P0(末梢神経ミエリン糖蛋白)抗体を用いた免疫組織化学染色を行った。

酸化型ガレクチン-1投与により自傷行動スコアは有意な低下を示し、さらに坐骨神経切断端の神経線維の伸長促進、抗P0抗体の発現の増加、後根神経節での小型細胞の維持、サブスタンスPの発現の増加、脊髄でのサブスタンスPの発現の増加とNK1Rの発現の減少が認められた。以上のことから酸化型ガレクチン-1が末梢神経切断後に後根神経節の小型細胞の維持を介して神経因性疼痛の発症を抑制する可能性が示唆された。

Keywords: 神経因性疼痛, 酸化型ガレクチン-1, サブスタンスP, サブスタンスP受容体(NK1R), 坐骨神経切断モデル

緒言

神経因性疼痛は侵害刺激を起こす組織損傷がなくとも、末梢神経系や中枢神経系の器質的あるいは機能異常の結果として生じる機能的難治性疼痛で、臨床的には帯状疱疹後神経痛、三叉神経痛、幻肢痛などが良く知られている。また動物モデルにおいても坐骨神経切断モデルラットで患肢の爪や趾を噛み、傷つける自傷行動を認めることが知られている。これは坐骨神経切断後に患肢に生じた疼痛あるいは異常知覚に対する反応でヒトの神経因性疼痛に相応すると考えられている¹⁾。神経因性疼痛の発症には痛覚に関わる種々のメカニズムが複雑に絡み合っていると考えられるが、末梢におけるサブスタンスP(SP)やcalcitonin gene-related peptide (CGRP)などの神経ペプチドや脊髄後

角で起こるシナプスの構造的変化すなわち神経再構築が強く関与しているといわれている^{2,3)}。SPは後根神経節(dorsal root ganglion: DRG)の小型細胞で産生され脊髄後角に運ばれるが、末梢神経切断後には脊髄後角のSPの発現量は減少しシナプス後細胞ではSP受容体であるNK1Rの発現が増加する^{2,3)}。また脊髄後角の表層に存在するNK1Rを、選択的な細胞毒であるSP-サポリンを用いて不活化すると神経因性疼痛の発症が抑制され、また発症後でも治療効果を示したという報告もある^{4,5)}。このことはNK1Rを発現している脊髄の神経細胞が神経因性疼痛の発症と継続に何らかの役割を果たしていることを示唆している。

末梢神経が切断されると脊髄後角I層、II層に終わり痛覚を伝えるC線維が萎縮、消失し、本来III層、IV層に終わり触覚を伝えるA β 線維がI層、II層に進入し後角ニューロンとシナプスを形成、いわゆるA β

線維のC線維化が起こるようになる。この結果正常では痛みを引き起こさない軽微な触覚刺激により痛みを生じるようになると考えられており、神経因性疼痛発症の理論的根拠となっている^{2,3,6)}。神経成長因子(NGF)を投与してDRGの小型神経細胞を維持することによりこれらの変化を阻止できることがラットを用いた実験で確認されており^{2,7,8)}、神経再構築は中枢側へのNGFの供給が途絶してDRGの神経細胞が死滅することがその一因とされている^{2,9)}。

神経因性疼痛に対しては各種の鎮痛薬、神経ブロックなどの対症療法が主に行われてきたが多彩な症状と複雑な発症メカニズム、また心理的要因もありその治療には難渋することが多い。しかしその原因療法はやはり傷害された神経の修復とそれに伴う機能回復であると考えられる。NGFによりラットの坐骨神経の再生が促進されたという報告¹⁰⁾もあるが、胎生期ラットのDRGの神経細胞の生存維持と神経突起伸展にはNGFは必須で高い活性を示すのに対して成熟後は必須ではなく¹¹⁻¹³⁾、さらにNGFには突起伸展作用はあるが生存維持作用はないことも現在では明らかになっている^{11,14)}。

傷害された神経を修復、再生する役割を担う物質として、最近、堀江らにより報告された酸化型ガレクチン-1が注目されている^{15,16)}。堀江らはミドリザル腎由来の株細胞であるCOS1細胞の培養上清に末梢神経の再生促進活性を見だし、ここから酸化型ガレクチン-1が同定された¹⁶⁾。ガレクチン-1は β -ガラクトシドに特異的に結合する動物レクチンであるガレクチンファミリーの一種であり、還元型では細胞の接着、増殖などに関与するといわれている^{17,18)}。このガレクチン-1の酸化型が生体内で損傷後軸索再生の初期過程において重要な役割を果たしていることが明らかになった^{16,19)}。

本研究では坐骨神経切断モデルラットに酸化型ガレクチン-1を投与して、自傷行動の評価、また脊髄、DRGにおけるSP、NK1Rの発現の解析を行い、末梢神経の修復、再生による神経因性疼痛治療の可能性について検討した。

対象と方法

1. 坐骨神経切断モデルと酸化型ガレクチン-1投与

本実験のすべての実験動物の取り扱いには埼玉医科大学動物実験指針に基づいて行われた。

生後10~12週の200~250gのSprague-Dawley系雄性ラット(埼玉実験動物供給所、埼玉)32匹をペントバルビタール腹腔内投与(40 mg/kg)によって麻酔した後、右側大腿中央部を切開して坐骨神経を露出、三枝分岐中央側を切離した。再結合を避けるため切断神経末梢側を5 mm切除し、0.84 μ gの酸化型ガレクチン-1を切断部に直接投与した後(酸化型ガレ

クチン-1投与群 n=19)、筋層および皮膚を縫合により閉創した。また対照群(n=13)には同量のリン酸緩衝液(PBS)を投与した。坐骨神経切断の14日後に右側大腿部を切開して坐骨神経の伸長を肉眼で観察し、抗P0(末梢神経ミエリン糖蛋白)抗体を用いた免疫組織化学染色を行い、酸化型ガレクチン-1投与群と対照群の神経再生の差について検討した。尚、酸化型ガレクチン-1はキリンビール株式会社医薬カンパニー生産技術センターの門屋利彦博士より供与されたものを使用した。

2. 自傷行動の評価

坐骨神経切断の14日後にWallらの方法¹⁾を用いて自傷行動の評価を行った。すなわち1趾以上の爪の咬傷は1点とし、末梢関節1趾の損傷につき各1点の追加、中枢関節1趾の損傷につき各1点を追加していった。この合計を自傷行動スコアとし、すべての趾の爪および趾関節の損傷があった場合の合計は11点となる。投与群と対照群の比較解析にはMann-WhitneyのU検定を用い、P値が0.05未満の場合を有意とした。

3. ウェスタンブロット解析

吉村らの方法²⁰⁾に若干の変更を加え、ウェスタンブロット解析を行った。坐骨神経切断の14日後に投与群(n=12)と対照群(n=9)それぞれから脊髄(L4)を摘出しサンプルバッファー²¹⁾にてホモジネイトした後、12,000 $\times$ gで10分間遠心して可溶性蛋白抗原を得た。抗原蛋白100 μ gに2-メルカプトエタノールを加え、99 $^{\circ}$ C、5分間の熱処理をした後90 mm $\times$ 73 mm $\times$ 1 mmの5-20%のポリアクリルアミドグラジエントゲル(パジェル[®]、アトー(株)、東京)で室温、20 mAの条件下にて約70分間電気泳動を行った。そしてニトロセルロースメンブレン(日本バイオラッド(株)、東京)にゲル中の蛋白を室温、125 mAの条件で90分間、転写した。5%スキムミルクと0.1% Tween 20を含むトリスバッファー(TBS-T)中で1時間メンブレンを振盪した。一次抗体として10,000倍希釈したウサギ抗NK1ポリクローナル抗体(CHEMICON, LA, USA)を4 $^{\circ}$ Cにて24時間反応させた後、TBS-Tで洗浄した。次に二次抗体として10,000倍希釈したペルオキシダーゼ標識ロバ抗ウサギIgG抗体(PIERCE, IL, USA)を室温にて1時間反応させ、TBS-Tで洗浄した。抗体の希釈は5%スキムミルクと0.1% Tween 20を含むTBS-Tで行った。スーパーシグナルフェムト(Pierce, IL, USA)を用いた化学発光法にて得た画像はPhotoshop 5.0(Adobe, CA, USA)で処理した。

4. 免疫組織化学染色

坐骨神経切断の14日後に投与群(n=7)と対照群

(n=4) から DRG, 脊髄, 坐骨神経を摘出し, 吉村らの方法に従って免疫組織化学染色を行った²⁰⁾.

ペントバルビタール腹腔内投与 (40 mg/kg) による麻酔下でラットの心臓を露出し左心室よりまず生理食塩水で灌流し, 続いて 4% パラホルムアルデヒドを含む PBS にて灌流固定を行った. DRG (L5), 脊髄 (L4) および坐骨神経末梢中枢側断端を取り出して 4% パラホルムアルデヒドにて一晩固定した後, 30% ショ糖液で置換した. OCT コンパンド (マイルス三共, 東京) で包埋し, クリオスタット (Leica, Nussloch, Germany) で 8 μ m 厚の凍結切片を作製した. 0.1% Triton X-100 と 5% 正常ヤギ血清 (バイオテスト研究所, 東京) を含む PBS で室温下で 30 分間ブロッキングした後, 一次抗体として DRG では 5,000 倍希釈したウサギ抗 SP 抗体 (CHEMICON, LA, USA), 脊髄では 100 倍希釈したウサギ抗 NK1 抗体 (CHEMICON, LA, USA), 坐骨神経では末梢神経ミエリンの主要な糖蛋白質である P0 に対するモノクローナル抗体 58A²²⁾ を用い 4℃ で 24 時間反応させた (前述). PBS で洗浄した後, 二次抗体として DRG と脊髄では 200 倍ペルオキシダーゼ標識ロバ抗マウス IgG 抗体 (PIERCE, IL, USA) を, 坐骨神経では 200 倍希釈した Alexa 488 標識ヤギ抗マウス IgG 抗体 (Molecular Probes, OR, USA) を用い, 室温で 1 時間反応させた. DAB キット (フナコシ, 東京) を用いた発色法で得た DRG と脊髄の染色像は, デジタルカメラを装備した顕微鏡 (ニコン, 東京) にて取り込み Photoshop 5.0 (Adobe, CA, USA) にて処理を行った. 蛍光染色法を用いた坐骨神経についても同様に処理をした.

結 果

1. 自傷行動の評価

自傷行動は投与群では 19 匹中 16 匹 (84.2%), 対照群では 13 匹中 12 匹 (92.3%) に出現した. 投与群における自傷行動スコアでは対照群と比較して有意に減少していた ($P=0.0041$) (Fig. 1).

2. 切断後坐骨神経の伸長の促進

対象としたモデルラットすなわち酸化型ガレクチン-1 投与群 19 匹および対照群 13 匹全てにおいて, 14 日後には坐骨神経中枢側切断端の神経線維の伸長が認められた. 対照群のうち 2 匹では投与群と同程度の伸長を示したが, それ以外では全て酸化型ガレクチン-1 を投与された場合の方がより伸長していた (Fig. 2a, b).

さらに抗 P0 抗体の反応性を指標にして坐骨神経線維の伸長を検討したところ, 酸化型ガレクチン-1 投与群ではその反応性は明らかに高く (Fig. 2c, d), 投与群の坐骨神経中枢側切断端でミエリン化線維が増加していることが確認された.

3. 脊髄における NK1R の発現の減少

酸化型ガレクチン-1 が坐骨神経切断後の疼痛に与える影響を, まず脊髄における NK1R の発現量を指標と

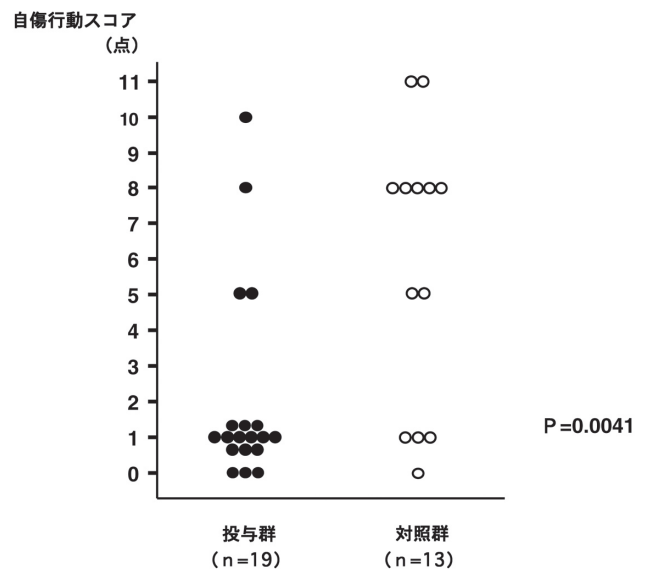


Fig. 1. 14 日後の自傷行動スコア. 酸化型ガレクチン-1 投与群は●, 対照群は○で示した. 自傷行動は投与群では 19 匹中 16 匹 (84.2%), 対照群では 13 匹中 12 匹 (92.3%) に出現した. 投与群における自傷行動スコアでは対照群と比較して有意に減少していた ($P=0.0041$).

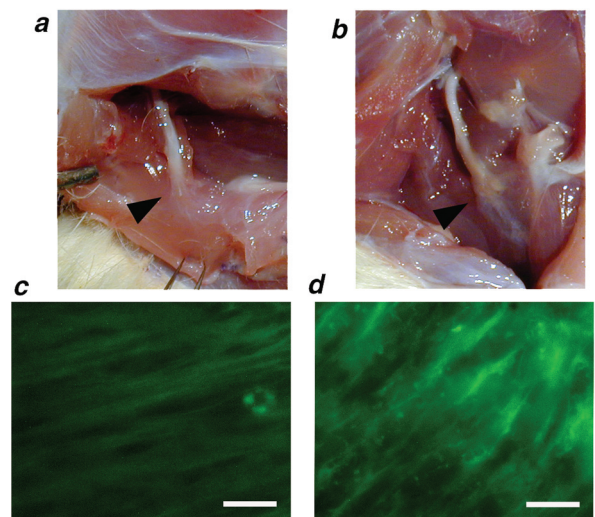


Fig. 2. 14 日後のラット坐骨神経中枢側切断端の伸長. a, b は坐骨神経中枢側切断端の肉眼像を示す. 酸化型ガレクチン-1 投与群 (b), 対照群 (a) を示す. 矢印 (▲) が示すように投与群 (b) は対照群 (a) に比べ坐骨神経切断端の伸長が認められる. c, d は抗 P0 抗体によるラット坐骨神経断端組織の蛍光染色像を示す. 酸化型ガレクチン-1 投与群の縦断面 (d) は対照群の縦断面 (c) に比べ, 抗 P0 抗体による強い免疫反応が認められる. scale bars 60 μ m

して検討した。ウェスタンブロット法では投与群と対照群とも 46 kD の位置にバンドが観察されたが、投与群では対照群と比較して低濃度であった (Fig. 3a, b)。次に免疫組織化学染色を行ったところ酸化型ガレクチン-1 投与群では脊髄表層の神経細胞における NK1R の発現が対照群と比較して低下していた (Fig. 3c, d)。またこの実験の再現性を確認するため上記の実験を 3 回繰り返し同様な結果を得た。

4. 脊髄と DRG における SP の発現の増加

脊髄では NK1R のアゴニストである SP の発現は、投与群では対照群と比較して高い傾向がみられた (Fig. 4a, b)。また投与群の DRG では小型細胞で SP の発現が増加していた。 (Fig. 4c, d)。またこの実験の再現性を確認するため上記の実験を 4 回繰り返し同様な結果を得た。

考 察

酸化型ガレクチン-1 により自傷行動の抑制、切断神経の伸長促進とミエリン形成の促進、脊髄における NK1R (抗 SP 受容体) の減少、脊髄と DRG (後根神経節) での SP の増加、DRG での小型神経細胞の維持が認められた。

酸化型ガレクチン-1 はこれまで末梢神経の再生を調節する因子として同定、研究されてきた^{15, 16)}。今回の研究では神経の修復、再生による機能回復が神経因性疼

痛の原因療法であるという考えに基づき、坐骨神経切断モデルラットに酸化型ガレクチン-1 を投与して末梢神経の再生と疼痛の関連について検討した。

坐骨神経切断モデルにみられる自傷行動は患肢の疼痛あるいは異常知覚に対する反応でヒトの神経因性疼痛に相応すると考えられている¹⁾。単なる坐骨神経切断では再生により、運動機能の障害が見られないために、本研究では神経を 5 mm にわたって切除し、モデルを作成した。ラットにおいて自傷行動スコアが神経因性疼痛の程度を反映しているとすれば、今回、酸化型ガレクチン-1 投与群で自傷行動スコアが有意に低下していた (Fig. 1) ことは酸化型ガレクチン-1 が坐骨神経切断後の神経因性疼痛を軽減したことを示唆している。

神経の再生には傷害された神経細胞の生存が維持されること、そして軸索の伸長と突起の伸長が必要である。神経再生を促進する因子として NGF や脳由来神経栄養因子が知られているが、成熟ラットの神経細胞の生存維持が NGF 非依存性であることや神経損傷部での NGF の発現が短時間一過性であること^{12, 13)}、また NGF に遅れて上昇する脳由来神経栄養因子では神経突起伸長促進作用が弱いことなど²³⁾ から、損傷後の神経再生を誘導する機構にはこれら以外の因子が関与していることが考えられる。

堀江らは坐骨神経凍結損傷モデルマウスと腓骨神経切断モデルラットの神経損傷部に持続的に酸化型ガレ

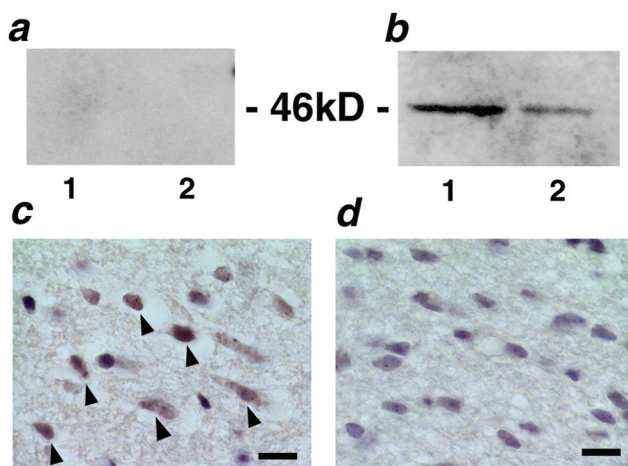


Fig. 3. 14 日後のラット脊髄 (L4) における NK1R のウェスタンブロット解析と免疫組織染色像。a, b は抗 NK1 抗体によるウェスタンブロット解析を示す。a は抗 NK1 抗体なし、b は抗 NK1 抗体使用、またレーン 1 は対照群、レーン 2 は酸化型ガレクチン-1 投与群を示す。46kD の位置に抗 NK1 抗体によるバンドが観察されたが、投与群 (b, レーン 2) では対照群 (b, レーン 1) と比較して反応の低下が認められる。c, d は抗 NK1 抗体による脊髄 (L4) の免疫組織染色像を示す。酸化型ガレクチン-1 投与群 (d) は対照群 (c) に比べ脊髄後角表層の神経細胞の NK1R の発現が低下していた。scale bars 200 μ m

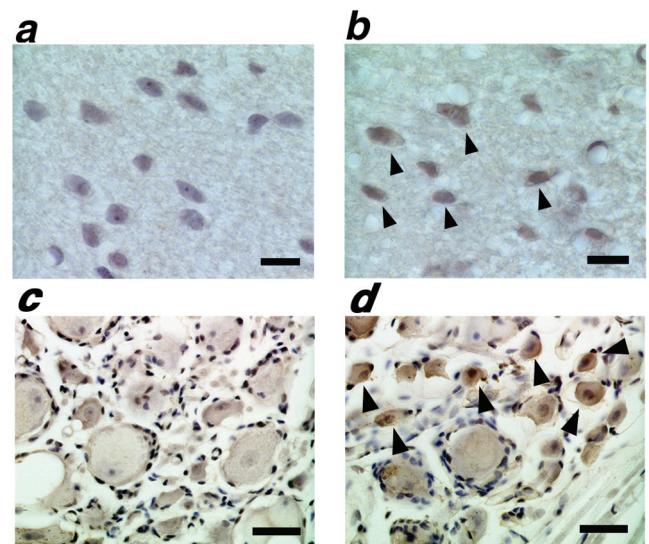


Fig. 4. 14 日後のラット脊髄 (L4) と DRG (L5) の抗 SP 抗体による免疫組織染色像。a, b は抗 SP 抗体による脊髄 (L4) の免疫組織染色像を示す。矢印 (▲) が示すように酸化型ガレクチン-1 投与群 (b) は対照群 (a) に比べ脊髄後角表層の神経細胞の SP の発現が増加していた。scale bars 200 μ m。c, d は抗 SP 抗体による DRG (L5) の免疫組織染色像を示す。矢印 (▲) が示すように酸化型ガレクチン-1 投与群 (d) では対照群 (c) と比べ DRG 小型細胞で SP の発現が増加していた。scale bars 50 μ m

クチン-1を投与することにより神経再生が促進されたことを報告している^{16, 17)}。単回投与の今回の実験でも酸化型ガレクチン-1投与群では坐骨神経切断末端の神経線維の伸長が肉眼的に認められ (Fig. 2a, b), また免疫化学組織染色でも抗 P0 抗体への免疫反応性が増加 (Fig. 2c, d) していたことからミエリン化線維が増加していることが確認された。このことから酸化型ガレクチン-1の投与は持続的でなく一回のみの投与であっても切断後の末梢神経再生に有効であると考えられた。

NK1R とそのアゴニストである SP は痛覚の伝達に関わる重要な要素として以前から知られている^{2, 3)}。DRG 小型細胞で産生された SP は軸索輸送により脊髄後角に運ばれ、細胞表面の NK1R と結合して速やかに細胞内に移行する²⁴⁾。末梢神経が切断されると、DRG 小型細胞が死滅し、脊髄後角の SP は減少しシナプス後細胞における NK1R の発現は増加する²⁴⁾。従って SP と NK1R は一次ニューロンである DRG と二次ニューロンである脊髄後角細胞との侵害受容線維連絡の指標として重要である。Hua らは脊髄に NK1R のアンチセンス mRNA を投与したラットではホルマリンテストに対する反応が減弱すること²⁵⁾ を報告している。また NK1R のノックアウトマウスでは電気刺激の強度を認識したり末梢からの入力に対する脊髄後角細胞の反応の増加を示す wind-up 現象がみられない²⁶⁾。これらのことは NK1R が痛みの発現、特に痛みを増幅するなどの修飾効果と密接に関連していることを示唆しており、今回、投与群で脊髄における NK1R の発現が低下していたことから (Fig. 3) 酸化型ガレクチン-1 が神経因性疼痛を軽減したことが考えられた。

NGF の投与により DRG の小型細胞を維持すると、神経再構築を阻止できるという報告がある^{2, 7-9)}。今回、酸化型ガレクチン-1 投与群で DRG における SP の発現が上昇しており (Fig. 4c, d), DRG の小型細胞が維持されて神経再構築が阻止された結果、神経因性疼痛が抑制された可能性がある。すなわち、今回の実験結果を一義的に解釈するならば、実験事実を加味した以下の仮説が考えられる。1. 末梢神経切断端に投与した酸化型ガレクチン-1 が軸索内を上行し、DRG における小型細胞の生命活動を維持した。2. その小型細胞から分泌された SP が末梢側においては坐骨神経の伸長に関与した。3. 中枢側においては増加した SP による NK1R の内在化²⁷⁾ (NK1R が細胞内に移行) が起こり NK1R の発現を抑え神経因性疼痛を抑制した。4. 小型細胞の生命維持により A β 線維の C 線維化を抑え中枢側における神経再構築を阻止した。5. 末梢神経と脊髄での作用で神経因性疼痛から来る自傷行動を抑制した。上記 5 つの項目の中心的意義は DRG 小型細胞の生命維持である。上記 5 項目の内、文献や本研究で証明されていない事は 1 のガレクチン-1 の軸索内輸送、2 の SP による切断坐骨神経伸長関与、3 の SP

増加と NK1R 内在化の関連、5 の末梢神経伸長の神経因性疼痛発症への関与の程度である。この 4 点が今後の研究の課題となる。

今回の研究では坐骨神経完全切断モデル²⁰⁾ を用いたが、神経因性疼痛の動物モデルには不完全絞扼性神経損傷モデル²⁸⁾、部分神経損傷モデル²⁹⁾、脊髄神経結紮モデル³⁰⁾ などがあり、モデルによって神経因性疼痛の症状は異なることや³¹⁾、NMDA 拮抗薬、オピオイド作動薬などに対する反応に差があること³²⁻³⁷⁾ からその疼痛発症の機序が異なることが示唆される。また同じ薬物でも投与時期によって効果に違いが生じることも知られており³⁸⁾、酸化型ガレクチン-1 の投与時期やモデルの違いによる効果の差についても検討する必要がある。また神経線維の伸長には時間がかかるのに対して神経因性疼痛は数日で発症する場合もあることからその発症には神経再構築以外の機序も複雑に関連していると考えられる。

結 論

ラットを用いて坐骨神経切断モデルを作製し、末梢神経再生促進因子である酸化型ガレクチン-1 を神経切断部局所に単回直接投与したところ、自傷行動スコアの低下、切断神経の伸長促進、DRG における小型神経細胞の生命維持とそれによる SP の発現の増加、さらに脊髄後角における SP 発現の増加と NK1R の発現低下が認められた。これらのことから酸化型ガレクチン-1 は末梢神経の再生を促進するだけでなく神経因性疼痛を抑制することが示唆され、臨床的にも神経再生のみならず神経因性疼痛の発症抑制および治療への応用が期待される。

謝 辞

稿を終えるにあたり御指導、御教示を賜りました埼玉医科大学総合医療センター麻酔科宮尾秀樹教授、埼玉医科大学生理学教室野村正彦教授に深く感謝致します。また、直接実験の御指導を賜りました吉村和法先生、藤牧香代実験助手をはじめ生理学教室各位に感謝致します。酸化型ガレクチン-1 について御指導を賜りました早稲田大学先端バイオ研究所堀江秀典教授、酸化型ガレクチン-1 を分与して頂きましたキリンビール株式会社医薬カンパニー生産技術センター門屋利彦博士に感謝致します。

本研究の要旨の一部は平成 14 年度、日本ペインクリニック学会第 36 回大会にて発表した。

文 献

- 1) Wall PD, Devor M, Inbal R, Scadding JW, Schonfeld Z, Seltzer Z, et al. Autotomy following peripheral nerve lesions: experimental anaesthesia dolorosa. *Pain* 1979; 7: 103-13.

- 2) Bennet DH, French J, Priestley JV, McMahon SB. NGF but not NT-3 or BDNF prevent the A fiber sprouting into lamina II of the spinal cord that occurs following axotomy. *Mol Cell Neurosci* 1996; 8: 211-20.
- 3) Woolf CJ, Shortland P, Coggeshall RE. Peripheral nerve injury triggers central sprouting of myelinated afferents. *Nature* 1992; 355: 75-7.
- 4) Nichols ML, Allen BJ, Rogers SD, Ghilardi JR, Honore P, Luger NM, et al. Transmission of chronic nociception by spinal neurons expressing the substance P receptor. *Science* 1999; 286: 1558-61.
- 5) Mantyh PW, Rogers SD, Honore P, Allen BJ, Ghilardi JR, Li J, et al. Inhibition of hyperalgesia by ablation of laminal spinal neurons expressing the substance P receptor. *Science* 1997; 278: 275-9.
- 6) Daubell TP, Mannion RJ, Woolf CJ. Intact sciatic myelinated primary afferent terminals collaterally sprout in the adult rat dorsal horn following section of a neighbouring peripheral nerve. *J. Comp. Neurol* 1997; 380: 95-104.
- 7) Mattheson CR, Carnahan J, Urich JL, Bocangel D, Zhang TJ, Yan Q. Glial cell line derived neurotrophic factor (GDNF) is a neurotrophic factor for sensory neurons: comparison with the effects of the neurotrophins. *J Neurobiol* 1997; 32: 22-32.
- 8) Eriksson NP, Aldskogius H, Grant G, Lindsay RM, Rivero-Melian C. The effect of nerve growth factor, brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3 on the laminar distribution of transganglionically transported cholera toxin in the spinal cord dorsal horn following transection of the sciatic nerve in the adult rat. *Neuroscience* 1997; 78: 863-72.
- 9) Coggeshall RE, Lekan HA, Doubell TP, Allchorne A, Woolf CJ. Central changes in primary afferent fibres following peripheral nerve lesion. *Neuroscience* 1997; 77: 1115-22.
- 10) Rich KM, Alexander TD, Pryor JC, Hollowell JP. Nerve growth factor enhances regeneration through silicone chambers. *Exp Neurol* 1989; 105: 162-70.
- 11) Lindsay RM. Nerve growth factors (NGF, BDNF) enhance axonal regeneration but are not required for survival of adult sensory neurons. *J Neurosci* 1988; 8: 2394-405.
- 12) Sendtner M, Holtmann B, Kolbeck R, Thoenen H, Barde YA. Brain-derived neurotrophic factor prevents the death of motoneurons in newborn rats after nerve section. *Nature* 1992; 360: 757-6.
- 13) Johnson EM, Rich KM, Yip HK. The role of NGF in sensory neurons in vivo. *Trends Neurosci* 1986; 9: 33-7.
- 14) Yasuda T, Sobue G, Ito T, Mitsuma T, Takahashi A. Nerve growth factor enhances neurite arborization of adult sensory neurons; a study in single-cell culture. *Brain Res* 1990; 524: 54-63.
- 15) Horie H, Inagaki Y, Sohma Y, Nozawa R, Okawa K, Hasegawa M, et al. Galectin-1 regulates initial axonal growth in peripheral nerves after axotomy. *J Neurosci* 1999; 19: 9964-74.
- 16) Horie H, Kadoya T. Identification of oxidized galectin-1 as an initial repair regulatory factor after axotomy in peripheral nerves. *Neurosci Res* 2000; 38: 131-7.
- 17) Kasai K, Hirabayashi J. Galectins: a family of animal lectins that decipher glycodes. *J Biochem* 1996; 119: 1-8.
- 18) Perillo NL, Marcus ME, Baum LG. Galectins: versatile modulators of cell adhesion, cell proliferation, and cell death. *J Mol Med* 1998; 76: 402-12.
- 19) Inagaki Y, Sohma Y, Horie H, Nozawa R, Kadoya T. Oxidized galectin-1 promotes axonal regeneration in peripheral nerves but does not possess lectin properties. *Eur J Biochem* 2000; 267: 2955-64.
- 20) Yoshimura K, Kametani F, Shimoda Y, Fujimaki K, Sakurai Y, Kitamura K, et al. Antigens of monoclonal antibody NB3C4 are novel markers for oligodendrocytes. *Neuro Report* 2001; 12: 417-21.
- 21) Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; 227: 680-5.
- 22) Yoshimura K, Negishi T, Keneko A, Sakamoto Y, Kitamura K, Hosokawa T, et al. Monoclonal antibodies specific to the integral membrane protein in bovine peripheral nerve myelin. *Neurosci Res* 1996; 25: 41-9.
- 23) Meyer M, Matsuoka I, Wetmore C, Olson L, Thoenen H. Enhanced synthesis of brain-derived neurotrophic factor in the lesioned peripheral nerve: different mechanisms are responsible for the regulation of BDNF and NGF mRNA. *J. Cell Biol* 1992; 119: 45-54.
- 24) Marvizon JC, Martinez V, Grady EF, Bunnett NW, Mayer EA. Neurokinin 1 receptor internalization in spinal cord slices induced by dorsal root stimulation is mediated by NMDA receptors. *J Neurosci* 1997; 17: 8129-36.
- 25) Hua X-Y, Chen P, Polgar E, Nagy I, Marsala M, Phillips E, et al. Spinal neurokinin NK1 receptor

- down-regulation and antinociception: effects of spinal NK1 receptor antisense oligonucleotides and NK1 receptor occupancy. *J Neurochem* 1998; 70: 688-98.
- 26) De Felipe C, Herrero JF, O'Brien JA, Palmer JA, Doyle CA, Smith AJ, et al. Altered nociception, analgesia and aggression in mice lacking the receptor for substance P. *Nature* 1998; 392: 394-7.
- 27) Mantyh PW, DeMaster E, Malhotra A, Ghilardi JR, Rogers SD, Mantyh CR, et al. Receptor endocytosis and dendrite reshaping in spinal neurons after somatosensory stimulation. *Science* 1995; 268: 1629-32.
- 28) Bennet DLH, Michael GJ, Ramachandran N, Munson JB, Averill S, Yan Q, et al. A distinct subgroup of small DRG cells express GDNF receptor components and GDNF is protective for these neurons after nerve injury. *J Neurosci* 1998; 18: 3059-72.
- 29) Seltzer Z, Dubner R, Shir Y. A novel behavioral model of neuropathic pain disorders produced in rats by partial sciatic nerve injury. *Pain* 1990; 43: 205-18.
- 30) Kim SH, Chung JM. An experimental model for peripheral neuropathy produced by segmental spinal nerve ligation in the rat. *Pain* 1997; 50: 355-63.
- 31) Kim KJ, Yoon YW, Chung JM. Comparison of three rodent neuropathic pain models. *Exp Brain Res* 1997; 113: 200-6.
- 32) Yamamoto T, Yaksh TL. Spinal pharmacology of thermal hyperesthesia induced by constriction injury to the sciatic nerve. Excitatory amino acid antagonists. *Pain* 1992; 49: 121-8.
- 33) Yamamoto T, Nozaki-Taguchi N. Effects of intrathecally administered nociceptin, an opioid receptor-like1 receptor agonist, and N-methyl-D-aspartate receptor antagonists, on the thermal hyperalgesia induced by partial sciatic nerve injury in the rat. *Anesthesiology* 1997; 87: 1145-52.
- 34) Yamamoto T, Sakashita Y. Differential effects of intrathecally administered N- and P-type voltage-sensitive calcium channel blockers upon two models of experimental mononeuropathy in the rat. *Brain Res* 1998; 794: 329-32.
- 35) Yamamoto T, Tony L, Yaksh TL. Spinal pharmacology of thermal hyperplasia induced by incomplete ligation of sciatic nerve. *Anesthesiology* 1991; 75: 817-26.
- 36) Yamamoto T, Sakashita Y. Differential effects of intrathecally administered morphine and its interaction with cholecystokinin-B antagonist on thermal hyperalgesia following two models of experimental mononeuropathy in the rat. *Anesthesiology* 1999; 90: 1382-91.
- 37) Yamamoto T, Nozaki-Taguchi N, Kimura S. Effects of intrathecally administered nociceptin, an opioid receptor-like1 (ORL1) receptor agonist, on the thermal hyperalgesia induced by carageenan injection into the rat paw. *Brain Res* 1997; 754: 329-32.
- 38) Yamamoto T, Shimoyama N, Asano H, Mizuguchi T. Time-dependent effect of morphine and time-independent effect of MK-801 antagonist, on the thermal hyperesthesia induced by unilateral constriction injury to the sciatic nerve in the rat. *Anesthesiology* 1994; 80: 1311-9.