

LECTURES

後根神経節細胞からの *in vivo* パッチクランプ記録法の実際

¹⁾ 杏林大学医学部 第一生理学教室, ²⁾ 杏林大学医学部
第一解剖学教室, ³⁾ 防衛医科大学校 解剖学第二講座
八木 淳一¹⁾, 小林 靖^{2,3)}, 平井 直樹¹⁾

I はじめに

体性感覚あるいは内臓感覚情報の受容と伝播を司る脊髄後根神経節 (DRG) ニューロンは, 生体内外の様々な刺激に反応できるよう多種多様に分化している [1]. このうちC線維あるいはA δ 線維を有する小型DRGニューロン (ここではそれぞれC-type, A δ -type DRGニューロンと呼ぶ) は, 末梢受容器として特殊な構造を持たず, 自由神経終末を形成する. これらのニューロンでは, 自由神経終末部の細胞膜表面に発現する受容体あるいはイオンチャネルが生体内外の信号を直接受容し, 受容器電位に変換したのち活動電位の放電へと符号化するものと考えられる. 実際, 受容器電位の発生を担うと考えられる温度受容体, ATP受容体, 酸感受性受容体等の遺伝子が最近相次いでクローニングされ, これらの受容体がDRGニューロンに発現していることが知られるようになった [2-4]. また, 活動電位の発生と放電頻度に関与する様々な電位依存性イオンチャネル, さらにそれらの活性を修飾するブラジキニン, プロスタグランジンなどの炎症メディエーターの受容体が発現している. 小型DRGニューロンにおけるこれらの受容体あるいはイオンチャネルの発現パターンは, DRGニューロンの機能的多様性とあいまって多彩である. しかし, これまでは技術的制約から, DRGニューロンの持つ機能的特性 (受容野応答特性), 電気生理学的特性 (軸索の伝導速度, 活動電位の形状, イオンチャネルの構成, 興奮性膜の性質), あるいは解剖学的特性 (細胞体の大きさ, 組織化学的染色性)

を統合して解析することができなかった. そこで, 我々は多様なDRGニューロンの性質を統合的に解析するために, ラットの *in vivo* 標本を用いたDRGニューロンの新たなホールセルパッチクランプ記録法を開発した. 本稿ではこの技法について紹介する [5].

II 実験方法の実際

1. 技法上の問題点

パッチクランプ法を適用するには, 記録用ピペット先端を細胞膜表面に密に接触させる必要がある. ところが, DRG内部にはコラーゲン線維などの硬い結合組織が存在し, さらに個々のDRGニューロンの細胞体は複数の扁平なSatellite細胞で頑強に覆われている. このため, 神経節内の細胞構築をそのまま保存した標本を用いた場合, 記録用ピペットに陽圧をかけただけでは, ピペット先端をDRGニューロンの細胞膜表面に接触させることができない. このように記録する細胞周囲に硬い結合組織が存在する場合, たとえば *Drosophila* の筋肉 [6], *Chick* の毛様体神経節 [7] では, 記録しようとする細胞の周囲組織にガラスピペットを通じてコラゲナーゼをあらかじめ局所投与し, 結合組織を軟化するという手法が適用される. さらに神経節標本の場合は, このコラゲナーゼ処理の後, 目標とする細胞体周囲のSatellite細胞を陽圧をかけた記録用ピペットで破ることによって, ピペット先端をニューロンの膜表面に接触させることができる [7, 8]. この操作はブラインドの状況下ではまず不可能であり,

顕微鏡直視下で行わざるを得ない。そこで、麻酔下のラットにおいてDRGニューロンからホールセルパッチクランプ記録を行うために、以下の標本作成を考案した。まずラットの腰髄部DRGと末梢側に続く坐骨神経を剥離し、DRGを末梢側神経をつなげたまま体部から引き離す。次にラットのからだを正立顕微鏡のステージにマウントし、DRGをステージ上チェムバー内に固定する。こうして神経節上面に位置するDRGニューロンの細胞体を顕微鏡下で可視化することができ、パッチクランプ記録を適用できる。すなわちこの標本では、DRGニューロンの細胞体は人工脳脊髄液を灌流したチェムバー内にあり、DRGニューロンの末梢側受容野部位は、*in vivo*の状況下にある。本標本を便宜的に*in vivo*標本と呼ぶが、厳格な意味では*in vivo*と*in vitro*の混合型標本と呼ぶべきかもしれない。

2. 標本作成の手順

足の皮膚を支配するDRGニューロンの標識

DRGニューロンは、皮膚、粘膜、筋、腱などの組織、さらには様々な臓器を支配している。そこで、あらかじめ特定の領域に神経トレーサーを注入してDRGニューロンの細胞体を標識しておけば、その領域の組織や臓器を支配するDRGニューロンに限定して記録を行うことができる。今回の実験では後足の皮下にDiIを注入し、皮膚を支配するDRGニューロンから記録を行った。

ラット (Sprague Dawley 系, 雌, 6~7 週齢) をネンブタール (50 mg/kg, ip) により麻酔し、DMSO で溶解した DiI (Molecular Probes; 2.5 mg/ml) を、26G の注射針を付けたハミルトンシリンジで左後足の甲の外側部 (有毛部) に 10 μ l 皮下注入する。腰髄部の DRG ニューロンは DiI 注入後 2, 3 日程で標識されてくるが、より明瞭に標識されるまで 1 週間ほどかかるようである。また、DiI 注入による注入部位の炎症は数日内に治まるが、炎症が起こっているあいだ神経終末の感受性が変化する可能性を考慮し、電気生理の実験は DiI 注入から十分な期間 (2~6 週間) をおいて行っている。

3. *In vivo* 標本の作成

DiI 注入から 2~6 週間後、ラットにアトロピン (0.05 mg/kg, ip) の麻酔前投与を行う。ネンブタールで麻酔したラットに気管カニューレを挿管し、さらに薬物投与のため側の頸静脈にカニューレを挿入する。術中および記録中は、心電図、直腸温、呼気中の炭酸ガス濃度のモニターを行う。体温は使い捨てカイロまたは保温マットを用いて維持する。その他、動物の管理に関する詳細は他書を参照されたい [9, 10]。

実験には左側第 4 腰髄 (L4) の DRG を用いる。まず、背側皮膚の剃毛後、正中部を L3 から S2 のレベルで切開し、左側の脊柱固有背筋を椎骨から剥がす。腸骨の一部を除去すると、坐骨神経を確認できる。末梢側の坐骨神経を大腿二頭筋の筋頭間を経て膝関節付近まで露出する。中枢側は、L4 と L5 の腰椎横突起を除去して、L4/L5 間の椎間孔付近まで神経を追跡する。L4 のレベルで椎弓切除を行い L4-DRG を露出する。この後、末梢側の大腿部から L4-DRG まで、L4 に通ずる神経幹を周りの組織から丁寧に剥離し、なおかつ L4-DRG とは別の方向に向かう神経枝は切除する。L4 部の硬膜を切開し、L4-DRG 中枢側の前根と後根を糸で結紮してその中枢端を切除する。こうして L4-DRG から大腿部坐骨神経まで 1 本の神経幹として剥離する。なお、DRG 周囲は出血しやすいので、椎弓切除の際には骨蠟を骨断面に塗り込めながら骨鉗子で徐々に骨を切除し、軟組織からの出血は生食で湿らせた綿球あるいはスポンゼルでこまめに圧迫止血しなければならない。

次に、混合ガスでバブルした人工脳脊髄液 (ACSF, 組成は後述) を充たした 2 cm 四方ほどのプラスチック製のチェムバーをラットの背に設置し、その中に剥離した神経節の部分を移す。神経幹の部分は乾燥を防ぐため、固形パラフィンとワセリンを混合したもので覆っておく。実体顕微鏡下で、神経節を取り巻く周囲膜をピンセットで丁寧に剥離する。剥離が困難な場合は、チェムバー内の ACSF にコラゲナーゼ (和光; 1 mg/1ml) を溶かし 10 分ほどインキュベートすると、剥離が容易になる。ただし、コラゲナーゼの処理が強

すぎると神経節部の組織構造が脆弱になるので注意しなければならない。

ラットを、ノマルスキーおよび落射蛍光装置を装備した正立顕微鏡のステージに、腹側を手前にして横臥位にマウントし、動かないように包帯でステージの支柱に固定する（図1）。この実験には対物レンズ周囲の構造がなるべくシンプルな顕微鏡が適する。ここではニコン製のパッチクランプ用正立顕微鏡（ECLIPSE PhysioStation；E600FN）を使用している。また、ニューロンの視覚化には斜光照明を利用してもよい [7]。ラットの固定には、成茂科学によりデザインおよび作成された特注ステージを使用している。L4-DRG をステージ上のアクリル製チェムバー（自作）に移し、ナイロン糸を張ったU字型プラチナフレームで固定する。チェムバー内は、95% O₂, 5% CO₂でバブルした ACSF (in mM；125 NaCl, 3.8 KCl, 2.0 CaCl₂, 1.0 MgCl₂, 1.2 KH₂PO₄, 26 NaHCO₃, 10 glucose) を灌流する（2～3 ml/min）。坐骨神経は、チェムバーに接続したプラスチック製の細長い半円柱容器に横たえ、固形パラフィンとワセリンの混合物で覆う。この容器の内側には、銀線双極電極（直径 0.5 mm, 双極間距離 3 mm）を沿わせてある。この銀線双極電

極を2組設置（陰極間距離 10 mm）し、坐骨神経への電気刺激を行う。電気刺激を与えると左足が動くので、刺激状態が良好であるかどうかを確認できる。この後、ミオブロックを静注（0.2 mg/kg）し非動化する。記録部位がラットの体部と離れているため、呼吸運動、拍動による振動が記録部位に伝わる問題は生じない。したがってこの実験において気胸を行う必要はない。

4. 酵素処理とホールセル記録の確立

ノマルスキー顕微鏡下で、L4-DRG の上面に並ぶ大小様々なニューロンを観察できる（図2B, 図3）。落射蛍光下で DiI 陽性ニューロンを探し、記録する DRG ニューロンを決める（図2A）。神経節内の結合組織は硬いため深部のニューロンから記録することは困難である。なんらかの理由で深部に位置するニューロンから記録したい場合は、あらかじめ神経節の表面をハサミ等でトリミングしておく必要がある。

記録を行う前に、前述した通りコラゲナーゼの処理が必要となる [8]。ピペット（先端直径 20～50 μm）に、コラゲナーゼ（10 mg/ml, 和光あるいは Sigma）と Thermolysine（100 U/ml, Sigma）を ACSF に溶かしたものに充填し、シリンジを用いて弱い陽圧をかけて、ターゲットとな

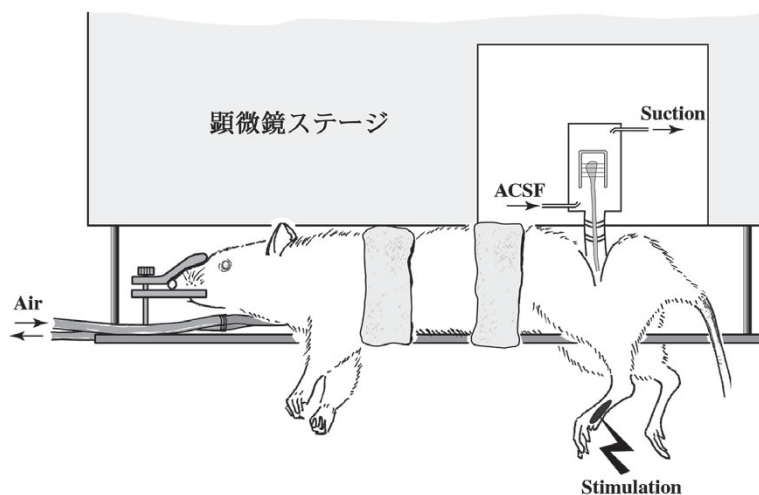


図1. ラットおよび実験装置の配置
ラットを顕微鏡のステージにマウントしたところを上面から見た模式図。

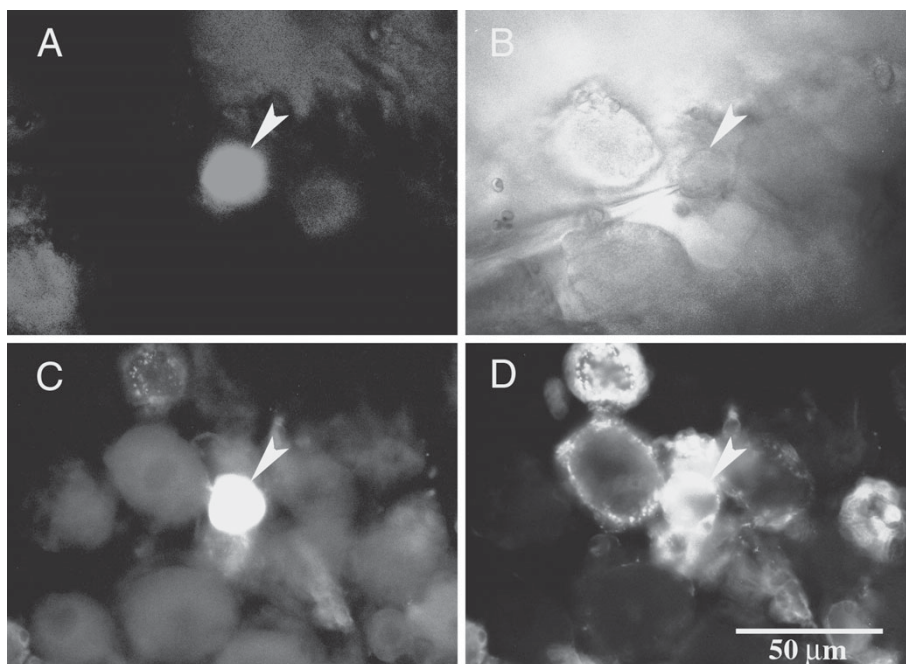


図2. 記録時および切片標本の顕微鏡写真

A：蛍光顕微鏡下で観察したDiI陽性DRGニューロン。B：記録中のノマルスキー顕微鏡像。C：組織切片標本像。記録したDRGニューロンは蛍光観察下でLucifer Yellow陽性細胞として同定された。D：IB₄-FITCの蛍光像。記録した小型DRGニューロンはFITCの強い蛍光像を示し、IB₄陽性であった。（矢印で示されたDRGニューロンは、すべて同一のニューロン。）

るDRGニューロン周囲にゆっくりと投与する。陽圧をかけるとわずかにニューロンが揺れ動く。そのまま10～30分間投与を続ける。この投与時間がこの実験において極めて重要である。適する投与時間は、その日の気温と湿度、ラットの週齢と雌雄、コラゲナーゼのロット番号等により影響される。くり返し実験を行う中でもっとも適する投与時間を見つけだし、さらに常にフィードバックしながら投与時間を調整していく必要がある。一つの目安として、密に並んだDRGニューロンの細胞間隙がルースになってきたところで投与を終了する。酵素とCa²⁺を含まないACSFをスポイトでDRG表面に滴下し、酵素反応を止める。

先端をheat polishした記録用ピペット（Clark Electromedical；GC150T-10）にピペット内溶液（in mM；122 K gluconate, 20 KCl, 5 NaCl, 0.01 CaCl₂, 5 MgCl₂, 1 EGTA, 5 HEPES,

2 Na₂ATP, 0.2 Na₃GTP, 1 Lucifer Yellow（LY）；記録した細胞はLYでラベルされる）を充填する。シリンジを使ってピペットに比較的強い陽圧（シリンジ容積で3 mlほど）をかける。電極抵抗は、小型DRGニューロンを対象にする場合は4～5 MΩ、大型DRGニューロンの場合は2～3 MΩが適する。ターゲットとなるDRGニューロンに向かって記録用ピペット先端をDRGニューロンを覆うSatellite細胞にぶつけるような感じで何度か押し当てる。すると複数のSatellite細胞が連続して形成する膜の一部が破れ、図3で示すようにピペット先端をDRGニューロンとSatellite細胞との間隙に侵入させることができる。あとは通常のパッチクランプ記録の要領でピペットに弱い陰圧をかければギガシールを形成（>5 GΩ）することができる。ギガシールが十分安定した後、さらに陰圧をかけてホールセル

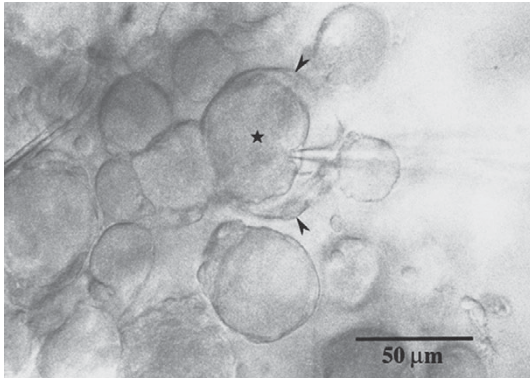


図3. DRGニューロン細胞膜へのパッチピペットのアプローチ

コラゲナーゼの局所投与によりDRGニューロンの細胞間隙がルースになっている。大型DRGニューロン(★)を取り囲むSatellite細胞(矢印)を陽圧をかけた記録用パッチピペットで破り、パッチピペット先端をDRGニューロン細胞膜表面に接触させたところ、陽圧によりDRGニューロン細胞膜表面にdimpleが認められる(文献8より)。

記録にする。マニピレーターは、水圧式(成茂科学; MHW-3)を使用している。ピペットをステップ状に進める電動式のものはこの実験には適さない。また、酵素処理が弱すぎると、いくら強い陽圧をかけたピペットを押し当ててもSatellite細胞が形成する膜を破ることはできない。逆に、酵素処理が強すぎた場合には、DRGニューロンの細胞膜自体が弱くなるせいか高抵抗のシールを得ることが困難となる。仮に良好なホールセル記録ができたとしても、DRGニューロンの軸索がダメージを受けて末梢の刺激に応答しない場合が多い。

5. 記録細胞の電気生理学的解析

電位固定モード(保持電位 = -60 mV)でホールセル記録が成立した後、膜抵抗、膜電気容量、シリーズレジスタンスを測定し、通常通り容量成分とシリーズレジスタンスの補償を行う。以下に、現在行っている実験項目について順次記述する。(1) -60 mVから -120 mVへの過分極性ステップパルス(400 ms幅)を与えて再び -60 mVへ戻す(図4C)。このパルスにより数種類のイオン電流(H電流, A電流, T型 Ca^{2+} 電流, 内向き整

流性 K^{+} 電流, リーク電流)を観察できる。これらのイオン電流の発現パターン(Current signature)からDRGニューロンを分類できる[11]。(2)電流固定モードに変更し、静止膜電位を測定した後、坐骨神経を2組の双極銀線電極で刺激して活動電位を誘発させる。潜時の差から軸索の伝導速度を算出する。また、活動電位の形状(幅, 再分極時の屈折点の有無, 後過分極, 後脱分極)を観察する(図4B)。(3)左後足の甲の外側部において、ピンセットで機械的刺激を与えながら受容野を探す。皮膚を支配するC-type, A δ -type DRGニューロンの受容野の大きさは、低閾値型のものを除いて通常スポット状で非常に狭いので注意深く受容野を探す必要がある。受容野を見つけたらそこに先細の油性マジックでマークを付けておくとよい。受容野に順次、ブラシ刺激, von Freyフィラメント刺激, ピンセットによるピンチ刺激を与える(図4Aa)。(4)電流固定下で、ペルチエ素子を用いた温冷刺激装置(ダイヤモンド社; DPS-777J)のプロブ(直径4 mm)を受容野に軽く接触させて、受容野の熱刺激(図4Ab)と冷刺激を行う。一度刺激を行った後は、末梢受容器の感作あるいは脱感作による影響をなるべく除外するために、2分以上の間隔を開けて次の刺激を行う。(5)電位固定モード(保持電位 -60 mV)に戻して、チェムバー内にcapsaicin ($2 \mu\text{M}$)を灌流投与して、細胞体のcapsaicin反応性を調べる(図4E)。(6)capsaicin投与から5分以上経過して細胞の状態が安定するのを確認した後、 Ca^{2+} 電流と K^{+} 電流を抑制するためチェムバー内の溶液を Cd^{2+} , TEA等を含むHEPESバッファ溶液に置換する。保持電位 -80 mVから脱分極性のパルスを与えて Na^{+} 電流を記録する。さらに細胞外液にTTX ($1 \mu\text{M}$)を添加して、TTX抵抗性 Na^{+} 電流の有無を調べる(図4D)。

6. 組織化学的解析

DRGニューロンは、組織化学的に多彩に分類されている。記録したDRGニューロンの組織化学的解析も試みている。ピペット内溶液中のLYによりラベルされたニューロン、すなわち記録さ

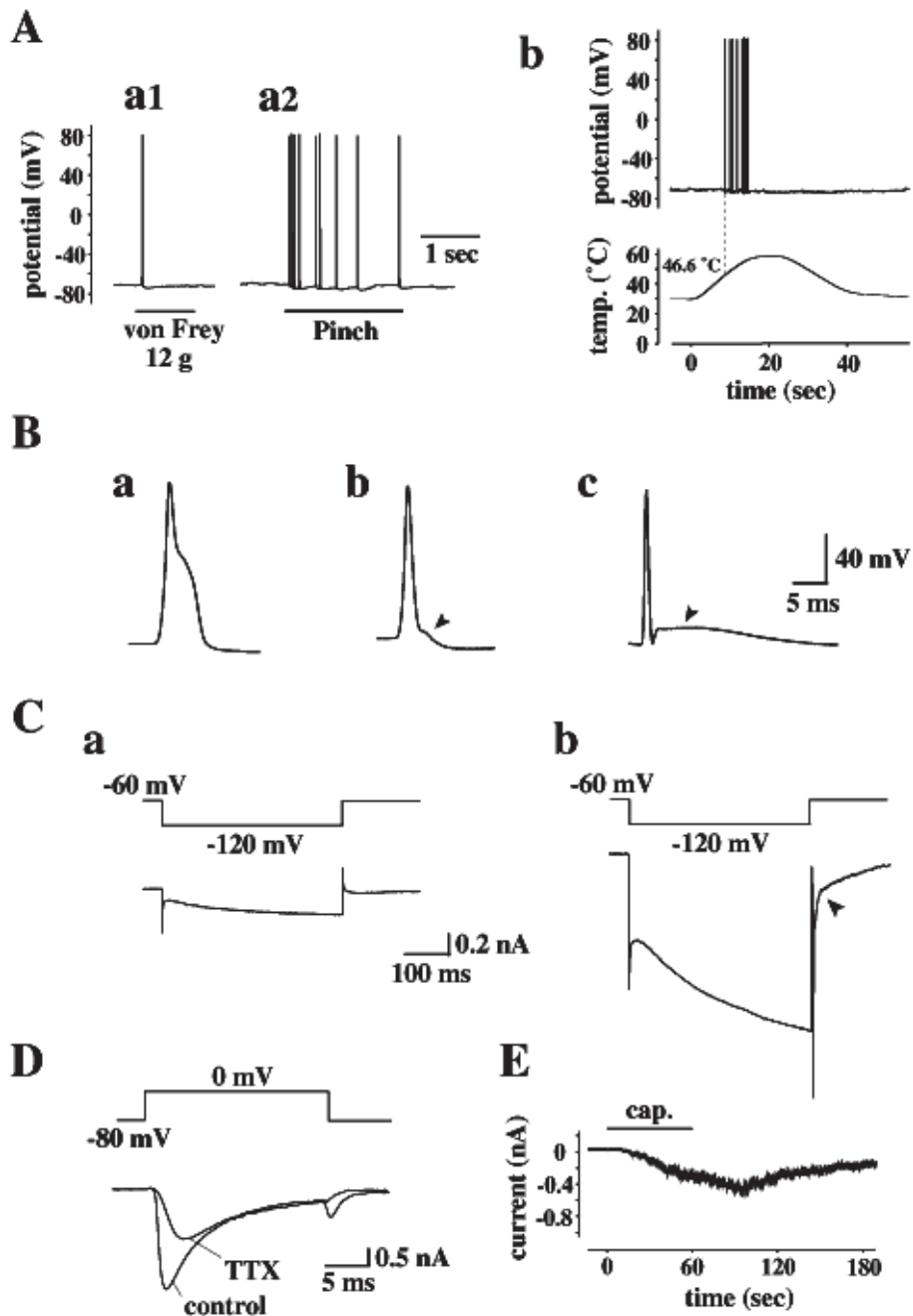


図4. 性質の異なるDRGニューロンのホールセル記録

A : C-Heat-HTMの膜電位記録. 受容野への von Frey フィラメントによる閾値刺激 (a1) とピンセットによるピンチ刺激 (a2) に対して活動電位が生じた. さらに受容野への熱刺激により 46.6 °C で応答した (b). B : C-Heat-HTM (a), C-LTM (b), A δ -LTM (c) の活動電位の形状. C : 電位固定下でC-Heat-HTM (a) と A δ -LTM (b) に過分極ステップパルスを与えた時の電流応答. D : C-HTMのNa⁺電流. TTX投与前 (control) とTTX投与下 (TTX ; 1 μ M) の記録. E : C-Heat-HTMのcapsaicin (cap. ; 2 μ M) に対する電流応答 (保持電位 = -60 mV). 詳細については本文参照のこと.

れたニューロンはDRGの表面に位置しているため、切片標本を作成した時しばしば極々小さな破片のような切片の中に見い出される。この切片を取りこぼしなく回収しなければならない。そこで、DRGをゼラチンに包埋してからクリオスタットにて切片標本を作成している。

(1) 記録後、坐骨神経からDRGを切り離し固定液(4% paraformaldehyde in 0.1 M PB)に移して、3時間4℃下に置く。(2) 20%サッカロースに12時間入れる。(3) ゼラチン(10%ゼラチン, 20%サッカロース in 0.1 M PB)に包埋する。(4) クリオスタットにて、温度を-27℃前後に設定して10 μmの連続切片標本を作成する。

連続切片標本の中から、記録されたDRGニューロンは、LY陽性細胞として同定される(図2C)。このDRGニューロンを含む切片標本を、*Griffonia simplicifolia* 由来の isolectin B₄ (IB₄; 脊髄後角第II層に投射する小型ニューロンを主に標識することが知られている)で反応させた。IB₄-FITC (20 μg/ml in 0.1 M PB)を切片に滴下して、30分間ゆっくりと震盪しながら反応させる。再び、落射蛍光にて記録されたDRGニューロンがIB₄陽性であるか否かを観察する(図2D)。この時注意が必要なのは、FITC用のバンドパスフィルターを用いてもLYの蛍光を完全にカットできないので、LY陽性細胞を確認した後IB₄-FITCで反応させる前に、切片に励起光を当ててLYの蛍光を退色させておく必要がある。この処理過程を回避するために、現在は免疫染色法によるDAB発色も試みている。

III 皮膚を支配する小型DRGニューロンからの記録

記録された小型DRGニューロンは、まず軸索の伝導速度により、C-type (1.5 m/s未満)とA δ-type (3~10 m/s)に分類される(ただしA δ線維の伝導速度の上限については、A δ線維とA β線維の伝導速度の境界におそらく両者間のオーバーラップがあり、A β線維との境界を示すものではない)。さらに、受容野応答特性により、熱受容—高閾値機械受容型(Heat-HTM)(図4A)、

熱受容—中閾値機械受容型(Heat-MTM)、冷受容—中閾値機械受容型(Cold-MTM)、高閾値機械受容型(HTM)、低閾値機械受容型(LTM)等、現在までに10種類程に分類されている[5]。受容野応答特性とその他の性質(活動電位の形状、イオンチャネルの発現パターン、薬物応答等)の間には様々な相関があることが明らかになってきた。たとえば、活動電位の形状は、C-Heat-HTM、C-HTMでは幅が広く下降相に顕著なinflectionが認められる(図4Ba)。一方、受容野への触刺激に敏感に反応するC-LTMの活動電位(図4Bb)は幅が狭く、inflectionは認められず、後脱分極(図中の矢印)をわずかに認める。A δ-LTMの活動電位(図4Bc)は、C-LTMよりさらに幅が狭く、持続時間の長い後脱分極を伴う(図中の矢印)。受容野の機械刺激に対する応答閾値と活動電位の幅にはほぼ正の相関関係がある。また、電位固定モードで過分極パルスを与えると、多くのC-type DRGニューロンではH電流(過分極誘発内向き電流)がわずかに生じる(図4Ca)が、一部のC-typeには生じない。A δ-LTMでは、C-typeと比較して大きなH電流を生じる(図4Cb)。A δ-typeの細胞体はC-typeのものよりも大きい。細胞膜単位面積当たりの電流量に換算してもH電流に有為差が認められる[12]。A δ-LTMでは、過分極パルスから-60 mVの保持電位に戻った時にamiloride感受性のT型Ca²⁺電流(図4Cb, 矢印; 低閾値一過性内向き電流)が認められる。A δ-LTMは、受容野のブラシ刺激により100 Hz以上の高頻度で応答することができるが、活動電位の持続性後脱分極と高頻度放電は、T型Ca²⁺チャネルが高密度に発現することに関係するものと思われる。また、これまでに記録したすべてのC-typeにTTX抵抗性Na⁺電流が認められた(図4D)が、A δ-LTMには認められない。Heat-HTM, Heat-MTMの細胞体は、capsaicinに反応する(図4E)ことから、vanilloid receptor subtype 1 (VR1; 43℃以上の侵害性熱刺激で活性化するカチオンチャネル)を発現していると考えられる。

IV 今後の展望

今回は皮膚を支配する小型 DRG ニューロンを対象にした実験について述べたが、A α/β 線維を有する大型 DRG ニューロンあるいは皮膚以外の骨格筋、腱、関節を支配する DRG ニューロンからの記録も同様に可能である。しかしながら、その他の器官や臓器を支配する感覚神経からの記録については工夫しなければならない。一つの方法として、「*in vivo*」という本題からは外れるが、対象とする器官や臓器にその支配神経と神経節を付けたまま摘出した *in vitro* 標本の適用が考えられる。例えば角膜、脳の硬膜、歯髄、歯根膜、心臓、消化器等を支配する感覚神経の解析に応用可能である。さらに遺伝子操作が可能なマウスを用いた標本への応用も必要となろう。近年、感覚神経の様々な性質について、分子レベルで研究が進展している。今後、明らかにされた分子の機能を「生体のレベル」で解析し、感覚神経の受容と符号化の機構を明らかにしていく必要があろう。

謝辞

本技法中の酵素処理法に関し、種々のアドバイスをいただいた群馬大学医学部行動医学研究施設 行動生理 城所良明教授、東北大学大学院生命科学科脳機能解析分野 八尾寛教授、そしてラットを固定する顕微鏡ステージの設計と作成に御協力くださった成茂科学の米山氏と技術スタッフの方々に深く感謝致します。

文 献

1. Lawson SN, Crepps BA & Perl ER : Relationship of

substance P to afferent characteristics of dorsal root ganglion neurones in guinea-pig. *J Physiol* **505** : 177–191, 1997

2. 飯田陶子, 富永真琴 : 痛み・温度を感じる。細胞工学, 秀潤社, 東京, Vol 21 (12) pp 1420–1424, 2002
3. Julius D & Basbaum AI : Molecular mechanisms of nociception. *Nature* **413** : 203–210, 2001
4. McCleskey EW & Gold MS : Ion channels of nociception. *Annu Rev Physiol* **61** : 835–856, 1999
5. Yagi J, Kobayashi Y & Hirai N : Integrated analysis of small DRG neurons exhibiting distinct sensory modalities. *Jpn J Physiol* **52** (Suppl) : 36, 2002
6. Nishikawa K & Kidokoro Y : Junctional and extra-junctional glutamate receptor channels in *Drosophila* embryos and larvae. *J Neurosci* **15** : 7905–7915, 1995
7. Yawo H & Chuhma N : Omega-conotoxin-sensitive and -resistant transmitter release from the chick ciliary presynaptic terminal. *J Physiol* **477** : 437–448, 1994
8. Yagi J & Sumino R : Inhibition of a hyperpolarization-activated current by clonidine in rat dorsal root ganglion neurons. *J Neurophysiol* **80** : 1094–1104, 1998
9. 内野善生, 佐々木成人, 中隋克己, 板東武彦, 本郷利憲, 森 茂美, 森 大志 : ネコの手術・実験法。日誌 **63** (10) : 271–316, 2001
10. 吉村 恵, 古江秀昌 : *In vivo* バッチクランプ法 : 新バッチクランプ実験技術法, 岡田泰伸編, 吉岡出版, 京都, 第1版, pp140–146, 2001
11. Cardenas CG, Del Mar LP & Scroggs RS : Variation in serotonergic inhibition of calcium channel currents in four types of rat sensory neurons differentiated by membrane properties. *J Neurophysiol* **74** : 1870–1879, 1995
12. Yagi J, Hirai N & Sumino R : Action of the hyperpolarization-activated current blocker ZD7288 in dorsal root ganglion neurons classified by conduction velocity. In : *Progress in Pain Research and Management*, Ed. Devor M, Rowbotham MC & Wiesenfeld-Hallin Z, IASP Press, Seattle, Vol 16 pp109–117, 2000