

博士論文（要約）

犬と猫におけるオピオイドの侵害刺激伝達抑制作用の比較

長久保 大

目次

序言	1
第1章 脊髄レベルにおけるレミフェンタニルの侵害刺激伝達抑制作用の比較 ～疼痛関連体性感覚誘発電位を用いた検討～	13
第2章 レミフェンタニルによるイソフルランの minimum alveolar concentration blocking autonomic responses (MAC-BAR) 減少作用の比較	17
第3章 functional MRI を用いた疼痛関連脳賦活化領域の同定と レミフェンタニルの賦活化抑制作用の比較	20
第4章 μ オピオイド受容体の発現量および発現部位の比較	24
総括	28
謝辞	34
参考文献	35

序言

国際疼痛学会 (International Association for the Study of Pain: IASP) は痛みを「An unpleasant sensory and emotional experience associated with actual or potential tissue damage, or described in terms of such damage」と定義し、感覚と情動を合わせた体験であるとした。疼痛はその原因により侵害受容性疼痛、神経因性疼痛、心因性疼痛に、持続期間により急性痛、慢性痛に、部位により体性痛、内臓痛に分けられる。これらの中で周術期において問題となるのは、実質的な組織の傷害、もしくは傷害を生じる可能性のある刺激による急性の侵害受容性疼痛である。

侵害受容性疼痛は、まず組織損傷に伴う侵害刺激により末梢の侵害受容器が興奮することから始まる。侵害受容器は一次感覚神経（一次求心性神経）のうち、侵害受容線維であるA δ 線維およびC線維の自由終末に存在する。このうち、主に速く鋭い痛み（fast pain または一次痛）を伝える有髄のA δ 線維は、侵害機械刺激に特異的に反応する高閾値機械受容器を持つ。一方、遅く鈍い痛み（slow pain または二次痛）を伝えるC線維は、機械刺激のほか熱刺激および化学物質による刺激など多種類の侵害刺激に反応するポリモーダル受容器を持つ。ポリモーダル受容器は数多くの化学物質、具体的にはブラジキニンなどの発痛物質や、プロスタグランジンなどの発痛増強物質等に反応する。

一次感覚神経の自由終末には様々な受容器が存在するが、その多くは陽イオンチャンネルであり、侵害刺激によりCa²⁺やNa⁺が細胞内に流入する。細胞内に流入した陽イオンはチャンネル周辺の膜電位を上昇させ、この膜電位が閾値を越えると活動電位が発生し、刺激が中枢に向けて伝導される(Cortright et al., 2007)。これらの数多く存在する侵害受容器の中で、TRP (transient receptor potential) チャンネルが中心的役割を果たしていると考えられている。TRPチャンネルは数多くのサブタイプからなるスーパーファミリーを形成しており、熱刺激、カプサイシン、pHで活性化されるTRPV1や、冷刺激、ワサビの

成分等で活性化されるTRPA1などが含まれる(Caterina et al., 2000)。機械刺激に対する受容器についても様々な検討が行われているが、現時点では決定的な結論は得られていない(Chen et al., 2002)。

侵害受容線維から脊髄背角に到着した侵害刺激のシグナルにより、軸索末端（シナプス前膜）から興奮性アミノ酸のグルタミン酸や神経ペプチドであるサブスタンスPなどの神経伝達物質が、脊髄を上行する二次感覚神経とのシナプス間隙に放出され、刺激の伝達が行われる。A δ 線維の場合は興奮性アミノ酸が、C線維からは興奮性アミノ酸および神経ペプチドが放出される。放出された神経伝達物質がシナプス後膜に存在するAMPA受容体やNMDA受容体およびNK1受容体等に結合することで、二次感覚神経へと刺激が伝達される。この脊髄上行路には脊髄視床路、脊髄網様体路、脊髄中脳路などいくつかの経路があり、これらの二次感覚神経は脳幹および視床へ連絡する。その内、視床に達した刺激は大腦皮質および大腦辺縁系に投射され、ここで初めて痛みとして認知される (Fig. 1-1)。

大腦に伝達された侵害刺激のシグナルは痛みの感覚面の変化（痛み刺激の分別）のみならず、同時に不快、恐怖、嫌悪および沈鬱などの情動面の変化も引き起こす(Tracey and Mantyh, 2007)。体性感覚野など大腦皮質の一部では、痛みがどの部位に生じているのか、痛みの強さはどの程度か、どのような種類の痛みなのかなど痛みの感覚の識別を行う。一方、扁桃体、帯状回および島皮質など大腦辺縁系の一部は痛みの情動面に関与する。情動の変化は痛みに関連した危機回避反応に関わっており、扁桃体や帯状回を損傷した場合、侵害刺激を識別することはできるものの、それを恐怖・不快とは感じず、回避行動を取らなくなる(Pastoriza et al., 1996)。

痛みは個体が重大な損傷から逃避したり、痛みが生じるような危険を避けたりするための重要な生体機能の一つであるが、生体には痛みから身体を守るために、痛みの伝達

を抑制する内因性抑制機構も存在する。Melzackらは、侵害刺激のシグナルが侵害受容線維から脊髄の二次感覚神経に伝達される際に、非侵害受容刺激（触覚）を伝える一次感覚神経であるA β 線維の興奮が同時に生じた場合、脊髄背角膠様質の神経が二次感覚神経への伝達のゲートを閉じ、侵害刺激の伝達が軽減されるというゲートコントロール理論を発表した(Melzack and Wall, 1965)。この説により、「患部をさすとなぜ痛みが和らぐのか」という疑問に対する答えが示された。

またその後、中枢から末梢へ痛みの抑制や修飾をトップダウンに行う下行性抑制（調節）系の存在が解明された。下行性抑制系には 中脳水道周囲灰白質が中心的な役割を果たしており、視床下部、扁桃体、帯状皮質からの神経線維が入力している。下行性抑制系にはセロトニン作動性神経とノルアドレナリン作動性神経が含まれる。中脳水道周囲灰白質に刺激が加わると橋の吻側延髄腹内側からセロトニンが放出され脊髄背角における侵害刺激伝達の抑制が生じる。また、アドレナリン作動性下行性神経は橋の青斑核に細胞体が集まっており、この神経の刺激により放出されたノルアドレナリンは、脊髄背角の一次-二次感覚神経のシナプス前後膜の α_2 アドレナリン受容体に作用して侵害刺激の伝達を抑制する(Heinricher et al., 2009)。

上述のように痛みは生体の組織の傷害もしくは傷害の可能性に対し警告を発する重要な役割を果たし、生体防御の上で必要不可欠な生理反応である。また、痛みは様々な神経内分泌反応を誘導し、侵襲に対応するよう生体の内部環境を調整することで、恒常性を維持する働きがある。しかし、過剰な痛みや持続する痛みは、精神的、肉体的な苦痛をもたらすばかりでなく、不十分な鎮痛は患者の予後にまで影響する可能性がある(Biki et al., 2008)。

生体に侵害刺激が加わると、生体の損傷を軽減するための様々な生体の防御機能が誘導され、行動の変化や交感神経反応、内分泌反応などが引き起こされる。末梢に生じた

侵害刺激のシグナルは脊髄における屈曲反射などの単シナプス性の反射から、大脳を介した逃避行動など様々な行動変化を生じさせる。交感神経反応としては侵害刺激のシグナルがそれぞれの臓器の交感神経枝に伝達されることで心拍数や血圧の上昇などの体性-自律神経反射が誘発される。また、内分泌反応として、副腎髄質からのカテコラミン放出の増加や、視床下部を介したコルチゾール、甲状腺ホルモン、抗利尿ホルモンなどの放出の増強が生じる(Clarke, 1970; Halter and Pflug, 1980; Reier et al., 1973; Roizen et al., 1981)。これらの反応は、疼痛の有無あるいはその程度を判断するために利用することもできる。特に、言語によるコミュニケーションが不可能な動物を用いた実験において痛みを評価する際の、大変重要な手がかりとなる。例えば、行動学的指標を用いた方法として、テイルフリック試験などの脊髄反射を指標とする評価法や、ホットプレート試験で観察される逃避行動を指標とした評価法が疼痛および鎮痛の研究に用いられている。

これらの侵害刺激により生じる様々な反応は、生体防御の上で必要不可欠なものであるが、一方で過剰な痛み、遷延する痛みにより生じる反応は生体に大きな負担となるため、これを防御することは利益をもたらすと考えられる。実際、手術中の侵害刺激により誘発される血圧の上昇に対し、適切な血圧を維持するよう治療を行なった患者では、治療を行わなかった患者に比べ、術後に生じる心筋虚血の発生率が有意に低かったことや、開胸、開腹手術や心血管系の手術などの侵襲の強い手術を行った症例のうち、術後の尿中コルチゾール排泄量が少ない患者では、排泄量が多い患者に比べ術後の合併症の発生率が低く、入院期間が短い傾向があったことが報告されている(Stone et al., 1988; Yeager et al., 1987)。

このように生体防御反応を超えた過剰な痛みは、苦痛であるばかりでなく生体に大きな負担となる。そのため昔から、様々な鎮痛作用を持つ薬剤が用いられてきた。特にケ

シに含まれる成分は、古代から強い鎮痛作用を持つことが知られており、数千年前にはすでにケシの実から取れる液体を、鎮痛および睡眠作用のある薬として治療に用いていた。ケシの実から取れる乳液を乾燥させた粉末はアヘンと呼ばれ、その中にはモルヒネ、コデイン、テバイン、パパベリンなど20種類以上のアルカロイドが含まれている。オピオイドとは、オピオイド受容体に結合し、モルヒネ様作用を発揮する天然または合成の薬剤、内因性ペプチドおよびそれらの拮抗物質の総称であり、これらの化学物質は現代においても鎮痛薬や睡眠薬などとして、世界中で広く利用されている。

1970年代初頭に脳細胞膜の薬物受容体として初めてオピオイド結合受容体が同定され、1975年には内因性のオピオイドペプチドであるメチオニンエンケファリンおよびロイシンエンケファリンが発見された。外因性のオピオイドとしては、1800年代前半に、アヘンから1種のアルカロイドが単離され、この化合物はモルヒネと名づけられた。モルヒネは強力な鎮痛作用を持ち、重度の疼痛に対する優れた鎮痛薬として多用された。一方でモルヒネは嘔吐、掻痒、ヒスタミン遊離作用など様々な副作用も多く、临床上重要な問題となっていた。そこで、鎮痛作用の強化と副作用の軽減を求めて、より安全で利用しやすい合成オピオイドの開発が進められ、現在では多様なオピオイドが医療現場で用いられるようになった。1960年台初頭には合成 μ オピオイド受容体作動薬であるフェンタニルが開発された(Janssen et al., 1963)。フェンタニルはモルヒネの約100倍の力価を持つとされる。また半減期が短く、嘔吐などの副作用もモルヒネに比べて少ないため、術中および術後の鎮痛薬として広く普及している。さらに、1991年には超短時間作用型 μ オピオイド受容体作動薬のレミフェンタニルが開発された。レミフェンタニルは力価がフェンタニルの1/2程度とされるが、その分解は肝臓に依存せず、血中の非特異的エステラーゼにより代謝されるため、半減期がフェンタニルと比べても非常に短いため、持続投与時の効果部位濃度の調節がより簡便で、術中の鎮痛にフェンタニルとともに広く使用されている(James et al., 1991)。強力な鎮痛作用をもつこれら μ オピオイド受容

体作動薬は、現在のバランス麻酔の概念に基づく周術期の麻酔管理に必要不可欠な薬剤となっている。

オピオイド受容体にはそれぞれモルヒネ (morphine)、ケトサイクラゾシン (ketocyclazocine) および[l-Ala²]エンケファリンが特異的に結合する、 μ 、 κ 、 δ の3種類の受容体が存在する(Mansour et al., 1995a)。1990年代前半には、マウスから μ 、 κ 、 δ の3種類の受容体のcDNAがクローニングされた(Chen et al., 1993; Evans et al., 1992; Yasuda et al., 1993)。オピオイド受容体はいずれもGタンパク質共役型7回膜貫通型受容体であり、Giタンパクを介したアデニル酸シクラーゼ活性の抑制による細胞内cAMP生成量の減少およびGoタンパクを介したK⁺チャネルの開口促進や、Ca²⁺チャネルの開口作用を示す(Minami and Satoh, 1995)。

μ 、 κ 、 δ の3種のオピオイド受容体はいずれも鎮痛作用へ関与していると考えられるが、最も強い鎮痛作用を発現し、臨床上重要な役割を果たすのは μ オピオイド受容体作動薬（以下 μ オピオイド）である。現在、本邦において周術期に一般的に用いられるモルヒネ、フェンタニル、レミフェンタニルの主要な標的受容体はすべて μ オピオイド受容体である。

μ オピオイドの鎮痛作用は、末梢および中枢神経系の様々な部位に存在する μ オピオイド受容体を介して発現する。 μ オピオイドの鎮痛作用の主な発現機序は以下の3点である。(Fig. 1-1)

- ① 脊髄背角の一次-二次感覚神経のシナプスにおける、シナプス前膜からのグルタミン酸などの痛覚伝達物質の放出抑制（前膜抑制）およびシナプス後膜の興奮の抑制（後膜抑制）(Fields, 2004)。
- ② 視床中継核群、視床下部、大脳疼痛関連領域における痛覚情報の伝達抑制(Aziz and Ahmad, 2014; Jensen, 1997; Jones et al., 2004)。

- ③ 中脳および延髄における下行性抑制系の活性化(Heinricher et al., 2009; L.D. Aimone et al., 1987)。

また、これらの他に μ オピオイドの鎮痛作用の発現機序に関するいくつかの機序が提唱されている。フェンタニルは神経細胞における活動電位の軸索伝導に主要な役割を果たす電位依存性 Na^+ チャンネルに作用し、伝導の抑制を引き起こすことが報告されているが、この作用は μ オピオイド受容体を介さない作用であり、フェンタニルにのみ特異的な作用であるとされる(Hashimoto et al., 2009)。また、 μ オピオイド受容体は一次感覚神経や二次感覚神経などの、侵害刺激の上行性伝導路にあたる神経細胞の軸索にも多数発現していることが知られており、軸索のオピオイド受容体の鎮痛への関与が示唆されているが、鎮痛作用の有無に関しては未だ議論が続いている(Aicher et al., 2001; Mambretti et al., 2016)。

また、各オピオイド受容体は中枢神経の鎮痛以外の機能に関わる部位にも広く分布しており、鎮痛作用の他にも、鎮静作用、多幸感、せん妄、呼吸抑制作用、ヒスタミン遊離作用、鎮咳作用、消化管蠕動抑制作用、利尿作用、縮瞳、徐脈など様々な生理作用を有する(McNicol et al., 2003)。

近年、犬および猫は、愛玩動物としてより、人間とさらに深く結びついた伴侶動物としての性格が強まっている。一方で、獣医療の進歩に伴い高度かつ侵襲の大きな手術が数多く行われているほか、動物の高齢化に伴い癌などの強い痛みを伴う疾患が増加しており、動物の痛みに対する関心や疼痛管理の重要性が非常に高くなっている。現在、 μ オピオイドは小動物臨床において最も有効な鎮痛薬の一つであり、人の医療と同様に、周術期における鎮痛薬あるいは麻酔前投与薬として広く用いられている(Epstein et al., 2015)。しかし、 μ オピオイドは主作用である鎮痛作用および副作用に比較的大きな動物種差が認められることが知られており、特に猫については副作用、鎮痛作用の不確実

性から使用をためらう臨床獣医師が少なくない(Kamata et al., 2012)。例えば、副作用の種差として、人、犬および猿では鎮痛作用以外に鎮静作用が発現するが、猫、馬、ラットおよびマウスでは鎮痛作用以外に興奮作用が発現しやすいとされている(Simon et al., 1973)。また、オピオイドの主作用である鎮痛作用についても種差が報告されている。Minimum Alveolar Concentration (MAC) は50%の個体で侵害刺激に対して体動が消失する吸入麻酔薬の濃度で、MACは鎮痛薬により減少することが知られており、鎮痛薬の薬力学評価の指標に用いられる(McEwan et al., 1993)。レミフェンタニルを静脈内投与した際の犬と猫のイソフルランのMAC減少効果を比較してみると、犬では最大63%の減少が得られるが、猫では有意な減少は認められない(Brosnan et al., 2009; Michelsen et al., 1996)。MAC減少効果を指標とした場合、レミフェンタニルの鎮痛効果は犬と猫で大きく異なり、この点からは犬に比べ猫では鎮痛作用が非常に弱いと考えられる。

しかし、一方では μ オピオイドの投与により猫でも鎮痛効果が得られるとの報告もある。侵害刺激による逃避行動を指標とした場合、犬と同様に、猫においても鎮痛効果が認められている。フェンタニルをはじめとした μ オピオイドを犬に静脈内投与すると、侵害刺激を加えられてから逃避行動を示すまでの潜時が有意に延長する(Wegner et al., 2008)。これと同様に、猫においてもフェンタニルおよびレミフェンタニルを静脈内投与した場合、侵害刺激による逃避行動までの閾値が有意に上昇する(Ambros et al., 2014; Brosnan et al., 2009)。

このように犬と猫の鎮痛作用を比較すると、種差が存在する場合と存在しない場合があるが、オピオイドの鎮痛作用についてはこれ以上の十分な検討がされておらず、結論が得られていない。そのため、小動物臨床においてオピオイドの情報の不確実性を懸念する獣医師は多く、猫に対する周術期のオピオイドの使用を躊躇する要因の一つとなっている(Capner et al., 1999; Kamata et al., 2012)。

これまでの報告においてオピオイドの鎮痛効果の種差に不一致を生じた要因の一つとして、鎮痛の評価手法の違いが考えられる。MACの測定に用いられる体動は、除脳した動物においても観察される反応であることから、脊髄レベルにおける反射の影響が大きいと考えられる(Antognini et al., 2005; Rampil, 1994)。一方、大脳の一部を切除した動物では、侵害刺激による逃避行動を示すまでの潜時が有意に延長することから、逃避行動は上位中枢を介した反応であると言える(Pastoriza et al., 1996)。つまり、MACと逃避行動では、痛みの伝導経路 (pain pathway) 上の異なるレベルにおける反応を評価していると言える (Fig. 1-2)。

そこで本研究は、犬と猫では μ オピオイドが鎮痛作用を発現する部位が異なるという仮説を立て以下の検討を行った。

まず、第1章では痛みがpain pathwayを上行する際の一つ目の μ オピオイドの作用点である脊髄における犬と猫の侵害刺激伝達抑制作用を比較した。侵害刺激により誘発される脊髄の二次感覚神経の電位変化を記録することで、脊髄における神経活動を直接評価した。

次に第2章では刺激の視床への入力の中継する、脳幹の反応を指標として犬と猫の侵害刺激伝達抑制作用を比較した。脳幹における神経活動を直接モニターすることは難しいため、延髄に調節中枢がある体性-交感神経反応を指標とした際の μ オピオイドの吸入麻酔薬必要量の減少作用を犬と猫で比較した。

さらに第3章では、pain pathwayを上行した痛みが最終的に入力される大脳を中心とした、脳レベルに至るまでの犬と猫の侵害刺激伝達抑制作用を比較した。脳機能画像法の一つであるfunctional Magnetic Resonance Imaging (fMRI) 法にて侵害刺激による犬と猫の脳組織の賦活化を測定し、それに対する μ オピオイドの抑制作用を評価した。

最後に第4章では、 μ オピオイド受容体の分布に着目し、犬と猫で μ オピオイドの作用に種差を生じる要因の探索のため、脳、脊髄および一次感覚神経の受容体分布を犬と猫で比較した。

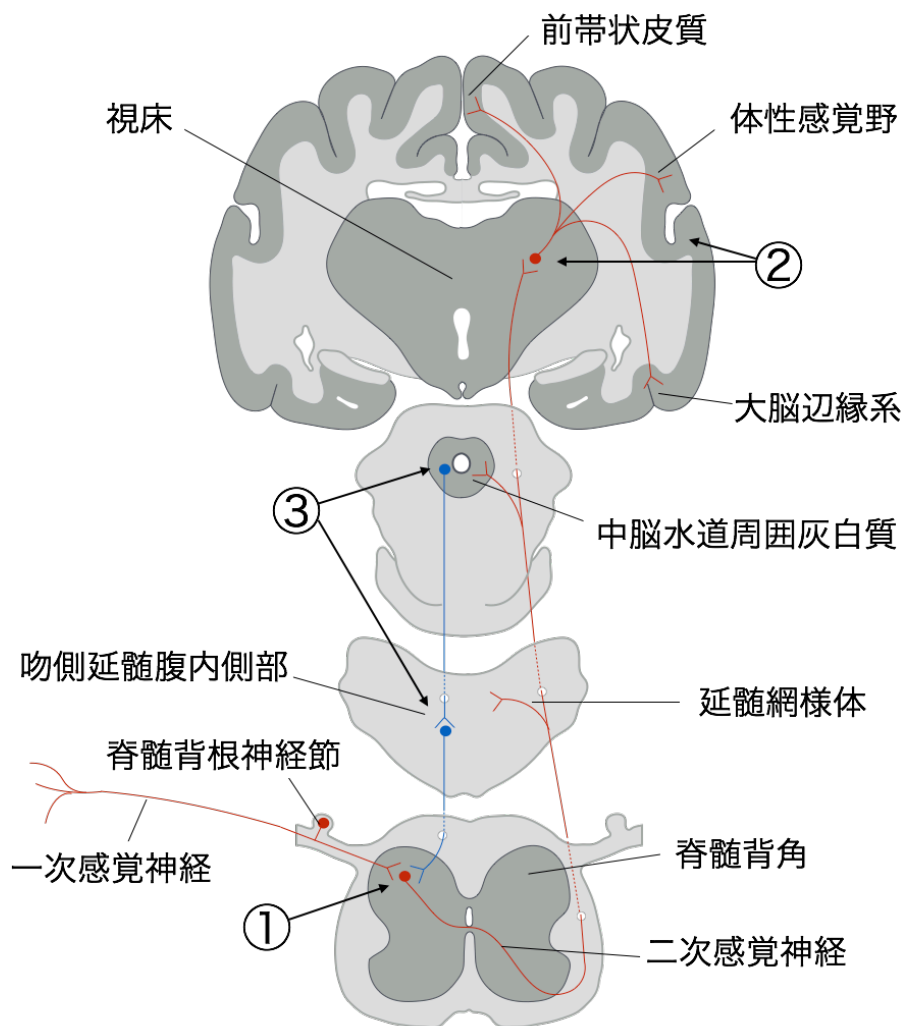


Fig. 1-1. 侵害刺激の上行路（赤線）および下行性抑制路（青線）

①～③はμオピオイド受容体作動薬の鎮痛作用の主な作用点を示す

①：脊髄背角における伝達抑制

②：視床および大脳における伝達抑制

③：中脳および延髄における下行性抑制系の活性化

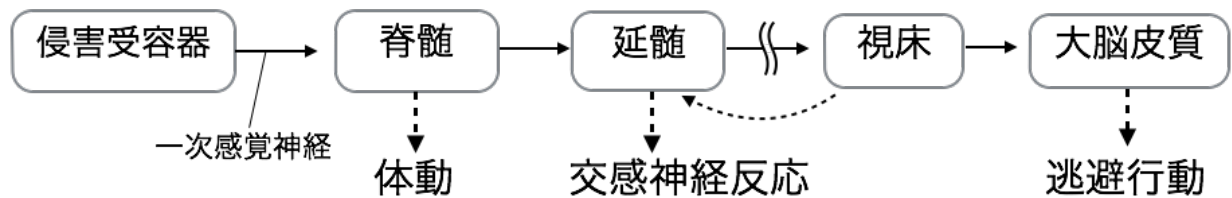


Fig. 1-2. 侵害刺激の上行路およびそれぞれの部位を介して現れる変化

侵害刺激による体動の有無には脊髓における反射が大きく影響する。

延髄に入力した侵害刺激のシグナルは延髄の循環調節中枢に作用し、心臓および血管の交感神経反応を惹起する。この反応は視床を介した調節も受ける。

逃避行動などの複雑な反応は大腦皮質を介して現れる。

第 1 章

脊髄レベルにおけるレミフェンタニルの侵害刺激伝達抑制作用の比較 ～疼痛関連体性感覚誘発電位を用いた検討～

μ オピオイドの中枢性鎮痛作用の発現機序は主に 3 つの経路に大別される。末梢から大脳皮質に向けて上行する侵害刺激の脊髄における一次感覚神経から二次感覚神経へのシナプス間伝達の直接抑制、さらに脳幹を経て上行した刺激の視床および大脳における伝達抑制、および中脳・延髄領域を介した下行性抑制系の活性化である(Jensen, 1997)。これらの内、脊髄レベルにおける伝達抑制は、侵害刺激を最も遠位においてブロックできるため、脊髄反射も含めた周術期の有害事象を防止するために最も重要な μ オピオイドの作用点と言える。

一次感覚神経のうち、侵害刺激を脊髄に伝える侵害受容性線維として A δ 線維と C 線維が存在する。これらの線維の末端は組織内にて自由終末を形成しており、A δ 線維は鋭く早い痛みを、C 線維は鈍く遅い痛みのシグナルを伝導する。一方、侵害受容線維の中枢側の軸索末端は脊髄背角において二次感覚神経とシナプスを形成している。脊髄において侵害刺激のシグナルは、シナプス間伝達を経て、上位中枢へと情報を伝えると同時に、介在神経を介して、運動ニューロンの興奮を惹起し、体動などの侵害反射を引き起こす。

疼痛の程度および鎮痛薬の作用を評価する際の指標として、侵害刺激に対する体動の有無が以前から用いられてきた。minimal alveolar concentration (MAC) は侵害刺激に対して 50% の患者で手術時の侵害刺激に対する体動を抑制できる吸入麻酔薬濃度のことと、麻酔薬による体動の抑制をエンドポイントとした際の ED50 に相当する。MAC は

吸入麻酔の作用のうち、脊髄を中心とした作用を中心に評価していることが近年の研究により明らかとなっている(Rampil, 1994)。

MAC は鎮痛薬により用量依存的な減少を示すことが知られており、鎮痛薬を併用することにより MAC の低下が認められた場合、併用した薬剤による侵害刺激の遮断による MAC の低下と判断できるため、薬剤の侵害刺激伝達抑制作用を間接的に評価することが可能であると考えられる(McEwan et al., 1993)。

人では μ オピオイド受容体作動薬であるレミフェンタニルの投与により MAC を最大 91% 減少することができ、また犬では最大 63% の減少が得られると報告されている(Lang et al., 1996; Michelsen et al., 1996)。一方、猫ではレミフェンタニルによる MAC 抑制は最大 30% の減少にとどまり、また、報告によっては有意な減少は認められなかったとしている(Brosnan et al., 2009; Ferreira et al., 2009)。このように猫ではレミフェンタニルによるイソフルランの MAC 減少作用が犬に比べ大幅に小さいが、犬と猫でレミフェンタニルによる吸入麻酔薬の MAC 減少作用に種差を生じる要因は解明されていない。

この種差を生じる要因の一つとして、 μ オピオイドによる脊髄背角における侵害刺激伝達抑制作用の強度の差が考えられる。MAC の指標として用いられる侵害刺激による体動は、脊髄と脳を分断した動物や徐脳した動物においても認められ、脊髄における反射の影響を大きく受けると考えられる(Antognini et al., 2005; Rampil, 1994)。これらのことから、 μ オピオイドの脊髄背角における侵害刺激の伝達抑制作用が犬に比べ猫で弱いため、MAC 減少効果が得られない可能性が考えられる。しかし、犬と猫で μ オピオイドの侵害刺激伝達抑制作用を脊髄レベルにおいて評価した報告はなく、詳細は不明である。

侵害刺激による脊髄の活動電位を評価する手法として、体性感覚誘発電位 (Somatosensory Evoked Potential : SEP) 検査法がある。SEP 検査は末梢に入力された刺激による求心性神経の電位変化を記録する手法で、人医領域では末梢神経から脊髄、脳に至るまでの神経の機能障害の検索に広く用いられている。さらに近年、皮内に存在する感覚受容器のうち A δ 線維および C 線維の侵害受容器を選択的に刺激することのできる表面刺激電極が開発され、侵害受容神経の刺激による疼痛関連体性感覚誘発電位の測定が可能となった(Inui and Kakigi, 2012)。この疼痛関連体性感覚誘発電位を用いて、オピオイドやリドカインによる SEP の電位変化抑制作用がそれぞれ馬と人で報告されている(Kodaira et al., 2014; Van Loon et al., 2010)。

そこで本章では、表面刺激電極を用いた表皮内電気刺激法により後肢を刺激し、刺激により生じた脊髄の誘発電位に対する μ オピオイド受容体作動薬レミフェンタニルの影響を犬と猫で評価することで、脊髄背角におけるオピオイドの侵害刺激伝達抑制作用を犬と猫で比較した。

本章以降の内容は、学术论文として出版する計画があるため公表できない。
2年以内に公表予定。

第 2 章

レミフェンタニルによるイソフルランの minimum alveolar concentration blocking autonomic responses (MAC-BAR)

減少作用の比較

第 1 章でも述べたように、吸入麻酔薬の力価や、これに対する鎮痛薬等の効果判定を行う際の指標として、吸入麻酔薬の最小肺胞内濃度 (minimum alveolar concentration) が用いられてきた。この最小肺胞内濃度を求める際のエンドポイントとして、手術時の麻酔・鎮痛に求められる、いくつかの異なる反応が用いられている。具体的には、手術刺激に対して体動がない、脈拍数・血圧が上昇しない、覚醒しないなどであり、これらのエンドポイントを達成するための最小肺胞内濃度はそれぞれ異なり、人ではハロタン、亜酸化窒素の併用による吸入麻酔では MAC-BAR (blocking autonomic response) は MAC の約 1.5 倍であるとされている (Roizen et al., 1981)。MAC は手術刺激に対して体動が生じないというエンドポイントを用いて決定されるのに対し、MAC-BAR は 50% の個体で手術侵襲に対して血圧の上昇、脈拍数の増加を防ぐことのできる吸入麻酔薬の肺胞内濃度のこと、自律神経反応が生じないというエンドポイントを用いて決定される。MAC と同様に MAC-BAR もオピオイドの投与により低下することが知られているが (Albertin et al., 2006; Daniel et al., 1998; Katoh et al., 1999)、その低下パターンは異なっており、フェンニタルの投与による MAC-BAR の低下は、MAC の低下に比べより急峻で、フェンタニル濃度の上昇により両者の差は無くなる (Katoh et al., 1999)。つまり、両者のエンドポイントの作用機序は同じではないことを示唆している。

自律神経反応は脊髄および脳幹に反射中枢があり、さらに上位にある視床下部や大脳辺縁系からの様々な調節を受ける。MAC-BAR の指標である、侵害刺激に対する体性-交感神経反応も、脊髄性および延髄性の反射が存在するが、皮膚の侵害刺激に対する循環系の反応は延髄を介して誘発される(Sato and Schmidt, 1973)。脊髄背角から上行する侵害刺激の一部は腕傍核、孤束核および中脳などに側枝を介して投射されるが、投射を受けた延髄の孤束核は、侵害刺激による循環系の自律神経反応を惹起し、また、その調節を行う。次に孤束核から延髄網様体の心臓血管中枢への投射が生じ、これにより心臓及び血管に投射する交感神経が活性化され、様々な循環反応が開始される(Benarroch, 2001)。

第 1 章の結果から、脊髄レベルにおける μ オピオイドの侵害刺激伝達抑制作用は、犬と猫で異なることが示唆された。脊髄を上行した侵害刺激のインパルスに対する μ オピオイドの次の重要な鎮痛のターゲットは脳幹レベルであると考えられる。第 1 章で用いた SEP 検査は神経活動を評価する上で有用な検査法であるが、解剖学的な理由および SEP の空間分析能の限界により脳幹の神経活動の評価に用いることができず、侵害刺激による脳幹の神経活動を直接評価することは難しい。しかし、延髄を介した侵害刺激による交感神経反応（心拍数および血圧の変化）を指標とすることで、延髄レベルに至るまでのオピオイドの侵害刺激伝達抑制作用を間接的に推測することが可能である。

犬や猫においても、オピオイドによる MAC-BAR の減少作用は、延髄レベルにおけるオピオイドの鎮痛作用を評価する上で有効な手法であると思われるが、犬と猫における μ オピオイドの MAC-BAR 減少作用を検討した報告はこれまでにない。本章では犬と猫のレミフェンタニルによるイソフルラン MAC-BAR 減少作用を検討することにより、延髄レベルに至るまでの μ オピオイドの鎮痛効果の比較を行う。

本章以降の内容は、学術論文として出版する計画があるため公表できない。

2年以内に公表予定。

第3章

functional MRI を用いた疼痛関連脳賦活化領域の同定と レミフェンタニルの賦活化抑制作用の比較

第1章および第2章では、オピオイド鎮痛薬の作用点のうち、脊髄レベルから延髄レベルまでの μ オピオイドの侵害刺激抑制作用は犬に比べて猫で弱いことが示唆された。しかし、これらに加え、より上位における μ オピオイドの主要な作用点である、視床および大脳における作用については明らかとなっていない。

Brosnanらは猫において侵害刺激に対するレミフェンタニルの抑制作用について検討したところ、機械刺激に対する体動の抑制は得られなかったが、熱刺激に対する逃避行動は抑制されたことを報告している(Brosnan et al., 2009)。また、Ambrosらは猫において、フェンタニルの静脈内投与による機械刺激に対する逃避行動の抑制を報告している(Ambros et al., 2014)。逃避行動は大脳を介した行動であり、体動は脊髄における反射の影響が大きいことが知られている(Pastoriza et al., 1996)。すなわち、第1章の検討で示されたように、猫において μ オピオイドは脊髄レベルでの作用は犬に比べて大幅に弱い、大脳レベルでは有意に作用している可能性が考えられる。

末梢の侵害受容器から上行し視床に達した興奮は大脳皮質および大脳辺縁系に投射され、最終的に痛みとして処理される。痛みは感覚や情動の変化を伴った、多面的で複雑な現象であり、その処理には脳の大脳の広範な領域が関係する(Tracey and Mantyh, 2007)。この痛みに関わる脳領域は「疼痛関連領域」と呼ばれ、体性感覚野、島皮質、前帯状皮質、大脳基底核、視床、中脳および小脳が含まれる。このような変化を生体でリアルタイムにとらえようとする研究が、主に人と齧歯類を対象として positron emission

tomography (PET)、functional magnetic resonance imaging (fMRI)、electroencephalogram (EEG) や magnetoencephalography (MEG)を用いて行われてきた(Apkarian et al., 2005)。この中で fMRI は脳局所の血流の変化および酸素代謝の変化による MR 信号の変化、いわゆる BOLD 反応を測定する技術である(Ogawa and Lee, 1990)。fMRI は特定の刺激により賦活化する脳局所の同定に優れた特性を持つ。また、PET と比較した際の fMRI の利点として、放射線を用いることがなく、繰り返しの撮像が可能である点が挙げられ、さらに、fMRI は数秒単位の時間分解能と 1mm 単位の空間分解能を有するという特徴を持つため、痛みに関する研究では最も利用価値が高い。この fMRI を用いた研究により人および齧歯類の脳における疼痛関連領域の解明が進んでいる。さらに fMRI は、人や齧歯類を対象として侵害刺激に対する NSAIDs、リドカインおよびオピオイドなどの鎮痛薬の力学的評価にも用いられている(Luo et al., 2009; Sanders et al., 2015)。

オピオイド受容体は脳に広範に分布しており、視床中継核、視床下部および大脳知覚領などにおいて侵害刺激の伝達を抑制するほか、中脳や延髄領域に存在する μ 受容体を介して下行性抑制系を活性化する(Inoue et al., 2013; Jensen, 1997)。人および齧歯類において、オピオイドの投与により侵害刺激による体性感覚野、島皮質および帯状皮質における fMRI の BOLD 効果が抑制されることが知られており、特に体性感覚野における BOLD 信号の変化が脳における疼痛および鎮痛のマーカーとして優れている(Becerra et al., 2006; Chang and Shyu, 2001; Oertel et al., 2008; Tracey et al., 2000; Wise et al., 2002)。

しかし、犬と猫において fMRI を用いた脳研究の研究は限られており、視覚刺激、聴覚刺激、嗅覚刺激に関する研究がある程度である(Hall and Lomber, 2015; Jezzard et al., 1997; Jia et al., 2014)。侵害刺激に関しては猫において慢性疼痛による脳反応の変化に

関して PET を用いて検討した結果が報告されているのみである (Guillot et al., 2015)。このように、侵害刺激による脳の賦活化を犬と猫において fMRI を用いて検討した報告は無く、侵害刺激に関連する脳領域の変化・反応はほとんど解明されていない。

そこで本章では、fMRI により犬と猫で侵害刺激により賦活化する脳領域の同定を行い、さらに賦活化が生じた領域を対象としてレミフェンタニルが脳の疼痛反応に与える影響を犬と猫で評価した。

本章以降の内容は、学術論文として出版する計画があるため公表できない。

2年以内に公表予定。

第4章

μ オピオイド受容体の発現量および発現部位の比較

第1章から第3章において、犬と猫の侵害刺激伝達経路における μ オピオイドの侵害刺激伝達抑制作用を比較した。その結果、第1章では脊髄における μ オピオイドの侵害刺激伝達抑制作用が犬と猫で異なり、猫で大幅に弱いことが明らかとなった。また、第2章で延髄レベルの評価を行った場合でも、 μ オピオイドの抑制作用は犬に比べ猫で弱かった。一方、第3章で μ オピオイドが侵害刺激による大脳レベルの反応に与える影響を検討したところ、犬と猫で同等の賦活化抑制が認められた。このように犬と猫では μ オピオイドの主要な作用部位が異なる可能性が示唆された。

μ オピオイドは鎮痛作用以外の副作用においても種差があることが知られている。フェンタニルを投与した場合、犬では活動性が低下するが、猫では高用量の投与により一時的な活動性の上昇が認められる。また、多幸感¹は猫で強く発現するが、呼吸抑制は犬で強く発現するなどの違いがある(Kamata et al., 2012)。

このように犬と猫ではオピオイドの鎮痛作用および副作用に種差があり、また種差の有無は作用部位によっても異なっていることが明らかとなった。しかし、そのような種差を生じる要因はわかっていない。

μ オピオイド受容体のリガンドを脳の各領域に結合させた場合、それぞれの脳領域への結合量は動物種により異なる(Hellyer et al., 2003; Williams et al., 2005)。この動物種差を生じる要因として、 μ オピオイド受容体の発現量・発現部位または受容体構造の種差などが考えられる。

まず、受容体の構造について、 μ オピオイド受容体のアミノ酸配列を複数の動物種を含めて比べてみると、犬と猫のアミノ酸配列は非常に類似しており、受容体の構造およびリガンドの結合性に大きな違いはないと考えられ、犬と猫の種差を生じる要因である可能性は低いと思われる (Fig. 5-1)。

一方、猿とラットの脳における μ オピオイド受容体の発現パターンを比較した研究では、猿では視床下部の正中隆起付近に受容体の発現が認められるのに対し、ラットでは明らかな発現は認められなかった (Mansour et al., 1988)。また、ラットではモルモットとウサギに比べ海馬における μ オピオイド受容体の濃度が高い等、脳の各領域におけるオピオイド受容体の分布傾向も動物種により異なることが示されている (Robson et al., 1985)。

また、オピオイド受容体は中枢神経に加え、一次感覚神経にも発現している。一次感覚神経は偽単極細胞であり、脊髄背根神経節に細胞体が存在する。脊髄背根神経節で合成されたオピオイド受容体は軸索を移動し、脊髄背角で侵害刺激伝達の前膜抑制を行う。一次感覚神経は μ オピオイド受容体作動薬の主要な作用点の一つであり、オピオイドは一次感覚神経のシナプス前膜に作用し、侵害刺激による伝達物資の放出を抑制する。中枢神経に加え、一次感覚神経における μ オピオイド受容体の発現量の差が、種差を生じる要因となる可能性もあるが、一次感覚神経における μ オピオイド受容体の発現量を異なる動物種間で比較した報告は未だない。

今回の第 1～第 3 章の結果も、犬と猫におけるこれらの違いに起因する可能性が考えられる。

以上のことから、第 1～3 章で認められた犬と猫の差異が、脳、脊髄および一次感覚神経における μ オピオイド受容体の発現量、発現部位の差から生じている可能性が考えら

れる。本章では、中枢神経および一次感覚神経における μ オピオイド受容体の発現量および発現部位を犬と猫で比較した。

本章以降の内容は、学術論文として出版する計画があるため公表できない。

2年以内に公表予定。

総括

近年、犬および猫は、愛玩動物としてより、人間とさらに深く結びついた伴侶動物としての性格が強まっている。一方で、獣医療の進歩に伴い高度かつ侵襲の大きな手術が数多く行われているほか、動物の高齢化に伴い癌などの強い痛みを伴う疾患が増加しており、動物の痛みに対する関心や疼痛管理の重要性が非常に高くなっている。

μ オピオイドは非常に強力な鎮痛薬の一つであり、様々な動物種で、周術期の疼痛管理をはじめ、激しい痛みを伴う疾患に対して幅広く用いられている。しかし、 μ オピオイドの鎮痛作用および副作用には比較的大きな動物種差が存在することが知られている。特に猫については副作用や鎮痛作用の不安定性に対する懸念から積極的なオピオイドの使用を躊躇する獣医師が少なくない。例えば、体動を指標とした際の吸入麻酔薬の必要量（MAC）は μ オピオイドの投与により犬では大幅な減少が得られるが、猫ではその効果は大幅に小さい。しかし、侵害刺激による逃避行動の抑制など、鎮痛効果の評価法によっては結果が異なることもあり、オピオイドの種差については未だ不明な点が多い。

このような違いが生じる理由の1つとして、オピオイドの鎮痛効果の評価部位や方法の違いが考えられる。MACの測定に用いられる体動の有無には脊髄における反射の影響が大きく関わる。一方、猫でもオピオイドによる抑制が認められている逃避行動は脳を介した反応であるため、より上位の中枢における反応を評価していると考えられる。

そこで本研究では、 μ オピオイドが鎮痛作用を発現する部位が犬と猫で異なるという仮説を立て、 μ オピオイド受容体作動薬レミフェンタニルの脊髄（第1章）、脳幹（第2章）および大脳（第3章）における鎮痛作用を犬と猫で比較し、第4章では μ オピオイド受容体の中枢神経の各領域および一次感覚神経における発現分布を犬と猫で比較した。

第1章では脊髄レベルにおける鎮痛効果の違いを評価するため、犬と猫で侵害刺激による体性感覚誘発電位を測定し、これに対するレミフェンタニルの影響を犬と猫で比較した。侵害刺激により、犬と猫ともにコントロール群で二峰性の波形が得られた (N1P2 および P2N2)。鋭く早い痛みを伝える A δ 線維由来の電位変化を表すと考えられる N1P2 は犬ではレミフェンタニルの投与により用量依存的な振幅の減少が認められたのに対し、猫では振幅の変化が認められなかった。一方、潜時が長く、鈍く遅い痛みを伝える C 線維由来の電位変化を表すと考えられる P2N2 は犬と猫でともにレミフェンタニルの投与により用量依存的な振幅の減少が認められ、犬では最大 81%、猫では最大 51%の減少を示した。P2N2 の減少率を犬と猫で比較すると投与速度 1.0 および 2.0 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$ では差が認められ、犬でより顕著な抑制が認められた。 μ オピオイドの脊髄レベルにおける侵害刺激伝達抑制作用は、神経線維選択性および強度において種差があり、猫における効果は犬より小さく、特に手術操作のような鋭く早い痛みに対する効果は非常に弱いことが示唆された

第2章では脳幹レベルにおける鎮痛効果の違いを評価するため、侵害刺激に対する交感神経反応の有無をエンドポイントとするイソフルラン MAC-BAR の減少作用を犬と猫で比較した。コントロールにおけるイソフルランの MAC-BAR は犬で 3.09%、猫で 2.57%であった。MAC-BAR はレミフェンタニルの投与により、犬と猫で用量依存的な減少を示したが、50%の個体が薬力学的効果を示すレミフェンタニル投与速度を表す $D_{50\text{Remi}}$ は犬で 0.08 ± 0.14 、猫で 1.02 ± 0.15 と大きく異なった。犬では低用量のレミフェンタニル投与で MAC-BAR は大幅に減少し、投与速度 0.25 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$ でコントロールに比べ 61%の減少を示した。猫ではレミフェンタニルの投与により MAC-BAR は漸減したが、投与速度 0.25 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$ における MAC-BAR の減少率は 23%で、犬のような急激な減少は示さなかった。交感神経反射による延髄を介した循環動態の変化に対する μ オピオイドの抑制作用には、視床下部を介した調節および延髄のオピオイド受容体に対する直

接作用が重要であると考えられる。この脳幹レベルにおけるレミフェンタニルの侵害刺激伝達抑制作用も猫では犬に比べ弱いと考えられた。

第3章では大脳レベルに至るまでのオピオイドの侵害刺激伝達抑制作用を検討するために、侵害刺激による脳組織の賦活化を **functional MRI** を用いて評価し、これに対するレミフェンタニルの影響を犬と猫で比較した。侵害刺激により犬と猫で体性感覚野、頭頂連合野、帯状皮質および小脳に賦活化が認められた。これに加えて犬では扁桃体、視床および中脳において、猫では海馬において賦活化が認められた。これらの賦活化領域は人で痛み関連領域として知られる脳領域と共通する部分が多く、犬と猫でも侵害刺激を受容した際に、痛みの認知および情動に関して、これらの領域で人と類似した処理がなされているものと考えられた。このうち、侵害刺激が最終的に疼痛として認知される体性感覚野においては、レミフェンタニルの投与により犬と猫でともに有意な賦活化の抑制が生じた。犬と猫ともに、大脳レベルでは μ オピオイドは明らかな鎮痛作用を示すことが示唆された。

これらの結果から、末梢から脳幹における μ オピオイド受容体作動薬の侵害刺激伝達抑制作用は猫では犬に比べ大幅に小さいことが示唆された。一方、侵害刺激による大脳の賦活化の抑制は犬と猫で同様に認められた。このような違いが生じる要因を検討するため、第4章では μ オピオイド受容体の発現部位と発現量の犬と猫の比較を行った。その結果、 μ 受容体の発現部位に明らかな違いは認められないものの、一部の領域では受容体の発現量に差が認められた。 μ 受容体 mRNA は一次感覚神経において猫に比べ犬で有意に多く発現しており、 μ 受容体タンパクは脊髄において猫に比べ犬で倍以上の発現が認められた。脊髄背角神経節には一次感覚神経の細胞体が存在し、脊髄では一次感覚神経の軸索末端がシナプスを形成しているため、一次感覚神経における μ 受容体の発現量が猫に比べ犬で多いことが示唆された。また、延髄では μ 受容体 mRNA が猫に比べ犬で約3倍多く発現しており、三叉神経核および弧束核における発現が犬で多いことが示

唆された。一方、視床では μ 受容体 mRNA が犬に比べ猫で有意に多く、タンパク量は猫で倍以上の発現が認められた。

末梢の受容器に入力した侵害刺激は一次感覚神経を上行し、脊髓背角で二次感覚神経とシナプスを形成する。 μ オピオイドはこのシナプス間にて前膜抑制および後膜抑制を行うが、猫では一次感覚神経における μ 受容体が犬に比べて少なく、前膜抑制が犬に比べて弱いため、侵害刺激による脊髓の誘発電位はレミフェンタニルにより、犬でより強く抑制されたと考えられた。

脊髓に入力した侵害刺激のシグナルは脊髓から脳幹を上行して視床に達する。その途中、侵害刺激は延髄の弧束核から網様体の心臓血管中枢へと投射され、交感神経反応を生じる。 μ 受容体 mRNA は延髄において犬で発現が多く、弧束核における受容体量が多いことが示唆された。 μ オピオイドの侵害刺激伝達抑制は、脊髓に加え延髄においても犬でより強いため、特に低用量域におけるレミフェンタニルのMAC-BAR減少が犬でより顕著に生じたと考えられる。

視床に達した侵害刺激は、大脳皮質および大脳辺縁系へ投射する神経へと伝達され、 μ オピオイドはこの伝達を抑制する。視床における μ 受容体の発現量は犬に比べ猫が多かった。functional MRI検査において猫でも体性感覚野の賦活化を有意に抑制したことから、猫のオピオイド受容体は視床から大脳皮質へ侵害刺激を投射する腹側基底核群において強く作用していると考えられた。また、視床の μ 受容体は猫で現れやすい副作用の1つである多幸感の発現にも関与するため、猫では内側中心核や外側視床下部における発現も多いことが疑われた。

以上より、犬と猫ではオピオイドの侵害刺激伝達抑制作用の強度は痛みの上行経路上の各段階によって異なり (Fig. 6-1)、また、作用の強さと受容体の発現量は関連があることが示唆された。犬ではレミフェンタニルの一次感覚神経から脊髓の二次感覚神経へ

の伝達抑制および延髄における伝達抑制が強いため、体動や交感神経反応の抑制作用が得られやすい。一方、猫では脊髄および脳幹における抑制が弱いため、体動や交感神経反応などの減弱効果は得られにくい。視床レベルにおける伝達抑制が強いため、大脳レベルに達して初めて顕著な鎮痛作用が得られると考えられる。そのため、大脳を介する逃避行動の抑制を指標とした場合、猫でも μ オピオイド受容体作動薬による鎮痛効果が認められやすい。これらの結果を踏まえると、猫で周術期における交感神経反応などの脊髄、脳幹レベルにおける有害反応を抑制するためには、脊髄もしくはより遠位に作用点をもつ、神経ブロックやその他補助的な鎮痛薬の併用によるマルチモーダル鎮痛がより有用であると思われる。

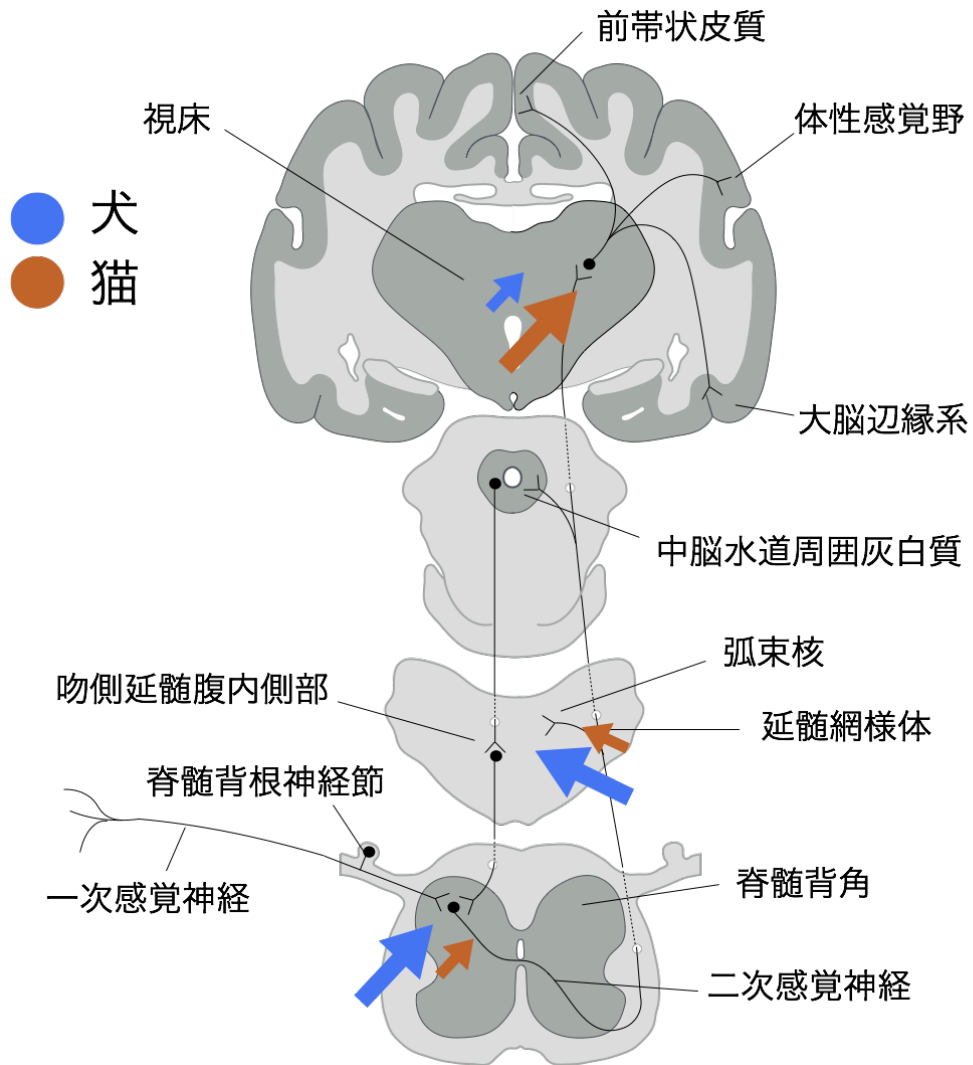


Fig. 6-1. 予測される μ オピオイドの主な作用点
 矢印の大小は犬と猫の作用強度の差を表す

謝辞

本研究を実施する機会を与えて頂き、研究の遂行および論文の作成にあたり、終始懇切なるご指導ご鞭撻を賜りました、東京大学 大学院農学生命科学研究科 獣医外科学研究室 西村亮平 教授に心より感謝いたします。

functional MRIの撮像にあたり、多大なご協力、ご指導を頂きました、日本獣医生命科学大学 臨床獣医学部門 治療学分野I 長谷川大輔 准教授に深謝いたします。

本研究を進めるにあたり、ご助言、ご支援を頂いた、東京大学 大学院農学生命科学研究科 獣医外科学研究室 中川貴之 准教授、藤田直己 特任助教、佐伯亘平 特任研究員、ならびに東京大学 附属動物医療センター 鎌田正利 特任助教、飯塚智也 特任助教に心から感謝いたします。

研究を進めるにあたり、度々の議論に参加して頂き、また実験の手伝いをしてくれた東京大学 獣医外科学研究室 牟田佳那子 君、林杏怡 君、森田希輔 君、木原清敬 君ならびに日本獣医生命科学大学 濱本裕仁 君に深く感謝いたします。

最後に、本研究に取り組むにあたり、ご援助を頂きました、東京大学 大学院農学生命科学研究科 獣医外科学研究室の皆様、高度医療科学研究室の皆様、附属動物医療センターの皆様、そして家族、友人に心より感謝申し上げます。

参考文献

- Aicher, S.A., Schreihofner, A.M., Kraus, J.A., Sharma, S., Milner, T.A., Guyenet, P.G., 2001. μ -Opioid Receptors Are Present in Functionally Identified Sympathoexcitatory Neurons in the Rat Rostral Ventrolateral Medulla. *Journal of Comparative Neurology* 433, 34-47.
- Albertin, A., Dedola, E., Bergonzi, P.C., Lombardo, F., Fusco, T., Torri, G., 2006. The effect of adding two target-controlled concentrations (1–3 ng mL⁻¹) of remifentanyl on MAC BAR of desflurane. *European Journal of Anaesthesiology* 23, 510-516.
- Ambros, B., Alcorn, J., Duke-Novakovski, T., Livingston, A., Dowling, P.M., 2014. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of a constant rate infusion of fentanyl (5 μ g/kg/h) in awake cats. *American Journal of Veterinary Research* 75, 716-721.
- Ambros, B., Duke-Novakovski, T., Pasloske, K.S., 2008. Comparison of the anesthetic efficacy and cardiopulmonary effects of continuous rate infusions of alfaxalone-2-hydroxypropyl-beta-cyclodextrin and propofol in dogs. *American Journal of Veterinary Research* 69, 1391-1398.
- Antognini, J.F., Barter, L., Carstens, E., 2005. Movement as an index of anesthetic depth in humans and experimental animals. *Comparative Medicine* 55, 413-418.
- Apkarian, A.V., Bushnell, M.C., Treede, R.D., Zubieta, J.K., 2005. Human brain mechanisms of pain perception and regulation in health and disease. *European Journal of Pain* 9, 463-484.
- Aziz, C.B.A., Ahmad, A.H., 2014. THE ROLE OF THE THALAMUS IN MODULATING PAIN *Malaysian Journal of Medical Sciences* 13, 1-9.
- Bach, J.-P., Lüpke, M., Dziallas, P., Wefstaedt, P., Uppenkamp, S., Seifert, H., Nolte, I., 2013. Functional magnetic resonance imaging of the ascending stages of the auditory system in dogs. *BMC veterinary research* 9, 210-210.

- Barthas, F., Sellmeijer, J., Hugel, S., Waltisperger, E., Barrot, M., Yalcin, I., 2015. The anterior cingulate cortex is a critical hub for pain-induced depression. *Biological Psychiatry* 77, 236-245.
- Becerra, L., Harter, K., Gilberto Gonzalez, R., Borsook, D., 2006. Functional magnetic resonance imaging measures of the effects of morphine on central nervous system circuitry in opioid-naive healthy volunteers. *Anesthesia and Analgesia* 103, 208-216.
- Benarroch, E.E., 2001. Pain-autonomic interactions: a selective review. *Clinical Autonomic Research* 11, 343-349.
- Biki, B., Mascha, E., Moriarty, D.C., Fitzpatrick, J.M., Sessler, D.I., Buggy, D.J., 2008. Anesthetic technique for radical prostatectomy surgery affects cancer recurrence: a retrospective analysis. *Anesthesiology* 109, 180-187.
- Bosshard, S.C., Stuker, F., Von Deuster, C., Schroeter, A., Rudin, M., 2015. BOLD fMRI of C-fiber mediated nociceptive processing in mouse brain in response to thermal stimulation of the forepaws. *PLoS ONE* 10, 1-14.
- Brett, M., Anton, J.L., Valabregue, R., Poline, J.B., 2002. Region of interest analysis using the MarsBar toolbox for SPM 99. *NeuroImage* 16, 497-497.
- Brosnan, R.J., Pypendop, B.H., Siao, K.T., Stanley, S.D., 2009. Effects of remifentanil on measures of anesthetic immobility and analgesia in cats. *American Journal of Veterinary Research* 70, 1065-1071.
- Capner, C.a., Lascelles, B.D., Waterman-Pearson, a.E., 1999. Current British veterinary attitudes to perioperative analgesia for dogs. *The Veterinary record* 145, 95-99.
- Caterina, M.J., Leffler, A., Malmberg, A.B., Martin, W.J., Trafton, J., Petersen-Zeitz, K.R., Koltzenburg, M., Basbaum, A.I., Julius, D., 2000. Impaired Nociception and Pain Sensation in Mice Lacking the Capsaicin Receptor *SCIENCE* 288, 306-313.
- Chang, C., Shyu, B.C., 2001. A fMRI study of brain activations during non-noxious and noxious electrical stimulation of the sciatic nerve of rats. *Brain Research* 897, 71-81.

- Chen, C.-C., Zimmer, A., Sun, W.-H., Hall, J., Brownstein, M.J., Zimmer, A., 2002. A role for ASIC3 in the modulation of high-intensity pain stimuli. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99, 8992-8997.
- Chen, Y., Mestek, A., Liu, J., Hurley, J.A., Yu, L., 1993. Molecular cloning and functional expression of a m-opioid receptor from rat brain. *Mol. Pharmacol.* 44, 8-12.
- Clarke, R.S.J., 1970. The hyperglycaemic response to different types of surgery and anaesthesia. *British Journal of Anaesthesia* 42, 45-53.
- Cortright, D.N., Krause, J.E., Broom, D.C., 2007. TRP channels and pain. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease* 1772, 978-988.
- Daniel, M., Weiskopf, R.B., Noorani, M., Eger, E., 1998. Fentanyl Augments the Blockade of the Sympathetic Response to Incision (MAC-BAR) produced by Desflurane and Isoflurane. *Anesthesiology* 88, 43-49.
- Ding, Y.Q., Kaneko, T., Nomura, S., Mizuno, N., 1996. Immunohistochemical localization of mu-opioid receptors in the central nervous system of the rat. *The Journal of comparative neurology* 367, 375-402.
- Duke, T., Cox, A.M.K., Remedios, A.M., Cribb, P.H., 1994. The Analgesic Effects of Administering Fentanyl or Medetomidine in the Lumbosacral Epidural Space of Cats. *Veterinary Surgery* 23, 143-148.
- Epstein, M.E., Rodanm, I., Griffenhagen, G., Kadrlik, J., Petty, M.C., Robertson, S.A., Simpson, W., 2015. 2015 AAHA/AAFP Pain Management Guidelines for Dogs and Cats. *Journal of Feline Medicine and Surgery* 17, 251-272.
- Erbs, E., Faget, L., Scherrer, G., Matifas, A., Filliol, D., Vonesch, J.L., Koch, M., Kessler, P., Hentsch, D., Birling, M.C., Koutsourakis, M., Vasseur, L., Veinante, P., Kieffer, B.L., Massotte, D., 2014. A mu-delta opioid receptor brain atlas reveals neuronal co-occurrence in subcortical networks. *Brain Structure and Function*, 1-26.
- Evans, C.J., Keith, D.E., Morrison, H., Magendzo, K., Edwards, R.H., 1992. Cloning of a delta opioid receptor by functional expression. *Science* 258, 1952-1955.

- Ferreira, T.H., Aguiar, A.J.A., Valverde, A., Teixeira Neto, F.J., Steagall, P.V.M., Soares, J.o.H.N., 2009. Effect of remifentanil hydrochloride administered via constant rate infusion on the minimum alveolar concentration of isoflurane in cats. *American Journal of Veterinary Research* 70, 581-588.
- Fields, H.L., 2004. State-dependent opioid control of pain. *Nature reviews. Neuroscience* 5, 565-575.
- Fiset, P., Daloz, T., Plourde, G., Meuret, P., Bonhomme, V., Hajj-ali, N., Backman, S.B., Evans, A.C., 1999. Brain Mechanisms of Propofol-Induced Loss of Consciousness in Humans: a Positron Emission Tomographic Study. *The Journal of Neuroscience* 19, 5506-5513.
- Gray-Edwards, H.L., Salibi, N., Josephson, E.M., Hudson, J.A., Cox, N.R., Randle, A.N., McCurdy, V.J., Bradbury, A.M., Wilson, D.U., Beyers, R.J., Denney, T.S., Martin, D.R., 2014. High resolution MRI anatomy of the cat brain at 3Tesla. *Journal of Neuroscience Methods* 227, 10-17.
- Guillot, M., Chartrand, G., Chav, R., Rousseau, J., Beaudoin, J.-F., Martel-Pelletier, J., Pelletier, J.-P., Lecomte, R., De Guise, J.A., Troncy, E., 2015. [18F]-fluorodeoxyglucose positron emission tomography of the cat brain: A feasibility study to investigate osteoarthritis-associated pain. *The Veterinary Journal* 204, 299-303.
- Hall, A.J., Lomber, S.G., 2015. High-field fMRI reveals tonotopically-organized and core auditory cortex in the cat. *Hearing Research* 325, 1-11.
- Halter, J.B., Pflug, a.E., 1980. Effects of anesthesia and surgical stress on insulin secretion in man. *Metabolism: clinical and experimental* 29, 1124-1127.
- Hashimoto, K., Amano, T., Kasakura, A., Uhl, G.R., Sora, I., Sakai, N., Kuzumaki, N., Suzuki, T., Narita, M., 2009. μ -Opioid receptor-independent fashion of the suppression of sodium currents by μ -opioid analgesics in thalamic neurons. *Neuroscience Letters* 453, 62-67.
- Heinricher, M.M., Tavares, I., Leith, J.L., Lumb, B.M., 2009. Descending control of nociception: Specificity, recruitment and plasticity. *Brain Research Reviews* 60, 214-225.

- Hellyer, P.W., Bai, L., Supon, J., Quail, C., Wagner, A.E., Mama, K.R., Magnusson, K.R., 2003. Comparison of opioid and alpha-2 adrenergic receptor binding in horse and dog brain using radioligand autoradiography. *Veterinary anaesthesia and analgesia* 30, 172-182.
- Heyse, B., Proost, J.H., Schumacher, P.M., Bouillon, T.W., Vereecke, H.E., Eleveld, D.J., Luginbuhl, M., Struys, M.M., 2012. Sevoflurane remifentanil interaction: comparison of different response surface models. *Anesthesiology* 116, 311-323.
- Hoke, J.F., Cunningham, F., James, M.K., Muir, K.T., Hoffman, W.E., 1997. Comparative pharmacokinetics and pharmacodynamics of remifentanil, its principle metabolite (GR90291) and alfentanil in dogs. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 281, 226-232.
- Hyvärinen, J., 1981. Regional distribution of functions in parietal association area 7 of the monkey. *Brain Research* 206, 287-303.
- Iizuka, T., Nishimura, R., 2015. Context-sensitive half-time of fentanyl in dogs. *Journal of Veterinary Medical Science* 77, 615-617.
- Ikoma, M., Kohno, T., Baba, H., 2007. Differential presynaptic effects of opioid agonists on A-delta- and C-afferent glutamatergic transmission to the spinal dorsal horn. *Anesthesiology* 107, 807-812.
- Inoue, K., Burkett, J.P., Young, L.J., 2013. Neuroanatomical distribution of μ -opioid receptor mRNA and binding in monogamous prairie voles (*Microtus ochrogaster*) and non-monogamous meadow voles (*Microtus pennsylvanicus*). *Neuroscience* 244, 122-133.
- Inui, K., Kakigi, R., 2012. Pain perception in humans: use of intraepidermal electrical stimulation. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry* 83, 551-556.
- James, M.K., Feldman, P.L., Schuster, S.V., Bilotta, J.M., Brackeen, M.F., Leighton, H.J., 1991. Opioid receptor activity of GI 87084B, a novel ultra-short acting analgesic, in isolated tissues. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 259, 712-718.
- Janssen, P., Niemegeers, C., Dony, J., 1963. The inhibitory effect of fentanyl and other morphine-like analgesics on the warm water induced tail withdrawal reflex in rats. *Arzneimittelforschung* 13, 502-507.

- Jensen, T.S., 1997. Opioids in the brain: supraspinal mechanisms in pain control. *Acta Anaesthesiol Scand* 41, 123-132.
- Jeppard, P., Rauschecker, J.P., Maloney, D., 1997. An in vivo Model for Functional MRI in Cat Visual Cortex. *Magnetic Resonance in Medicine* 38, 699-705.
- Jia, H., Pustovyy, O.M., Waggoner, P., Beyers, R.J., Schumacher, J., Wildey, C., Barrett, J., Morrison, E., Salibi, N., Denney, T.S., Vodyanoy, V.J., Deshpande, G., 2014. Functional MRI of the olfactory system in conscious dogs. *PLoS ONE* 9.
- Jones, A.K.P., Watabe, H., Cunningham, V.J., Jones, T., 2004. Cerebral decreases in opioid receptor binding in patients with central neuropathic pain measured by [¹¹C]diprenorphine binding and PET. *European Journal of Pain* 8, 479-485.
- Kamata, M., Nagahama, S., Kakishima, K., Sasaki, N., Nishimura, R., 2012. Comparison of Behavioral Effects of Morphine and Fentanyl in Dogs and Cats. *Journal of Veterinary Medical Science* 74, 231-234.
- Katoh, T., Kobayashi, S., Suzuki, A., Iwamoto, T., Bito, H., Ikeda, K., 1999. The effect of **fentanyl** on **sevoflurane** requirements for **somatic** and **sympathetic** responses to surgical incisionThe effect of fentanyl on sevoflurane requirements for somatic and sympathetic responses to surgical incision. *Anesthesiology* 90, 398-405.
- Kita, T., Kagawa, K., Mammoto, T., Takada, K., Hayashi, Y., Mashimo, T., Kishi, Y., 2000. Supraspinal, not spinal, alpha(2) adrenoceptors are involved in the anesthetic-sparing and hemodynamic-stabilizing effects of systemic clonidine in rats. *Anesth Analg* 90, 722-726.
- Kline Iv, R.H., Wiley, R.G., 2008. Spinal {micro}-Opioid Receptor-Expressing Dorsal Horn Neurons: Role in Nociception and Morphine Antinociception. *Journal of Neuroscience* 28, 904-913.
- Kodaira, M., Inui, K., Kakigi, R., 2014. Evaluation of nociceptive A δ - and C-fiber dysfunction with lidocaine using intraepidermal electrical stimulation. *Clinical Neurophysiology* 125, 1870-1877.

- L.D. Aimone , L.D., Jones , S.L., Gebhart, G.F., 1987. Stimulation-produced descending inhibition from the periaqueductal gray and nucleus raphe magnus in the rat: mediation by spinal monoamines but not opioids. *Pain* (Amsterdam) 31, 123-136.
- Lahti, K.M., Ferris, C.F., Li, F., Sotak, C.H., King, J.A., 1999. Comparison of Evoked Cortical Activity in Conscious and Propofol-Anesthetized Rats Using Functional MRI. 416, 412-416.
- Lang, E., Kabila, B., Shlugman, D., Hoke, J.F., Sebel, P.S., Glass, P., 1996. Reduction of Isoflurane Minimal Alveolar Concentration by Remifentanyl. *Anesthesiology* 85, 721-728.
- Lewis, J.W., Baldrighi, G., Akil, H., 1987. A possible interface between autonomic function and pain control: opioid analgesia and the nucleus tractus solitarius. *Brain Research* 424, 65-70.
- Liu, M.G., Chen, J., 2009. Roles of the hippocampal formation in pain information processing. *Neuroscience Bulletin* 25, 237-266.
- Luo, Z., Yu, M., Smith, S.D., Kritzer, M., Du, C., Ma, Y., Volkow, N.D., Glass, P.S., Benveniste, H., 2009. The Effect of Intravenous Lidocaine on Brain Activation During Non-Noxious and Acute Noxious Stimulation of the Forepaw: A Functional Magnetic Resonance Imaging Study in the Rat. *Anesthesia & Analgesia* 108, 334-344.
- Mambretti, E.M., Kistner, K., Mayer, S., Massotte, D., Kieffer, B.L., Hoffmann, C., Reeh, P.W., Brack, A., Asan, E., Rittner, H.L., 2016. Functional and structural characterization of axonal opioid receptors as targets for analgesia. *Molecular Pain* 12, 1-17.
- Mansour, A., Fox, C.A., Akil, H., Watson, S.J., 1995a. Opioid-receptor mRNA expression in the rat CNS: anatomical and functional implications. *Trends in Neurosciences* 18, 22-29.
- Mansour, a., Fox, C.a., Burke, S., Akil, H., Watson, S.J., 1995b. Immunohistochemical localization of the cloned mu opioid receptor in the rat CNS. *Journal of chemical neuroanatomy* 8, 283-305.
- Mansour, A., Fox, C.A., Thompson, R.C., Akil, H., Watson, S.J., 1994. μ -Opioid receptor mRNA expression in the rat CNS: comparison to μ -receptor binding. *Brain Research* 643, 245-265.

- Mansour, A., Khachaturian, H., Lewis, M.E., Akil, H., Watson, S.J., Place, W., Arbor, A., Avenue, M., 1988. Anatomy of CNS opioid receptors. *Spinal Cord*.
- March, P.A., Muir, W.W., 2003. Minimum alveolar concentration measures of central nervous system activation in cats anesthetized with isoflurane. *American Journal of Veterinary Research* 64, 1528-1533.
- McEwan, A., Smith, C., Dyar, O., Goodman, D., Smith, L., Glass, P., 1993. Isoflurane minimum alveolar concentration reduction by fentanyl. *Anesthesiology* 78, 864-869.
- McNicol, E., Horowicz-Mehler, N., Fisk, R.A., Bennett, K., Gialeli-Goudas, M., Chew, P.W., Lau, J., Carr, D., 2003. Management of opioid side effects in cancer-related and chronic noncancer pain: A systematic review. *Journal of Pain* 4, 231-256.
- Meij, B.P., Suwankong, N., Van Den Brom, W.E., Venker-Van Haagen, A.J., Hazewinkel, H.A.W., 2006. Tibial nerve somatosensory evoked potentials in dogs with degenerative lumbosacral stenosis. *Veterinary Surgery* 35, 168-175.
- Melzack, R., Wall, P.D., 1965. PAIN MECHANISMS: A NEW THEORY. *Science* 150, 971-979.
- Merrer, J.L.E., 2009. Reward Processing by the Opioid System in the Brain. 1379-1412.
- Michelsen, L.G., Salmenperä, M., Hug, C.C., Szlam, F., VanderMeer, D., 1996. Anesthetic potency of remifentanyl in dogs. *Anesthesiology* 84, 865-872.
- Minami, M., Satoh, M., 1995. Molecular biology of the opioid receptors: structures, functions and distributions. *Neuroscience Research* 23, 121-145.
- Nomura, K., Reuveny, E., Narahashi, T., 1994. Opioid inhibition and desensitization of calcium channel currents in rat dorsal root ganglion neurons. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 270, 466-474.

- Oertel, B., Preibisch, C., Wallenhorst, T., Hummel, T., Geisslinger, G., Lanfermann, H., Lötsch, J., 2008. Differential Opioid Action on Sensory and Affective Cerebral Pain Processing. *CLINICAL PHARMACOLOGY & THERAPEUTICS* 83, 577-588.
- Ogawa, S., Lee, T., 1990. Brain magnetic resonance imaging with contrast dependent on blood oxygenation. *Proceedings of the ...* 87, 9868-9872.
- Pakozdy, A., Angerer, C., Klang, A., König, E.H., Probst, A., 2015. Gyration of the Feline Brain: Localization, Terminology and Variability. *Journal of Veterinary Medicine Series C: Anatomia Histologia Embryologia* 44, 422-427.
- Pastoriza, L.N., Morrow, T.J., Casey, K.L., 1996. Medial frontal cortex lesions selectively attenuate the hot plate response: Possible nocifensive apraxia in the rat. *Pain* 64, 11-17.
- Peyron, R., Laurent, B., García-Larrea, L., 2000. Functional imaging of brain responses to pain. A review and meta-analysis (2000). *Neurophysiologie clinique = Clinical neurophysiology* 30, 263-288.
- Ploghaus, A., Narain, C., Beckmann, C.F., Clare, S., Bantick, S., Wise, R., Matthews, P.M., Rawlins, J.N., Tracey, I., 2001. Exacerbation of pain by anxiety is associated with activity in a hippocampal network. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 21, 9896-9903.
- Poldrack, R.A., 2007. Region of interest analysis for fMRI. *Social Cognitive and Affective Neuroscience* 2, 67-70.
- Pypendop, B.H., Brosnan, R.J., Siao, K.T., Stanley, S.D., 2008a. Pharmacokinetics of remifentanil in conscious cats and cats anesthetized with isoflurane. *American Journal of Veterinary Research* 69, 531-536.
- Pypendop, B.H., Pascoe, P.J., Ilkiw, J.E., 2006. Effects of epidural administration of morphine and buprenorphine on the minimum alveolar concentration of isoflurane in cats. *American Journal of Veterinary Research* 67, 1471-1475.
- Pypendop, B.H., Siao, K.T., Pascoe, P.J., Ilkiw, J.E., 2008b. Effects of epidurally administered morphine or buprenorphine on the thermal threshold in cats. *American Journal of Veterinary Research* 69, 983-987.

- Rampil, I., 1994. Anesthetic potency is not altered after hypothermic spinal cord transection in rats. *Anesthesiology* 80, 606-610.
- Reier, C.E., George, J.M., Kilman, J.W., 1973. Cortisol and growth hormone response to surgical stress during morphine anesthesia. *Anesthesia and analgesia* 52, 1003-1010.
- Rexed, B., 1954. A Cytoarchitectonic Atlas of the Spinal Cord in the Cat. *The Journal of Comparative Neurology* 100, 297-379.
- Robson, L.E., Gillan, M.G.C., Kosterlitz, H.W., 1985. Species Differences in The Concentration and Distribution of Opioid Binding Sites. *European Journal of Pharmacology* 112, 65-71.
- Roizen, M.F., Horrigan, R.W., Frazer, B.M., 1981. Anesthetic doses blocking adrenergic (stress) and cardiovascular responses to incision--MAC BAR, pp. 390-398.
- Sanders, D., Krause, K., O'Muircheartaigh, J., Thacker, M.A., Huggins, J.P., Vennart, W., Massat, N.J., Choy, E., Williams, S.C.R., Howard, M.A., 2015. Pharmacologic modulation of hand pain in osteoarthritis: A double-blind placebo-controlled functional magnetic resonance imaging study using naproxen. *Arthritis and Rheumatology* 67, 741-751.
- Sato, A., Sato, Y., Atsuko, S., Swenson, R.S., 1986. The effects of morphine administered intrathecally on the somatosympathetic reflex discharges in anesthetized cats. *Neuroscience Letters* 71, 345-350.
- Sato, A., Schmidt, R.F., 1973. Somatosympathetic reflexes : afferent fibers , central pathways , discharge characteristics . *Physiological Reviews* 53, 916-947.
- Scannell, J.W., Blakemore, C., Young, M.P., 1995. Analysis of connectivity in the cat cerebral cortex. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 15, 1463-1483.
- Schadrack, J., Willoch, F., Platzer, S., Bartenstein, P., Mahal, B., Dworzak, D., Wester, H.J., Zieglgänsberger, W., Tölle, T.R., Zieglgansberger, W., Tolle, T.R., 1999. Opioid receptors in the human cerebellum: evidence from [11C]diprenorphine PET, mRNA expression and autoradiography. *Neuroreport* 10, 619-624.

- Shah, Y.B., Haynes, L., Prior, M.J.W., Marsden, C.A., Morris, P.G., Chapman, V., 2005. Functional magnetic resonance imaging studies of opioid receptor-mediated modulation of noxious-evoked BOLD contrast in rats. *Psychopharmacology* 180, 761-773.
- Shibutani, K., Katoh, T., Sakai, T., Komatsu, T., Sawada, K., Frost, E.A.M., 1999. Clinical applications of fentanyl pharmacokinetics and pharmacodynamics: Roles of fentanyl in anesthesia. *Journal of Anesthesia* 13, 209-216.
- Simon, E.J., Hiller, J.M., Edelman, I., 1973. Stereospecific Binding of the Potent Narcotic Analgesic [³H]Etorphine to Rat-Brain Homogenate. *proceeding of the National Academy of Sciences of the united States of America* 70, 1947-1949.
- Stein, C., Clark, J.D., Oh, U., Vasko, M.R., Wilcox, G.L., Overland, A.C., Vanderah, T.W., Spencer, R.H., 2009. Peripheral mechanisms of pain and analgesia. *Brain Research Reviews* 60, 90-113.
- Stone, J.G., Foex, P., Sear, J.W., Johnson, L.L., Khambatta, H.J., Triner, L., 1988. Risk of myocardial ischaemia during anaesthesia in treated and untreated hypertensive patients. *British Journal of Anaesthesia* 61, 675-679.
- Takasaki, I., Nojima, H., Shiraki, K., Kuraishi, Y., 2006. Specific down-regulation of spinal μ -opioid receptor and reduced analgesic effects of morphine in mice with postherpetic pain. *European Journal of Pharmacology* 550, 62-67.
- Tracey, I., Hicks, G., Rogers, R., Clare, S., Bountra, C., Barrington, P., Painter, D., Ploghaus, A., Peskett, G., Matthews, P.M., 2000. Pharmacological modulation of the central pain response. *International Society for Magnetic Resonance in Medicine*, 4999-4999.
- Tracey, I., Mantyh, P.W., 2007. The Cerebral Signature for Pain Perception and Its Modulation. *Neuron* 55, 377-391.
- Treede, R.D., Kenshalo, D.R., Gracely, R.H., Jones, A.K., 1999. The cortical representation of pain. *Pain* 79, 105-111.

- Valverde, A., Morey, T.E., Hernández, J., Davies, W., 2003. Validation of several types of noxious stimuli for use in determining the minimum alveolar concentration for inhalation anesthetics in dogs and rabbits. *American Journal of Veterinary Research* 64, 957-962.
- Van Loon, J.P.A.M., Van Oostrom, H., Doornenbal, A., Hellebrekers, L.J., 2010. Lumbosacral spinal cord somatosensory evoked potentials for quantification of nociception in horses. *Equine Veterinary Journal* 42, 255-260.
- Wang, C., Chakrabarti, M.K., Galletly, D.C., Whitwam, J.G., 1992. Relative effects of intrathecal administration of fentanyl and midazolam on a δ and c fibre reflexes. *Neuropharmacology* 31, 439-444.
- Wegner, K., Horais, K.A., Tozier, N.A., Rathbun, M.L., Shtaerman, Y., Yaksh, T.L., 2008. Development of a canine nociceptive thermal escape model. *Journal of Neuroscience Methods* 168, 88-97.
- Whittem, T., Pasloske, K.S., Heit, M.C., Ranasinghe, M.G., 2008. The pharmacokinetics and pharmacodynamics of alfaxalone in cats after single and multiple intravenous administration of Alfaxan® at clinical and supraclinical doses. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics* 31, 571-579.
- Williams, V.M., Lascelles, B.D.X., Robson, M.C., 2005. Current attitudes to, and use of, peri-operative analgesia in dogs and cats by veterinarians in New Zealand. *New Zealand Veterinary Journal* 53, 193-202.
- Willis, C.K.R., Quinn, R.P., McDonnell, W.M., Gati, J., Partlow, G., Vilis, T., 2001. Functional MRI activity in the thalamus and occipital cortex of anesthetized dogs induced by monocular and binocular stimulation. *Canadian Journal of Veterinary Research* 65, 188-195.
- Wise, R.G., Rogers, R., Painter, D., Bantick, S., Ploghaus, A., Williams, P., Rapeport, G., Tracey, I., 2002. Combining fMRI with a Pharmacokinetic Model to Determine Which Brain Areas Activated by Painful Stimulation Are Specifically Modulated by Remifentanyl. *NeuroImage* 16, 999-1014.

- Yasuda, K., Raynor, K., Kong, H., Breder, C.D., Takeda, J., Reisine, T., Bell, G.I., 1993. Cloning and functional comparison of kappa and delta opioid receptors from mouse brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90, 6736-6740.
- Yeager, M.P., Glass, D.D., Neff, R.K., Brinck-Johnsen, T., 1987. Epidural anesthesia and analgesia in high-risk surgical patients, pp. 729-736.
- Zbinden, A., Petersen-Felix, S., Thomson, D., 1994. Anesthetic depth defined using multiple noxious stimuli during isoflurane/oxygen anesthesia. I. Motor reactions. *Anesthesiology* 80, 253-260.