

顔面部・肩背部に対する筋痛モデル作成の試み

明治国際医療大学 鍼灸学部 臨床鍼灸学教室 伊藤和憲

頭痛患者は顎関節症や肩こりなど、顔面部や肩背部に何らかの痛みを有しているものが多く、頭痛との関連が疑われる。そこで、顔面部や肩背部の痛みと頭痛に何らかの関係があるのかを検討する基礎研究モデルの開発のため、今回は顔面部痛として顎関節症、また肩背部痛として肩こりをイメージした筋肉痛モデルの作成を試みた。実験にはSD系雄性ラット30匹を用い、咬筋運動群、咬筋コントロール群、咬筋鍼群（2Hz, 15分）、後頸部運動群、後頸部コントロール群の5群に無作為に割り振った。その後、運動群と鍼群では、咬筋または後頭部の筋肉に絶縁鍼電極を刺入し、40Hzで電気刺激することで筋肉を強縮させ、その筋肉を徒手的に引き伸ばす伸張性収縮運動を80回2セット行った。また、コントロール群では運動のみとした。なお、筋肉痛の評価は、von Frey、筋肉の圧迫、屈曲反射のそれぞれの閾値を経時的に測定した。電気刺激の部位に関係なく運動群では運動負荷1日後から筋肉の圧迫と屈曲反射のそれぞれの閾値が低下し、2日後が最も低下したが、7日後には元の値に戻った。しかしながら、von Freyの閾値に関しては、測定期間中変化しなかった。一方、鍼通電を行った鍼群では、伸張性収縮運動を行っても筋肉痛が認められなかった。以上の結果から、伸張性収縮運動を咬筋や後頸部に行うことで筋肉痛を作成することが可能であり、その筋肉痛は鍼通電により抑制することが明らかとなった。

A. 研究目的

緊張型頭痛や片頭痛などを有する患者は、単に頭痛だけが存在するのではなく、肩こりや顎関節症などの様々な症状を有することが多い。頭痛患者に対する調査では、肩こりや顎関節症を有している患者の割合は高いとの報告もある。また、それとは逆に、肩背部や顔面部の筋肉に痛みが存在すると、頭部に痛みが出現しやすいとの報告もある。このように筋肉に関連しておこる頭痛は関連痛といわれ、筋肉の中にある索状硬結上に存在するトリガーポイントがその原因と考えられている。実際、緊張型頭痛や片頭痛患者の半数以上にトリガーポイントが存在しているとの報告があり、頭痛と肩背部や顔面部の筋痛には何らかの関係があ

るように思われる。さらに、顔面部の痛みや肩背部の痛みが軽減することで、頭痛そのものが改善することもある。そのため、鍼灸治療に関する報告では、頭痛が存在する頭部そのものへの治療よりも、肩こりなどの肩背部や顎関節症など顔面部の痛みに対して治療を行うことが多く、実際、頭痛が軽減することが数多く報告されている。以上のことから、顔面部や肩背部の筋肉の状態と頭痛には何らかの関係があると考えられる。しかしながら、これらの関係を基礎研究において証明したことはなく、顔面部や肩背部の筋肉状態と頭痛の関係性に関する機序を説明することはできない。

一方、筋肉痛モデルに関しては様々なモデルが

存在している。特に動物では、カラゲニンやマスタートードオイルなどの起炎物質を筋肉内に注入する筋炎モデルや、冷温刺激を繰り返す行うストレスモデル、さらにはエストロゲンのバランスを変化させるエストロゲンモデルなど様々なモデルが存在するが、いずれも全身的な痛みを引き起こすことから、肩こりや顎関節症のような局所の筋肉痛モデルではない。その一方で、伸張性収縮運動を繰り返す行うことで運動を行った筋肉に局限して遅発性筋痛が出現することが知られており、肩こりや顎関節症のような局所の筋肉痛を作成するにはこの方法が適していると思われる。

そこで、頭痛と顔面部や肩背部の筋肉の痛みの関係性を検討するための前段階として、遅発性筋痛の作成方法を応用して顔面部と肩背部に実験的に筋肉痛モデルを作成し、顔面部や肩背部の筋肉痛モデルとして妥当であるか検討を行った。

B. 実験方法

1. 実験方法

実験にはSD系雄性ラット30匹(200-350g)を用いた。それぞれのラットは運動負荷1週間前に咬筋運動群、咬筋コントロール群、後頸部運動群、後頸部コントロール群、咬筋鍼群の5群に無作為に群分けした。

なお、本実験は明治国際医療大学動物実験倫理委員会(24-10:実験動物における頸部および顔面領域の遅発性筋痛作成の試み)の承認を得ておこなった。

2. 運動負荷方法

ラットを軽度麻酔下(40mg/kg, i. p.)で自家製台に固定した状態で、絶縁針電極を経皮的に咬筋または後頸部に刺入し、電気刺激によって咬筋または後頸部の筋肉を強縮させた。咬筋が強縮すると口が閉じ、頭板状筋が強縮すると頸部が後屈するため、その強縮した筋肉を他動的に元の位置まで10秒間かけて戻すことで咬筋または後頸部の筋

肉を引き延ばすことで、伸張性収縮運動を行った。電気刺激(Interval:20ms, Duration:1ms, Train:500)は定電流刺激装置(日本光電, SEN-3301)からアイソレーター(日本光電, SS-104)を介して15秒おきに行い、計80回の運動負荷を5分間の休憩をはさみ2セット(計160回)行った。刺激の強度は5.0mA以下とし、5.0mA以上で強縮が見られない場合は電極の位置を移動させた。

なお、コントロール群に関しては鍼通電のみで筋肉を引き伸ばす伸張性収縮運動は行わなかった。

2. 測定項目

(1) von freyの測定

無麻酔下で顔面部または後頸部のみが露出されるように作成した専用ゲージにラットを固定し、咬筋部または後頸部の筋肉部分の皮膚表面にvon freyを押し当てたときに、ラットが逃避反射を示す閾値を測定した。測定は、軽いvon Freyから順番に重いvon Freyを押し当てていき、逃避反射が認められた閾値を確定し、その後、その閾値より重いvon Freyから順番に軽いvon Freyを押し当てることで同じ値にあるかを確認することで閾値を決定、これらの作業を計3回行うこととし、最終的な閾値を決定した。

(2) 筋肉の圧迫閾値

無麻酔下で顔面部または後頸部のみが露出されるように作成した専用ゲージにラットを固定し、咬筋部または後頸部の筋肉部分の筋肉を圧迫し、逃避反射が認められる閾値を測定した。閾値の測定は、測定者の指先にひずみストレインゲージ(昭和測器社製)を装着し、1秒に約500gの圧が増加するようなスピードで目的とする筋肉を垂直に圧迫した時の閾値とし、計5回測定した。なお、押す方向やスピードにより閾値がばらつくことから、5回測定したうちの最大値と最小値を除外し、中央値3回の平均値を解析に用いた。なお、ひずみの単位は任意の単位AUとして評価した。

(3) 屈曲反射の誘発閾値

運動負荷により筋痛が出現しているかどうか調べるために、咬筋または後頸部の筋肉を絶縁鍼電極で刺激した時に、顎二腹筋または頸部屈筋群から記録される逃避反射の誘発筋電図の閾値を評価に用いた。測定は麻酔下(30mg/kg, i. p.)で自家製台に固定し、各筋肉が自由に可動できるようにした。その後、咬筋または後頸部の筋肉中央まで絶縁鍼電極を刺入し、顎二腹筋または頸部屈筋群から反射性筋電図を記録した。筋電図は表面電極を用いて導出し、入力箱(日本光電, JB-101J)を介してオシロスコープ(日本光電, VC-11)で観察した後、ペンレコーダー(日本光電, RTA-1200M)とデータレコーダー(TEAC, RD-1235T)に記録した。測定は反射が誘発される最小値を閾値と定め、それぞれ3回づつ行い、その中央値を代表値として用いた。

なお、各測定は運動負荷前、運動負荷1-3日後と7日後にそれぞれ記録した。

(4) 鍼治療の方法

咬筋鍼群に対しては、咬筋に対して鍼通電刺激を行った。運動負荷終了直後、ペントバルビタール麻酔下で咬筋に絶縁鍼を2本刺入し、筋肉が軽く収縮する程度に2Hz15分間の通電を行った。

(5) 実験プロトコール

各群のラットは購入後、2週間のトレーニング期間を経て、ランダムに5群に振り分けた。その後、運動負荷を開始する前に、①von Frey、②筋肉の圧迫閾値を無麻酔下で、③屈曲反射の誘発閾値をペントバルビタール麻酔下で行った。その後、運動負荷を行い、運動負荷1-3日後と7日後に①～③を測定した。

(6) 統計処理

データは平均値±標準偏差(mean±SD.)で示し、各群内の経時的変化を反復測定分散分析ののち、多重比較検定(Dunnett test)を行った。また、各群間の比較には、各経時的変化のグラフを面積化することでエリア・アンダーザ・カーブの値を求め、2群の場合はWilcoxon Signed ranks testで、また3群では反復測定分散分析ののち、多重比較検定(Bonferroni test)を行った。さらに、von Freyと筋肉の圧迫閾値の評価としての妥当性を検証するために、既に確立している誘発反射の閾値との相関性を検討した。

C. 結果

(1) 咬筋に対する運動負荷の影響

咬筋に運動負荷を行った咬筋運動負荷群では、実験期間を通じてvon Freyの閾値に変化は認められなかったが(図1)、筋肉の圧迫閾値に関しては運動負荷1日後から低下し、運動負荷2日後には閾値が最も低下し($p<0.01$, Dunnett test)、3日後には元の値まで回復していた(図2)。また、屈曲反射の誘発閾値に関しては、筋肉の圧迫閾値と同様に運動負荷後から低下し、運動負荷2日後には閾値が最も低下し、3日後まで閾値の低下が続いたが($p<0.01$, Dunnett test)、7日後には元の値まで回復していた(図3)。一方、刺激のみを行った咬筋コントロール群では、von Frey、筋肉の圧迫閾値、屈曲反射の閾値とも測定期間を通じて、閾値に変化は認められなかった(図1-4)。一方、各群で群間比較を行ったところ、圧迫閾値と屈曲反射の誘発閾値に関しては咬筋運動群とコントロール群で2群に有意な差が認められたが($p<0.01$, Wilcoxon test)、von Freyに関しては、有意な差は認められなかった。

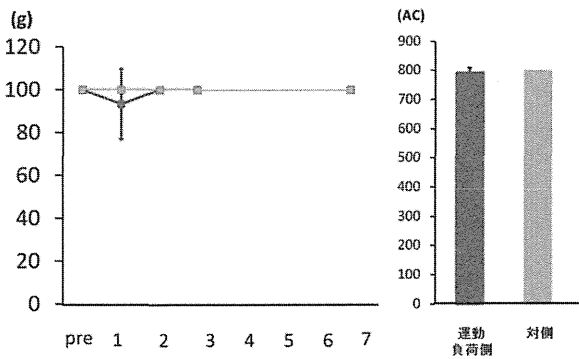


図1：咬筋に対する伸張性収縮運動に伴う von Frey の変化

(2) 咬筋に対する運動負荷への鍼刺激の影響

咬筋の運動負荷直後に、咬筋に対して2Hz15分間の鍼通電を行った。その結果、実験期間を通じて von Frey の閾値、筋肉の圧迫閾値、屈曲反射の誘発閾値いずれに関しても、閾値に変化が認められず、咬筋コントロール群と同様な傾向が得られた (図4-6)。また、各群の群間比較に関しても、von Frey の閾値、筋肉の圧迫閾値、屈曲反射の誘発閾値いずれに関してもコントロール群との間に統計学的に有意な差は存在しないが、咬筋運動群との間には von Frey 以外統計学的に有意な差が認められた ($p < 0.01$, Wilcoxon test)。

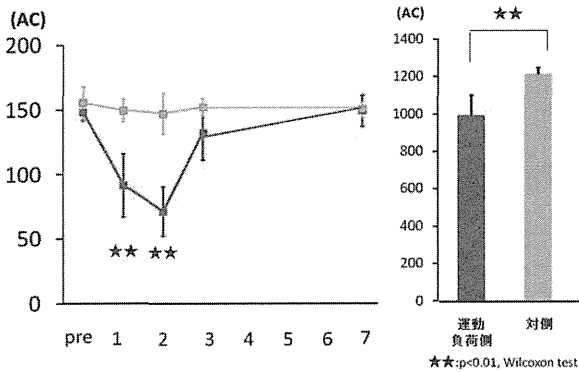


図2：咬筋に対する伸張収縮運動に伴う筋肉の圧迫閾値の変化

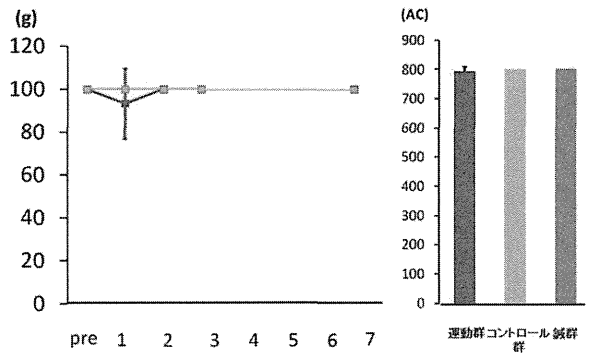


図4： von Frey に対する鍼刺激の影響

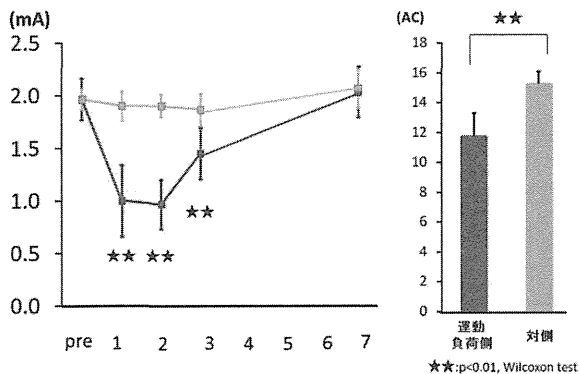


図3：咬筋に対する伸張性収縮運動に伴う屈曲反射の変化

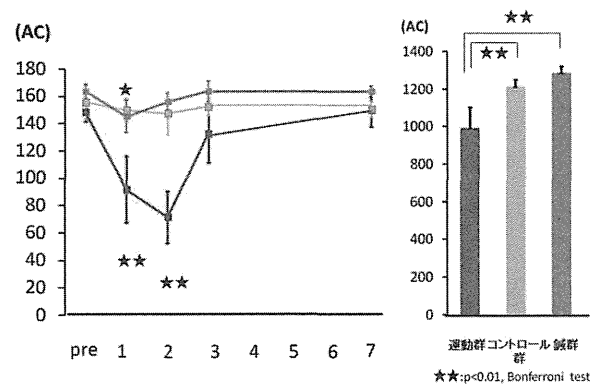


図5：筋肉の圧迫閾値に対する鍼刺激の影響

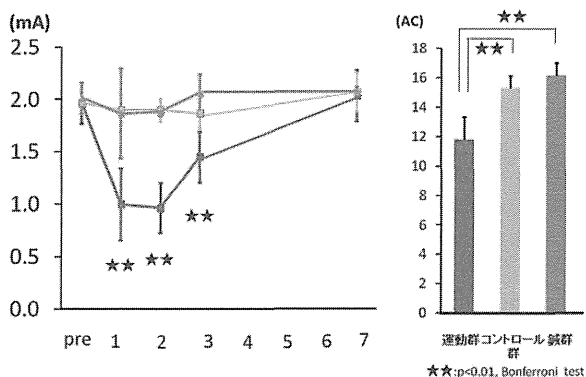


図6：屈曲反射に対する鍼刺激の影響

(3) 後頸部に対する運動負荷の影響

後頸部の筋肉に対して運動負荷を行った運動負荷群では、実験期間を通じて von Frey の閾値に変化は認められなかったが (図7)、筋肉の圧迫閾値に関しては運動負荷1日後から低下し、運動負荷2日後には最も低下したが (p<0.01, Dunnett test)、3日後には元の値まで回復していた (図8)。また、屈曲反射の誘発閾値に関しては、筋肉の圧迫閾値と同様に運動負荷後から低下し、運動負荷2日後には閾値が最も低下し、運動負荷3日目まで閾値の低下が続いたが (p<0.01, Dunnett test)、7日後には元の値まで回復していた (図9)。一方、刺激のみを行った後頸部コントロール群では、von Frey、筋肉の圧迫閾値、屈曲反射の閾値とも測定期間を通じて、閾値に変化は認められなかった (図7-9)。一方、各群で群間比較を行ったところ、圧迫閾値と屈曲反射の誘発閾値に関しては咬筋運動群とコントロール群で2群に有意な差が認められたが (p<0.01, Wilcoxon test)、von Frey に関しては、有意な差は存在しなかった。

図7：後頸部に対する伸張性収縮運動に伴う von Frey の効果

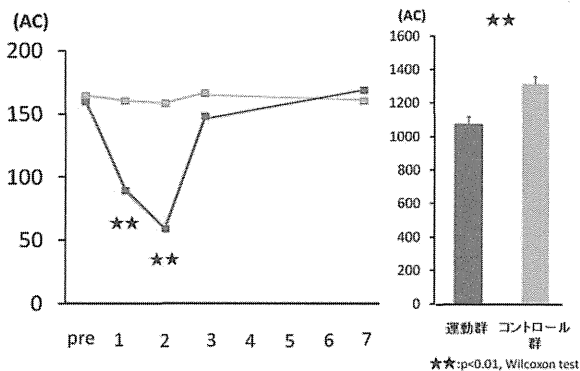


図8：後頸部に対する伸張収縮運動に伴う筋肉の圧迫閾値の効果

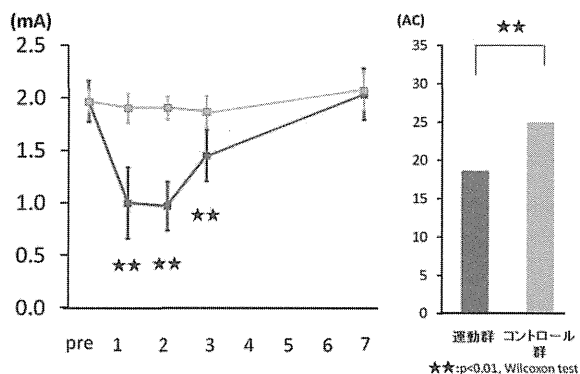


図9：後頸部に対する伸張性収縮運動に伴う屈曲反射の変化

(4) von Freyと筋肉の圧迫閾値の妥当性について

今回用いたvon Frey閾値と筋肉の圧迫閾値が屈曲反射の誘発閾値と関連性があるかを検討するため、屈曲反射の誘発閾値との相関を検討した。その結果、咬筋との関係に関してはvon Frey閾値と $r=0.282$ 、筋肉の圧迫閾値と $r=0.862$ ($p<0.01$:図10)、また後頸部に関してはvon Frey閾値と $r=0.198$ 、筋肉の圧迫閾値と $r=0.761$ ($p<0.01$:図11)といずれも圧迫閾値と強い相関が認められた。

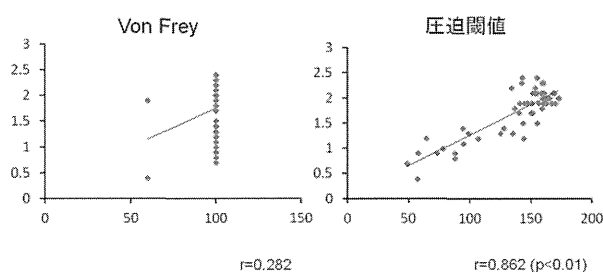


図10:咬筋における屈曲反射誘発閾値とvon Frey, 筋肉の圧迫閾値の関係

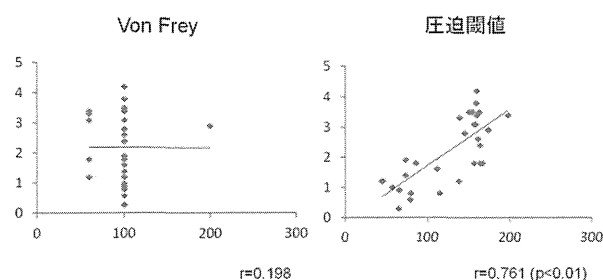


図11:後頸部の筋肉における屈曲反射誘発閾値とvon Frey, 筋肉の圧迫閾値の関係

D. 考察

頭痛患者は、単に頭痛だけを訴えているのではなく、肩こりや顎関節症など顔面部や肩背部の痛みを併発していることが多い。そのため、頭痛の

発現には、これら顔面部や肩背部の痛みが何らかの影響を与えていることは容易に予想がつく。しかしながら、これらの関係を証明した基礎研究はなく、頭痛と顔面部や肩背部の痛みがどのような関係にあるのか明確ではない。そこで、頭痛の発現と顔面部や肩背部の痛みの関連性を基礎的に検討する必要がある。しかしながら、頭痛の動物モデルは存在するものの、顔面部や肩背部の痛みモデルは存在していなかった。そこで、今年度は、頭痛研究の前段階として、顔面部や肩背部の痛みのモデルを作成することを試みた。

(1) 評価方法の妥当性について

今回、筋肉痛の評価にvon Freyの閾値、筋肉の圧迫閾値、屈曲反射の誘発閾値の3つを用いた。一般的に動物実験で行われている筋肉痛の評価では、皮膚表面の閾値を評価する方法としてvon Freyが、また筋肉の閾値を評価する方法としてランダルセリットテストが用いられている。また、一部の研究では、痛み刺激を与えた際に認められる屈曲反射の誘発閾値や振幅を用いることもある。

しかしながら、筋肉痛に関する研究の多くは下肢を対象にしたものが多く、顔面部や後頸部における動物モデルは存在しておらず、痛みの評価方法が確立されていなかった。そこで、従来下肢で行われている評価方法を参考にvon Freyの閾値と屈曲反射の誘発閾値を用いると共に、ランダルセリットテストの変わりとして筋肉の圧迫閾値を測定した。

その結果、伸張性収縮運動負荷を行った運動群では、皮膚表面の閾値と考えられるvon Freyの閾値には変化が認められなかったが、筋肉の圧迫閾値と屈曲反射の誘発閾値には変化が認められた。

従来、屈曲反射の誘発閾値は、痛みの変化を表していると考えられていることから、運動負荷により筋肉のみが痛みの変化を示したものと考えられた。また、従来筋肉の痛みの指標として用いられている屈曲反射の誘発閾値の変化と、今回我々

が開発した筋肉の圧迫閾値の変化には強い相関が認められた。以上のことから、筋肉の圧迫による閾値変化は、屈曲反射と同様に筋肉の痛みを捉えている可能性が考えられた。

(2) 顔面部、後頸部に対する筋痛モデル作成の試み

今回、伸張性収縮運動負荷を行うことで筋肉痛モデルの作成を試みた。一般的に筋肉痛を作成する実験では、カラゲニンやマスタードオイルなどの起炎物質を筋肉内に注入する筋炎モデルや、冷温刺激を繰り返し行うストレスモデル、さらにはエストロゲンのバランスを変化させるエストロゲンモデルなど様々なモデルが存在している。しかしながら、いずれのモデルも全身的な痛みを引き起こすことから、線維筋痛症のような全身の疼痛モデルとしての側面が強かった。一方、頭痛患者では、全身の筋肉痛というよりは、肩こりや顎関節症のような局所的な疼痛を訴えていることが多く、従来用いられている筋肉痛モデルではなく、新たなモデルの開発が必要であった。そこで、今回遅発性筋痛のモデルで利用されている、伸張性収縮運動負荷を応用して、顔面部や後頸部の痛みモデルの開発を試みた。

伸張性収縮運動負荷は等尺性収縮や短縮性収縮よりも筋線維あたりに発生する張力は大きく、また損傷も強いことから筋肉痛を作成する方法として最もよい運動とされている。実際、今回の各モデルでも、運動負荷を行った筋肉に関係なく、伸張性収縮を行った運動群では、筋肉の圧迫閾値が運動負荷1日後から低下し、2日後にはピークとなり、7日後には元に戻る傾向にあった。しかしながら、短縮性収縮を行ったコントロール群では、筋肉の閾値に変化は認められなかった。今回、運動群で認められた伸張性収縮運動による痛みの変化は、過去に別の筋肉で行った伸張性収縮の報告とほぼ同様であることから、咬筋や後頸部の筋肉に筋肉痛が作成できたものと考えられた。

(3) 鍼通電の効果について

今回、運動直後に鍼通電を行うことで、伸張性収縮運動負荷により生じた筋肉痛を抑制することが可能であった。特に、今回は運動直後に鍼通電をただけにも関わらず、運動負荷2日後までその効果が継続したことから、その機序としていくつかの可能性が考えられる。

先行研究で、鍼通電によりオピオイド物質が放出されることが報告されており、周波数の違いにより2Hzの低頻度で β エンドロフィンが、2/15Hzでエンケファリンが、100Hzの高頻度ではダイノロフィンがそれぞれ放出されることが知られている。そのため、今回鍼通電により痛みが抑制した機序の1つとして、内因性のオピオイド物質、特に β エンドロフィンの放出が考えられる。オピオイドは下行性抑制系を賦活して神経性に痛みを抑制するだけでなく、視床下部で作られた β エンドロフィンが血行性に分泌されることが報告されており、それらは持続的な鎮痛効果を引き起こすことが知られている。このことから、血行性に放出された β エンドロフィンが痛みを抑制した可能性が考えられた。

一方、その他の可能性としては、運動負荷を行った局所に鍼通電を行っていることから、鍼通電の筋ポンプ作用や軸索反射による局所血流の改善により、運動負荷で生じた発痛物質が早期に消失し、修復が早く進んだ可能性が考えられる。また、炎症局所の鍼は末梢性鎮痛を引き起こすことが知られていることから、炎症局所に集まったオピオイド含有細胞が鍼刺激によりオピオイドを放出し、痛みが改善した可能性などが考えられる。

このように、今回の鍼通電は、オピオイドに代表される鎮痛機構と血流の改善の2つの効果により、痛みが改善したものと考えられた。

E. 結論

今回、咬筋や後頸部の筋肉に伸張性収縮運動負荷を行うことで、筋肉痛を作成することが可能で

あった。以上のことから、伸張性収縮運動負荷による運動方法は、肩こりや顎関節症などのモデルとして有効であると考えられた。

一方、運動直後からの鍼通電により運動負荷によって作成された筋肉痛が軽減したことから、鍼通電は筋肉痛を軽減させる1つの方法である可能性が示唆された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 著書

なし

2. 論文

1) Itoh K, Asai S, Ohyabu H, Imai K, Kitakoji H. Effect of trigger point acupuncture treatment on temporomandibular disorders: A preliminary randomized clinical trial. J Acupunct Meridian Stud, 5(2):57-62, 2012.

3. 学会発表

1) 伊藤和憲. ラットを用いた伸張運動負荷による顎関節症モデル作成の試み. 第42回慢性疼痛学会(東京), 2013.

2) 皆川陽一, 伊藤和憲, 齊藤真吾, 高橋秀則, 福田悟: カラゲニン筋痛モデルに対するミノサイクリン投与の検討. 第46回日本ペインクリニック学会学術総会, 日本ペインクリニック学会, 19(3): 301, 2012.

3) 齊藤真吾, 伊藤和憲, 北小路博司. マスタードオイルの投与により感作された脊髄の侵害受容ニューロンに対する鍼通電の効果. 第4回日本線維筋痛症学会学術集会, 抄録集, 80, 2012.

4) 齊藤真吾, 伊藤和憲, 北小路博司: 咬筋へマスタードオイルを注入した際の鍼通電の影響ニューロン活動を指標. 第61回全日本鍼灸学会学

術総会, 抄録集, 218, 2012.6.8.

5) Itoh K, Asai S, Ohyabu H, Imai K, Kitakoji H. Effects of trigger point acupuncture treatment on temporomandibular disorders (TM D): A preliminary RCT. Internal Scientific Acupuncture and Meridian studies, 10, 2012.

6) Saito S, Itoh K, Kitakoji H. Effects of electrical acupuncture on mustard oil-induced craniofacial pain in rats. Internal Scientific Acupuncture and Meridian studies, 21, 2012.

7) Itoh K, Saito S, Sahara S, Naitoh Y, Imai K, Kitakoji H. Randomized Trial of Trigger Point Acupuncture Treatment for Chronic Shoulder Pain (Frozen Shoulder): ~A Preliminary Study~. Internal Scientific Acupuncture and Meridian studies, 22, 2012.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

著者	論文タイトル	掲載誌	巻号	ページ	出版年
Shimizu T, Shibata M, Toriumi H, et al.	Reduction of TRPV1 expression in the trigeminal system by botulinum neurotoxin type-A.	Neurobiol Dis	48	367-378	2012
Kuroi T, Shimizu T, Shibata M, Toriumi H, et al.	Alterations in microglia and astrocytes in the trigeminal nucleus caudalis by repetitive TRPV1 stimulation on the trigeminal nociceptors.	Neuroreport	23	560-5	2012
Unekawa M, Tomita Y, Toriumi H, Suzuki N.	Suppressive effect of chronic peroral topiramate on potassium-induced cortical spreading depression in rats.	Cephalalgia.	32	518-27	2012
Unekawa M, Tomita M, Tomita Y, Toriumi H, Suzuki N.	Sustained decrease and remarkable increase in red blood cell velocity in intraparenchymal capillaries associated with potassium-induced cortical spreading depression.	Microcirculation.	19	166-74	2012
Itoh K, Asai S, Ohyabu H, Imai K, Kitakoji H	Effect of trigger point acupuncture treatment on temporomandibular disorders: A preliminary randomized clinical trial.	J Acupunct Meridian Stud	5	57-62	2012
清水利彦	片頭痛の治療新薬	医学のあゆみ	243	1296-1299.	2012
鈴木則宏	大会長講演：脳血管疾患病態の多様性と神経伝達物質機能の解明を目指して	臨床神経学	52	819-824	2012

著者	論文タイトル	掲載誌	巻号	ページ	出版年
柴田 護	CARASIL 新規変異例の病態と画像所見	臨床神経学	52	1363-1364	2012
柴田 護	片頭痛慢性化のメカニズム	臨床神経学	52	1012-1013	2012
山口 智 荒木 信夫	神経内科診療と連携した鍼灸活用の実際	臨床神経学	52	1287-1289	2012
伊藤和憲 齊藤真吾 佐原俊作 内藤由規	鍼灸の作用機序から神経内科領域の可能性を探る	臨床神経学	52	1294-1295	2012
鳥海春樹 海老根妙子 黒井俊哉 柴田 護 清水利彦 鈴木則宏	頭痛専門診療における鍼灸併用の可能性	臨床神経学	52	1297-1298	2012
清水利彦	片頭痛の治療新薬-選択的 5-HT _{1F} 受容体作動薬や CGRP 受容体アンタゴニスト-	医学のあゆみ	243	1296-1299	2012
清水利彦、鈴木則宏	片頭痛の病態生理	神経内科	77	331-336	2012
清水利彦	発作性片側頭痛と持続性片側頭痛	Clinical Neuroscience	30	565-566	2012
清水利彦	慢性反復性頭痛	Medical Practice	29	471-475	2012

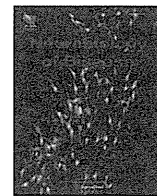
著者	論文タイトル	掲載誌	巻号	ページ	出版年
柴田 護	顔面痛の診断と治療	神経内科	77	447-455	2012
柴田 護、鈴木則宏	Horner症候群と群発頭痛発作時の自律神経異常	Clinical Neuroscience	30	558-559	2012
柴田 護	片頭痛慢性化と慢性片頭痛	医学のあゆみ	243	1117-1122	2012
鳥海春樹	神経内科「頭痛専門診」における鍼灸活用 —頭痛に対する強力な診療ツールとしての鍼灸—	東洋医学鍼灸ジャーナル	30	75-80	2013
菊池友和, 山口智, 五十嵐久佳, 小俣浩, 鈴木真理, 荒木信夫	緊張型頭痛を有するVisual Display Terminal作業 者に対する鍼治療効果	神経治療学	29	753-760	2012
山口智, 荒木信夫, 松田博史, 本田憲業, 松居徹, 三村俊英, 小俣浩, 菊池友和, 鈴木真理, 田中晃一, 新井 千枝子	Arterial spin-labeled MRIを用いた鍼刺激前後の脳 血流評価 片頭痛患者と健康成人の比較	埼玉医科大学雑誌	39	39-40	2012
山口 智	片頭痛の発作予防に対する鍼治療効果	日本頭痛学会雑誌	39	25-27	2012
菊池 友和, 山口 智	頭痛と肩こり	現代鍼灸学	12	93-100	2012
菊池 友和, 山口 智	鍼灸テクニカルレポート 総合医療に向けて 医科大学からの発信(第16回) 薬物乱用頭痛(MOH)に対する鍼治療	医道の日本	71	80-90	2012

著者	論文タイトル	掲載誌	巻号	ページ	出版年
鈴木 真理, 山口 智	鍼灸クリニカルレポート 総合医療に向けて 医科大学からの発信(第15回) 一次性頭痛に対する鍼治療効果 担がん患者が 有する緊張型頭痛に対する鍼治療	医道の日本	71	65-74	2012
菊池 友和, 山口 智	鍼灸クリニカルレポート 総合医療に向けて 医科大学からの発信(第14回) 一次性頭痛に対する鍼治療効果 薬物療法を 用いづらい片頭痛患者に対する鍼治療	医道の日本	71	84-92	2012
菊池 友和, 山口 智	症例クローズアップ 眼科領域へのアプローチ (Case2) Vogt-小柳-原田病の再発予防に対する 鍼治療の一症例	東洋医学鍼灸ジャーナル	27	78-82	2012
菊池 友和, 山口 智	頭痛と肩こり	現代鍼灸学	12	93-100	2012

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書 籍 名	出版社名	出版地	出版年	ページ
清水利彦, 鈴木則宏	片頭痛	赤池昭紀ほか	実践治療薬	金芳堂	京都	2012	354-360
清水利彦, 鈴木則宏	頭痛	辻 省次	内科学	西村書店	東京	2012	1686-1689.
清水利彦, 鈴木則宏	頭痛	太田富雄ほか	脳神経外科学 改訂11版	金芳堂	京都	2012	269-313
清水利彦, 鈴木則宏	片頭痛は脳梗塞のリスク ですか？	棚橋紀夫, 北川泰久	脳卒中診療こんなとき どうする Q&A第2版	中外医学社	東京	2012	281-285
清水利彦	緊急時の神経症候とその対 処法 1. 頭痛	小林祥泰, 水澤英洋	神経疾患最新の治療 2012-2014	南江堂	東京	2012	55-58
鳥海春樹	神経疾患に対する鍼灸 —Acupuncture—活用の現状	鈴木則宏ほか	Annual Review 神経	中外医学社	東京	2013	107-113

研究成果の刊行物



Reduction of TRPV1 expression in the trigeminal system by botulinum neurotoxin type-A

Toshihiko Shimizu ^{*,1}, Mamoru Shibata ¹, Haruki Toriumi, Tatsuo Iwashita, Megumi Funakubo, Hitoshi Sato, Toshiya Kuroi, Taeko Ebine, Kenzo Koizumi, Norihiro Suzuki

Department of Neurology, School of Medicine, Keio University, 35 Shinanomachi, Shinjuku-ku, Tokyo, 160-8582, Japan

ARTICLE INFO

Article history:

Received 12 April 2012

Revised 30 June 2012

Accepted 9 July 2012

Available online 20 July 2012

Keywords:

Botulinum neurotoxin type-A

TRPV1

Trigeminal ganglion

Craniofacial pain

Migraine

Exocytosis

ABSTRACT

Botulinum neurotoxin type-A (BoNT-A) is clinically used for patients with pain disorders and dystonia. The precise mechanism whereby BoNT-A controls pain remains elusive. Here, we studied how BoNT-A affects the expression of the transient receptor potential vanilloid subfamily member 1 (TRPV1), a cation channel critically implicated in nociception, in the trigeminal system. Histological studies revealed that subcutaneous BoNT-A injection (0.25, 0.5, or 5 ng/kg) into the face targeted the ophthalmic division of trigeminal ganglion (TG) neurons and decreased TRPV1-immunoreactive neurons in the TG and TRPV1-immunoreactive fibers in rat trigeminal terminals. Of note, TG neurons that received projections from the dura mater, a principal site of headache generation, had reduced TRPV1 expression. BoNT-A-induced cleavage of SNAP25 (synaptosomal-associated protein of 25-kDa) in the TG became obvious 2 days after BoNT-A administration and persisted for at least 14 days. Quantitative real-time RT-PCR (reverse transcription-polymerase chain reaction) data indicated that the TRPV1-decreasing effects of BoNT-A were not mediated by transcriptional downregulation. By employing a surface protein biotin-labeling assay, we demonstrated that BoNT-A inhibited TRPV1 trafficking to the plasma membrane in primary TG neurons. Moreover, Y200F-mutated TRPV1, which is incapable of trafficking to the plasma membrane, was expressed in PC12 cells by transfection, and pharmacological studies revealed that TRPV1 in the cytoplasm was more predisposed to proteasome-mediated proteolysis than plasma membrane-located TRPV1. We conclude that the mechanism by which BoNT-A reduces TRPV1 expression involves the inhibition of TRPV1 plasma membrane trafficking and proteasome-mediated degradation in the cytoplasm. This paradigm seems to explain how BoNT-A alleviates TRPV1-mediated pain. Our data reveal a likely molecular mechanism whereby BoNT-A treatment reduces TRPV1 expression in the trigeminal system and provide important clues to novel therapeutic measures for ameliorating craniofacial pain.

© 2012 Elsevier Inc. All rights reserved.

Introduction

Botulinum neurotoxin type-A (BoNT-A) cleaves the SNARE (soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor) synaptosomal-associated protein of 25-kDa (SNAP25) and inhibits regulated exocytosis (Dolly et al., 2009; Meng et al., 2007; Südhof and Rothman, 2009). BoNT-A potently inhibits exocytosis at presynaptic terminals, causing flaccid muscle paralysis and is regarded as one of the most lethal toxins known to man. However, its pharmacological properties can be strategically utilized to modulate the exocytosis-mediated release of neurotransmitters, particularly acetylcholine, at the neuromuscular junction. Accordingly, BoNT-A and botulinum neurotoxin type-B (BoNT-B) are now used in clinical practice for a variety of muscular problems, including dystonia and spasticity (Lim and Seet,

2010). In addition, there is good evidence that BoNT-A is effective in treating pain disorders. After an extensive review of the literature, the Therapeutics and Technology Assessment Subcommittee of the American Academy of Neurology (TTAS/AAN) concluded that botulinum neurotoxin (BoNT) may be an effective treatment for lower back pain and should be considered for this condition (Naumann et al., 2008). BoNT-A has been shown to also be effective for craniofacial pain. The utility of BoNT-A in the treatment of chronic migraine has been demonstrated in randomized, placebo-controlled parallel studies performed in the United States and Europe (Aurora et al., 2010; Diener et al., 2010). As a consequence, the agent is now approved for patients with chronic migraine. Gazerani et al. (2009) examined the effect of subcutaneous BoNT-A treatment on trigeminal pain and vasomotor reactions caused by the local injection of capsaicin, the pungent ingredient in chili pepper, into the foreheads of 14 human volunteers (Gazerani et al., 2009). Strikingly, BoNT-A decreased capsaicin-induced trigeminal pain intensity, pain area, secondary hyperalgesia, flare area and vasomotor reactions. The receptor that binds capsaicin has been identified as a non-selective cation channel termed the transient receptor potential

* Corresponding author. Fax: +81 3 3353 1272.

E-mail address: shimizu-toshi@umin.ac.jp (T. Shimizu).

Available online on ScienceDirect (www.sciencedirect.com).

¹ These authors contributed equally to this work.

vanilloid subfamily member 1 (TRPV1), which is abundantly expressed in nociceptive cells. TRPV1 is also responsive to protons and noxious heat (>42 °C) and plays a role in transducing chemical and thermal nociceptive stimuli into neural signals that are eventually perceived as pain (Szallasi et al., 2006). TRPV1 mobilization from intracellular stores to the plasma membrane involves regulated exocytosis (Dolly et al., 2009; Morenilla-Palao et al., 2004). Hence, BoNT-A is likely to inhibit the trafficking of TRPV1 to the plasma membrane. There is histological evidence that local BoNT-A administration decreases TRPV1 expression levels in the human bladder (Apostolidis et al., 2005). At present, the molecular mechanism by which BoNT-A-mediated exocytosis inhibition reduces TRPV1 expression remains elusive. Unraveling this mechanism should contribute to the design of novel therapeutic strategies against pain disorders, especially inflammatory pain. TRPV1 functions are enhanced by inflammatory mediators, which cause TRPV1 phosphorylation by activating various protein kinases (Bhave et al., 2003; Bonnington and McNaughton, 2003; Gunthorpe and Chizh, 2009; Morenilla-Palao et al., 2004; Stein et al., 2006; Zhang et al., 2005; Zhu and Oxford, 2007). TRPV1 function is facilitated by enhanced channel activity and/or recruitment of TRPV1 from intracellular stores and their subsequent insertion into the plasma membrane, which leads to inflammatory hyperalgesia (Bonnington and McNaughton, 2003; Morenilla-Palao et al., 2004; Stein et al., 2006; Van Buren et al., 2005; Zhang et al., 2005). Therefore, inhibiting exocytosis and subsequent attenuation of TRPV1 expression appears to be useful in preventing the development of inflammatory hyperalgesia. We recently demonstrated the existence of TRPV1-immunoreactive nerve fibers in the dura mater that originate in the trigeminal ganglion (TG) (Shimizu et al., 2007). The dura mater is densely innervated by trigeminal nociceptors, and inflammatory processes often involve this exquisitely pain-sensitive intracranial structure. Clinically, meningitis causes excruciating pain that is often refractory to existing pain medications.

Here, we provide *in vivo* and *in vitro* evidence that BoNT-A hinders the recruitment of TRPV1 to the plasma membrane, and we show that the failure of TRPV1 plasma membrane trafficking leads to intracellular TRPV1 degradation by the proteasome. We further use behavioral analysis to demonstrate that the antinociceptive action of BoNT-A is selective for TRPV1-mediated pain. We propose that therapeutic measures that interfere with TRPV1 plasma membrane trafficking could be effective, especially against inflammatory hyperalgesic conditions.

Material and methods

Animals

A total of 71 male Sprague Dawley (SD) rats weighting 200–250 g were used for the study (32 for immunohistochemistry, 21 for Western blotting, 12 for RT-PCR, and 35 for behavior analysis). In addition, a total of 73 neonatal SD rats were used for TG primary cultures. The experimental procedures were approved by the Animal Welfare Committee of Keio University (No. 08076). All the procedures were undertaken with utmost caution to minimize the suffering of the animals.

True blue injection to the skin region innervated by V1 of the trigeminal nerve

To confirm the distribution pattern of TG neurons innervating the skin, three SD rats were injected with 1% retrograde axonal tracer (true blue, 5-benzofurancarboximidamide, 2,2'-[1,2-ethenediyl] bis-, dihydrochloride [Invitrogen, Carlsbad, CA] solution, 30 µl) into the left dorso-lateral side of the nose between the upper whisker pad and the ipsilateral eye, and the left TG was dissected out after perfusion fixation at 14 days.

BoNT-A and true blue injection to the skin region innervated by V1 of the trigeminal nerve

Fifteen SD rats were divided into 3 groups (control, BoNT-A 0.5 ng/kg, BoNT-A 5 ng/kg [Wako, Osaka, Japan]). The animals were deeply anesthetized with an intraperitoneal injection of pentobarbital (30 mg/kg body weight). Control animals were injected with 30 µl saline containing 1% true blue in the left dorso-lateral nose between the upper whisker pad and the ipsilateral eye.

In the other two groups, BoNT-A 0.5 ng/kg or BoNT-A 5 ng/kg containing 1% true blue solution (30 µl) were injected into the left side of the face. After 14 days, each group of animals was perfused, and the left TG was dissected out.

BoNT-A injection to the facial skin

Five SD rats were injected with saline as control, and the other 5 animals were injected with 0.5 ng/kg BoNT-A into the left side of the face, and the left facial dermis around the injection site was dissected out after perfusion fixation at 14 days.

True blue application to the dura mater and BoNT-A injection to the skin

Ten SD rats were anesthetized with an intraperitoneal injection of pentobarbital (30 mg/kg body weight). The heads of the animals were fixed in a stereotaxic frame, and a small burr hole was made in the left parietal bone around the middle meningeal artery. The dura mater was kept intact. A bank was built around the burr hole using dental cement (Ionosit, DMG) to prevent the spreading of what was to be locally administered to the dura. True blue was applied to the dura mater, and the application site was covered with the skull bone and dental cement. Seven days after tracer application, 0.5 ng/kg BoNT-A was injected into the left side of the face in 5 animals, and the 5 control animals were injected with saline into the left side of the face. After 7 days, the animals were sacrificed, and the left TGs were dissected out.

Immunohistochemical procedures

All animals were perfused with 200 ml of 0.01 M phosphate-buffered saline (PBS, pH 7.2), followed by a mixture of 2% formaldehyde and 0.2% picric acid in 0.1 M phosphate buffer, pH 7.0. Immediately after the perfusion-fixation, the TG was dissected out and immersed overnight in phosphate buffer containing 20% sucrose at 4 °C and then processed into 10-µm sections with a cryostat (Reichert-Jung Cryocut 1800; Leica Instruments).

Sections were preincubated with 10% normal donkey serum for 30 min followed by incubation with primary antibodies for 48–72 h at room temperature. The primary antibodies were then washed off with 0.01 M PBS, and the tissue specimens were incubated with species-specific secondary antibodies for 2 h at room temperature. Specimens were mounted in buffered glycerol (pH 8.6).

Slides were labeled with anti-TRPV1 receptor antibody corresponding to residues 824–838 (EDAEEVFKDSMVPGEK) of rat TRPV1 (raised in rabbit; code KM 018; Trans Genic, Kumamoto, Japan). The specificity of the anti-TRPV1 receptor antibody was previously demonstrated.

Slides of TG sections were labeled with anti-TRPV1 receptor antibody (raised in rabbit; Trans Genic). Slides of the facial dermis were double-labeled with anti-TRPV1 receptor antibody and anti-CGRP antibody (raised in guinea pig; code B-GP 640-1; Euro-Diagnostica). Immunoreactivities with the primary antibodies were visualized with species-specific secondary antibodies raised in donkey and conjugated to Cy-3 or fluorescein isothiocyanate (FITC) that was obtained from Jackson ImmunoResearch Laboratories (West Grove, PA).

Microscopy and quantitative analyses

Immunolabeled specimens were examined under an Olympus BX 50 microscope (Olympus, Tokyo, Japan) fitted with highly discriminating filters. Images were captured via a Sony CCD video camera (model XCD-SX 900; Sony, Tokyo, Japan) connected to an EPSON computer. The images were stored, and the area of the cell bodies that contained nuclei was measured using image analysis software (CHORI Imaging Corporation, Yokohama, Japan).

For quantitative analysis of TG tracer experiments, we estimated the number of the tracer-positive neurons in every third section that contained nuclei. We also counted the number of TRPV1-IR neurons with true blue accumulation. Cell counting was performed by a researcher blinded to the experimental conditions.

For quantification of TRPV1-IR in the nerve terminal of the dermis, we chose 5 dermal sections near the BoNT-A injected side in each animal. Section images were captured and binarized into black and white pixels using Adobe Photoshop (version 7.0; Adobe Systems, Mountain View, CA), and the areas of individual nerve bundles and the areas of TRPV1 containing nerve fibers within each nerve bundle were measured using the Image J analysis software (National Institutes of Health, Bethesda, MD). We calculated the proportions of the area of TRPV1-positive nerve fibers within the nerve bundle containing them.

Western blot analysis for tissue samples of TG and facial dermis

Twenty-one SD rats were divided into 7 groups (3 animals in each group). BoNT-A (0.25 ng/kg or 0.5 ng/kg) was injected into the face bilaterally. The animals were sacrificed on Day 2, 7 or 14 after injection. Control animals were injected with saline and were sacrificed on Day 7. After excision, TG tissues were homogenized in ice-cold lysis buffer (20 mM Tris [pH 7.4], 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0.1% SDS and Complete Protease Inhibitor Cocktail [Roche, Mannheim, Germany]). A portion of the dermis around the BoNT-A injection site was removed, finely chopped and homogenized. The homogenates were centrifuged, and the supernatants were used for Western blot analysis. The primary antibodies used were rabbit anti-SNAP25 (Covance, Berkeley, CA), rabbit anti-TRPV1 antibody (Trans Genic), mouse anti- α -tubulin (Sigma, St. Louis, MO) and rabbit anti-neurofilament (Chemicon, Temecula, CA). Immunoreactive bands were developed with enhanced chemiluminescence reagent (ECL-Plus; Perkin-Elmer, Waltham, MA) and detected with a LAS-4000 lumino-image analyzer (Fuji Film, Tokyo, Japan).

RT-PCR

Twelve SD rats were divided into 3 groups (4 animals in each group). BoNT-A (0.5 ng/kg) was injected into the face bilaterally, and the rats were sacrificed at 2 or 7 days after BoNT-A injection. Untreated rats were used as controls. Total RNA was prepared from TG tissue with TRIzol reagent (Invitrogen). cDNA synthesis was performed using the SuperScript™ III First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen). Target amplification for *TRPV1* and *GAPDH* cDNAs was carried out with a TaqMan® Gene Expression Assay system (Applied Biosystems, Carlsbad, CA). We used a TaqMan® gene expression assay [20 \times] for *TRPV1* cDNA [Rn01460299_m1, ION11000001109900000] or *GAPDH* assay mix: rat *GAPD* endogenous control kit for *GAPDH* cDNA. Real-time quantitative PCR was performed by using a StepOnePlus™ instrument (Applied Biosystems). The quantification of *TRPV1* transcripts was performed according to the comparative calculated threshold cycle method.

Pain-related behavior analysis

SD rats were anesthetized with halothane, and their faces were shaved. Capsaicin (3.1 mg, Wako Co. LTD., Japan) was dissolved in a

solution of 100% ethanol (62.5 μ l) and Tween-80 (65.6 μ l) in saline (871.8 μ l) to produce a 10 mM capsaicin solution. Then, an 8 \times 8 mm cotton patch was soaked in the 10 mM capsaicin solution and placed on the surface of the lateral facial skin of each animal for 30 s without anesthesia in the capsaicin-treated group (Honda et al., 2008). BoNT-A (0.5 ng/kg) was injected into the left side of the face 7 days before capsaicin administration. The TRPV1 antagonist capsazepine was dissolved in dimethylsulfoxide (DMSO) at a final concentration of 10 mM. The capsazepine solution was subcutaneously administered into the lateral facial skin (infraorbital region) using a 29 G \times 1/2 needle under light halothane anesthesia (AstraZeneca) 30 min prior to capsaicin patch application. We measured the frequency of wipes over the face using the forelimb as an index of nociception. Only unilateral wipes with the forelimb that were not part of grooming behavior were counted (Shimada and LaMotte, 2008). These wipes usually consisted of a gentle, single caudal to rostral stroke of the lateral face. We never observed back and forth stroking suggestive of scratching. The P2X₃ agonist, α , β -methyleneATP, was dissolved in saline to a concentration of 20 mM and subcutaneously injected into the lateral facial skin using a 29 G \times 1/2 needle under light halothane anesthesia. Pain-related behaviors were induced by mechanical stimulation with homemade von Frey hairs (VFHs, diameter: 0.5 mm; bending forces: 92.2 mN). Rats were allowed to acclimate to their surroundings for 60 min before testing. During the mechanical sensitivity assessment, the animals were treated gently and restrained at the trunk with a towel. Each VFH was applied ten times (once every 2–3 s) to the lateral facial skin, and the number of forelimb or withdrawal responses was counted (Shinoda et al., 2007). The frequency of nocifensive behaviors (head withdrawal or wiping) was measured in 10 trials. Stimulation of the skin with the 92.2-mN VFHs elicits a sensation of painful pricking. A significant increase in the frequency of face withdrawal and wiping in response to these mechanical stimuli was interpreted as punctate hyperalgesia. Behavioral tests were carried out at four time points: before and 5, 20 and 30 min after α , β -methyleneATP administration.

Primary TG neuronal cultures and immunocytochemistry

Primary cultures of TG neurons were prepared from neonatal SD rats (1–3 days old). Briefly, the brains were dissected, and TG tissue samples were minced in ice-cold HBSS (Hank's balanced saline solution; Invitrogen). After centrifugation, the pellet was resuspended in Leibovitz L15 (Invitrogen) containing 250 U/ml collagenase (Worthington, Lakewood, NJ), 1 U/ml elastase (Worthington), and 5 U/ml papain (Worthington), and the suspension was incubated for 1.5 h at 37 °C. After quenching the proteases, the suspension was centrifuged, and cells were dissociated by trituration. Dissociated cells were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)/F12 (Invitrogen) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS), 50 ng/ml NGF (Sigma), and 1% penicillin/streptomycin (Invitrogen). For immunocytochemical analysis, cells were fixed with 4% paraformaldehyde/PBS, permeabilized with 0.1% TritonX-100/PBS, and blocked with 1% normal goat serum/PBS. They were subsequently incubated with the following primary antibodies: rabbit anti-TRPV1 (Trans Genic) and guinea pig anti-CGRP (EuroDiagnostica, Malmö, Sweden). Immunoreactivity (IR) was visualized with appropriate FITC- and Cy3-conjugated secondary antibodies (Jackson ImmunoResearch). The nuclei were stained with DAPI, and confocal images were captured using a Leica TCS-SP5 confocal microscope.

Cell surface biotinylation of TG primary neurons

The biotinylation and isolation of cell surface proteins in TG primary neurons were performed using a Pierce® Cell Surface Protein Isolation Kit (Pierce Biotechnology, Rockford, IL) according to the manufacturer's instructions. Twenty-four hours after treatment with either BoNT-A (1 nM) or vehicle (water), the TG primary neurons were incubated

with sulfo-NHS-SS-biotin to biotin-label cell surface proteins before they were collected and disrupted in lysis buffer. The solutions were centrifuged, and a small aliquot of supernatant was preserved as whole cell lysate. The remaining supernatants were incubated with NeutrAvidin agarose, and biotinylated proteins attached to the NeutrAvidin agarose were eluted with Laemmli sample buffer. Biotinylated fractions of TRPV1 and the $\alpha 1$ subunit of Na/K ATPase were analyzed by Western blotting using antibodies for anti-TRPV1 (Trans Genic), anti-P2X₃ (Chemicon), and anti-Na/K-ATPase $\alpha 1$ subunit (Abcam, Cambridge, MA). For normalization, the results were compared with Western blot data from whole cell lysate samples, which were obtained with rabbit anti-TRPV1 (Trans Genic), rabbit anti-SNAP25 (Chemicon) and rabbit anti-GAPDH (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA). Immunoreactive band densitometric analysis was performed with Multigauge software version 3.3 (Fuji Film, Tokyo, Japan). For assessing the plasma cell membrane translocation of TRPV1, we calculated the ratio of TRPV1 level in the biotinylated fraction sample to that in the corresponding whole cell lysate sample.

Transfection of TRPV1 expression vectors into PC12 cells

Using the total RNA sample from TG tissue, full-length rat TRPV1 cDNA was amplified with the following set of oligonucleotide primers: forward: 5'-ggaattctggaacaacgggctagcttagac-3'; reverse: 5'-gggtaccta tttccctgggacctat-3'. The PCR product was subcloned into pEGFP-C3 (Clontech, Mountain View, CA). To create a point mutation (Tyr200Phe [Y200F]), we used a QuikChange® site-directed mutagenesis kit (Stratagene, Santa Clara, CA). PC12 cells were grown in DMEM/F12 supplemented with 15% horse serum, 2.5% FBS, and 1% penicillin-streptomycin solution. The plasmids for wild-type and Y200F TRPV1 were transfected using Lipofectamine 2000 (Invitrogen). The expression of the EGFP-TRPV1 fusion proteins was confirmed by capturing the fluorescence images using a Leica confocal TCS-SP5 microscope. Cell lysates were subjected to Western blot analyses using rabbit anti-GFP (MBL, Nagoya, Japan) and mouse anti- α -tubulin (Sigma). Immunoreactive band densitometric analysis was carried out employing the Multigauge software version 3.3 (Fuji Film, Tokyo, Japan).

Statistical analysis

Unless otherwise stated, all the numerical data are expressed as the mean \pm SD. SPSS for Windows (SPSS Inc., Chicago, IL), version 19, was used for all statistical analyses. Differences of quantitative data between the two groups were assessed using Student's *t*-tests. The densitometric data for EGFP-TRPV1 fusion protein expression levels, TG cell numbers and behavioral parameters were compared

using one-way analysis of variance (ANOVA), followed by Scheffé's post hoc test. Statistical significance was set at $p < 0.05$.

Results

We injected true blue tracer into the left dorso-lateral portion of the nose between the upper whisker pad and the ipsilateral eye to identify the TG neurons innervating the injected region. As shown in Fig. 1, tracer accumulation was observed in the ophthalmic division of the TG. In other sections, a small number of true blue-accumulating neurons were present in the maxillary division (data not shown).

In Fig. 2, neurons retrogradely labeled with true blue showing TRPV1-IR were observed in the TG of each group. When we compared the proportion of TRPV1-IR-containing neurons in true blue-containing neurons among the three groups, the ratio was significantly different between the control and BoNT-A-injected groups (Figs. 2B, C, E, F, H, and I). In the control group, the proportion of TRPV1-IR-containing neurons in true blue-accumulated neurons was 28% ($n = 1432$ neurons from 5 animals). However, in animals injected with 0.5 ng/kg or 5 ng/kg BoNT-A, the proportion of TRPV1-IR-containing neurons in true blue-accumulated neurons was 11% ($n = 961$ neurons from 5 animals) and 9% ($n = 727$ neurons from 5 animals), respectively. These decreases were significant compared to the ratio observed in the control group (one-way ANOVA, followed by Scheffé's post hoc test analyses, $p < 0.05$; Fig. 2J). We also observed TRPV1-IR in the skin to determine whether BoNT-A affects TRPV1 expression in the nerve terminals. In control animals, TRPV1-IR nerve fibers with varicosities were observed in the dermis near the injection site (Fig. 3A). Several nerve fibers colocalized with CGRP-IR (Figs. 3B, C). After BoNT-A injection, the number of TRPV1-IR nerve fibers was decreased (Fig. 3D). However, the CGRP-IR-containing nerve fibers remained intact following BoNT-A injection (Figs. 3E and F). The proportion of the area of TRPV1-positive nerve fibers within the nerve bundle containing them in BoNT-A treated animals was $3.8 \pm 2.1\%$, which was significantly lower than that in the control group ($22.4 \pm 9.1\%$; Student's *t*-test, $p < 0.0001$). When we unilaterally applied a tracer to the dura mater, tracer-accumulated neurons were observed in the TG on the ipsilateral side. As shown in Figs. 4A–C, neurons retrogradely labeled with true blue showing TRPV1-IR were observed in the control group. The proportion of TRPV1-IR-containing neurons that were also true blue-positive was 27% (Fig. 4G; $n = 572$ neurons from 5 animals). In BoNT-A treated animals, tracer-accumulation and TRPV1-IR were also observed (Figs. 4D and E). However, the number of TRPV1-IR neurons retrogradely labeled with true blue was reduced (Fig. 4F). The proportion of TRPV1-IR-containing, true blue-positive neurons in BoNT-A treated animals was 11% ($n = 697$ neurons from 5 animals), and this was significantly decreased

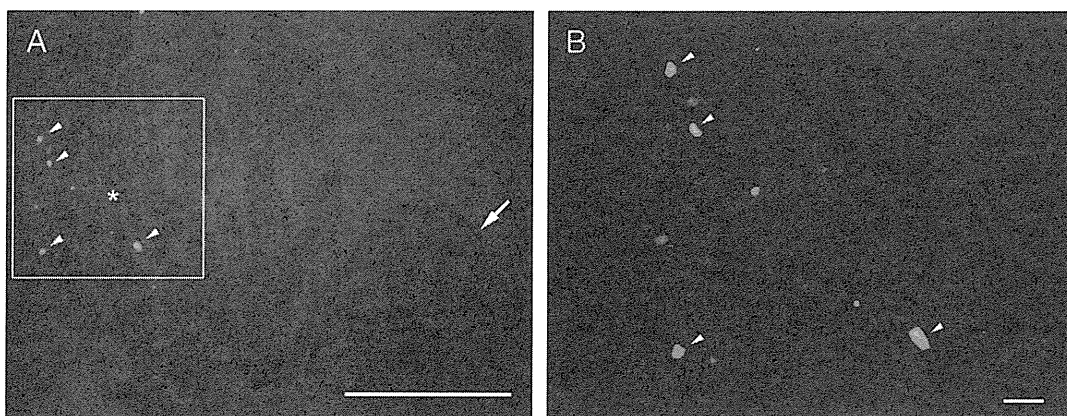


Fig. 1. The distribution pattern of TG neurons retrogradely labeled with true blue. (A) Sections of TG neurons retrogradely labeled with true blue. This picture was produced by merging fluorescence and transillumination images in the same field. The asterisk indicates the ophthalmic division, and the arrow points to the mandibular division of the TG. The arrowheads show neurons labeled with true blue, most of which are localized in the ophthalmic division of the TG. (B) Enlarged fluorescence image of (A). Scale bars: 1 mm (A) and 100 μ m (B).

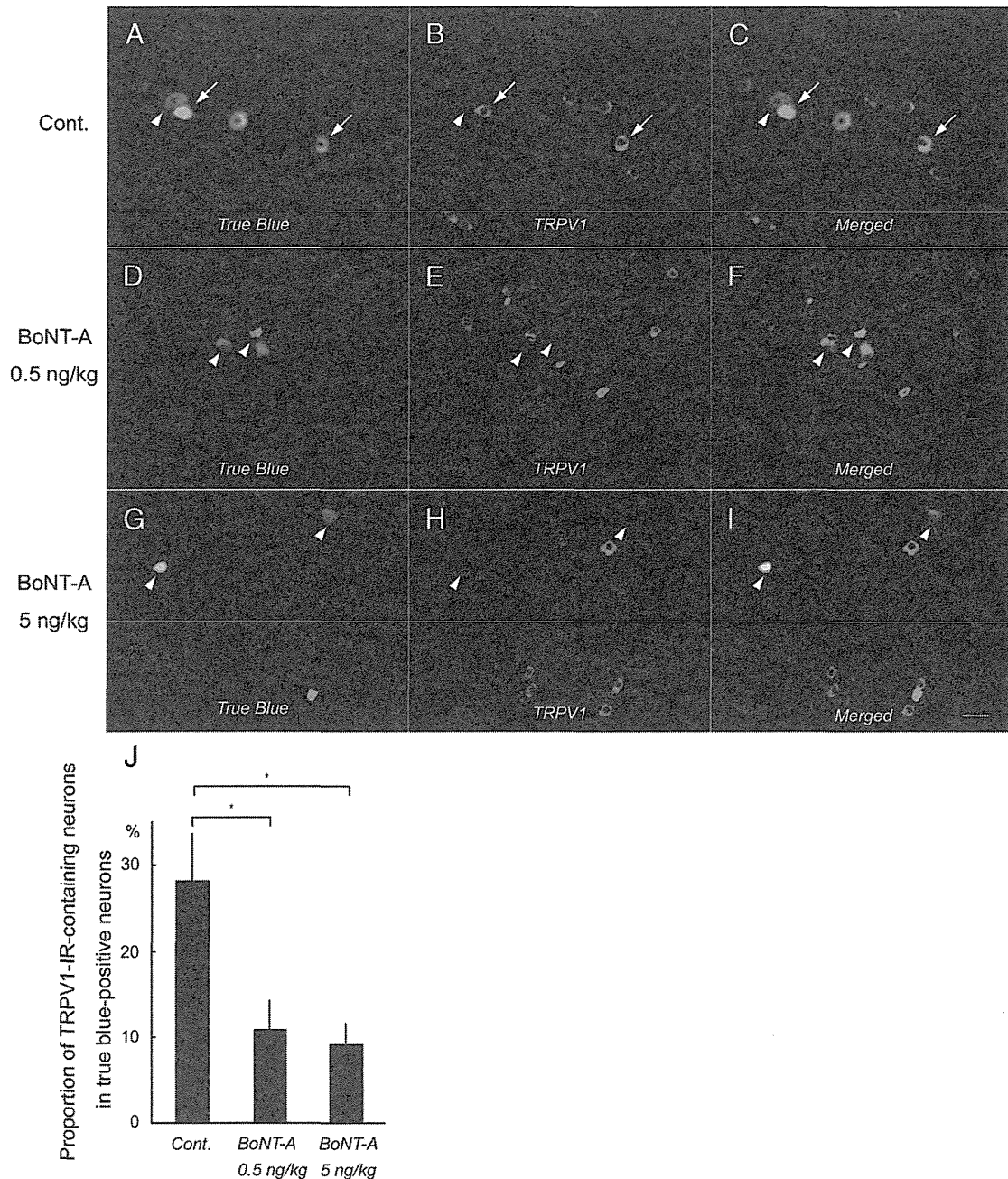


Fig. 2. Decreased number of TRPV1-IR neurons after TG BoNT-A treatment. TG sections containing neurons retrogradely labeled with true blue (A, D, G) and TRPV1-IR (B, E, H). (C) Merged image of (A) and (B). (F) Merged image of (D) and (E). (I) Merged image of (G) and (H). In control animals (A–C), neurons retrogradely labeled with true blue (A) and colocalized with TRPV1-IR (B) are indicated by arrows, and true blue-containing neurons without TRPV1-IR are indicated by arrowheads. In BoNT-A-treated animals (D–F, injected with 0.5 ng/kg BoNT-A containing 1% true blue solution and G–I, injected with 5 ng/kg containing 1% true blue solution), most of the neurons retrogradely labeled with true blue did not colocalize with TRPV1-IR (arrows). Scale bar: 50 μ m for all images. (J) Histogram summarizing the quantitative data on the proportion of TRPV1-IR-containing neurons in true blue-positive neurons. Differences between means were considered statistically significant at $p < 0.05$ (one-way ANOVA followed by Scheffé's post hoc test).

compared to the ratio observed in the control group (Student's *t*-test, $p < 0.0001$; Fig. 4G).

Western blot data confirmed decreased TRPV1 expression in the TG and facial dermis 7 days after BoNT-A administration at a dose of 0.25 ng/kg (Fig. 5A). As for BoNT-A-induced cleavage of SNAP25 in the TG, SNAP25 was cleaved in a dose-dependent manner beginning 2 days after BoNT-A administration (Fig. 5B). SNAP25 cleavage was evident for up to 14 days.

We next considered whether reduced TRPV1 expression was due to inhibited *TRPV1* gene transcription. Quantitative real-time RT-PCR using TaqMan® probes showed that the ratios of *TRPV1* gene transcription to the basal level *TRPV1* gene transcription were 0.942 ± 0.272 (mean \pm

SD) and 1.151 ± 0.584 at 2 and 7 days following BoNT-A administration, respectively (Fig. 5C). The trend toward an increased mRNA level at Day 7 might reflect a compensatory change that occurred in response to decreased protein expression. These data suggest that the decrease in TRPV1 expression was due to a post-transcriptional mechanism(s) rather than transcriptional downregulation.

We subsequently carried out pain-related behavior assays to confirm the functional significance of the BoNT-A-induced reduction in TRPV1 expression. The number of wipes on the left face was counted for 45 min after applying a cotton patch soaked with 10 mM capsaicin to the left face for 30 s. These induced nocifensive behaviors in the capsaicin-treated group (caps), such as wipes with the forelimb over