

umi H, Ebine T, Kuroi T, Iwashita T, Funakubo M, Kayama Y, Akazawa C, Wajima K, Nakagawa T, Okano H, Suzuki N. Differential cellular localization of antioxidant enzymes in the trigeminal ganglion. *Neuroscience*. 2013; 248: 345-358.

2. 学会発表

1. 海老根妙子、鳥海春樹、滝沢 翼、萱間洋平、黄 杏里、柴田 護、清水利彦、鈴木則宏. 脳硬膜の神経原性炎症における三叉神経侵害刺激の関与について. 2013年11月15日 盛岡. *日本頭痛学会誌* 40:333, 2013.
2. 滝沢 翼、柴田 護、萱間洋平、海老根妙子、清水利彦、鳥海春樹、鈴木則宏. TRPV1刺激時の三叉神経脊髄路核におけるHMG B1発現誘導. 2013年11月15日 盛岡. *日本頭痛学会誌* 40:334, 2013.
3. 滝沢 翼、萱間洋平、海老根妙子、鳥海春樹、岩下達雄、舟久保恵美、柴田 護、清水利彦、鈴木則宏. 三叉神経領域カプサイシン刺激時のTRPV1陽性ニューロンにおけるJNKのリン酸化. 第54回日本神経学会総会. 2013年5月31日東京.
4. Ebine T, Toriumi H, Unekawa M, Funakubo M, Iwashita T, Shibata M, Shimizu T, Suzuki N. Changes in the threshold for potassium induced cortical spreading depression occurrence during the natural estrous cycle in mice. 16th Congress of the International Headache Society 2013 June 2013; Boston
5. Kayama Y, Shibata M, Takizawa T, Shimizu T, Toriumi H, Ebine T, Funakubo M, Iwashita T, Sato H, Suzuki N. Implication of TRPM8 in the TRPV1-mediated trigeminal nociception. 16th Congress of the International Hea

dache Society 2013 June 2013; Boston.

6. Iwashita T, Shimizu T, Shibata M, Toriumi H, Kayama Y, Ebine T, Takizawa T, Funakubo M, Suzuki N. Effect of cortical spreading depression on the phosphorylation of ERK in the trigeminal ganglion of rat. 16th Congress of the International Headache Society 2013 June 2013; Boston.
7. Shibata M, Ebine T, Nagai T, Toriumi H, Shimizu T, Iwashita T, Funakubo M, Takizawa T, Kayama Y, Suzuki N. Capsaicin-induced nerve fiber degeneration in the spinal tract of the trigeminal nucleus. 16th Congress of the International Headache Society 2013 June 2013; Boston.
8. 伊藤和憲, 内藤由規, 齊藤真吾. 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), 114, 2013.

F. 知的所有権の取得

1. 特許取得
該当なし
2. 実用新案登録
該当なし
3. その他
該当なし

厚生労働科学研究費補助金（地域医療基盤開発推進研究事業）

分担研究報告書

鍼灸の作用機序に関する科学的根拠の確立と神経内科専門医と連携した
鍼灸活用ガイドラインの作成に関する研究

片頭痛・緊張型頭痛の鍼治療効果に関する研究

研究分担者 荒木信夫 埼玉医科大学 神経内科

研究要旨：片頭痛の発作予防に対する鍼治療効果、および緊張型頭痛に対する鍼治療効果を検討した。片頭痛のみ（11例）では、頭痛日数が鍼治療前7.9日から鍼治療後2.0日に減少した。慢性片頭痛（5例）では、頭痛日数が鍼治療前23.6日から鍼治療後11.6日に減少した。片頭痛＋緊張型頭痛（21例）では、頭痛日数が鍼治療前22.5日から鍼治療後15.2日に減少した。片頭痛＋薬物乱用頭痛の既往（12例）では、頭痛日数が鍼治療前28.3日から鍼治療後23.7日に減少した。頻発反復性緊張型頭痛（23例）では、有効率が82.6%であった。慢性緊張型頭痛（38例）では有効率が57.9%であった。

片頭痛患者における鍼治療は、片頭痛のみの患者では高い有効性を得られたが、慢性化片頭痛、薬物乱用頭痛などを伴ってくると有効率がやや低下した。しかし、これらは薬剤による治療に抵抗性がつよい頭痛でもあり、鍼治療は薬物療法との併用効果や慢性化の予防効果もあるため、片頭痛治療において、今後さらに検討されるべき分野といえる。

荒木信夫
埼玉医科大学神経内科教授

±S.D.) において緊張型頭痛予防に対する鍼治療効果を検討した。

（倫理面への配慮）

鍼治療に同意した患者のみにて検討した。

A. 研究目的

片頭痛の発作予防に対する鍼治療効果、および緊張型頭痛に対する鍼治療効果を検討することを目的とした。

B. 研究方法

1. 片頭痛の発作予防に対する鍼治療効果
国際頭痛分類第2版（ICHD-II）の片頭痛と診断された70例（男性22例、女性48例）、平均年齢 35.5 ± 14.3 歳（mean ± S.D.）において片頭痛の発作予防に対する鍼治療効果を検討した。すなわち、前兆のない片頭痛57例（81.4%）および前兆のある片頭痛13例（18.6%）において検討した。

2. 緊張型頭痛に対する鍼治療効果

国際頭痛分類第2版（ICHD-II）の緊張型頭痛と診断された61例（男性16例、女性45例）、平均年齢 50.8 ± 17.2 歳（mean

C. 研究結果

1. 片頭痛の発作予防に対する鍼治療効果
第1群：片頭痛のみ（11例）男性2例女性7例、年齢 38.2 ± 16.1 歳（MA4例、MO7例）では頭痛日数が鍼治療前7.9日から鍼治療後2.0日に減少した。

第2群：慢性片頭痛（5例）男性1例女性4例年齢 35.0 ± 18.3 歳（MA2例、MO8）では頭痛日数が鍼治療前23.6日から鍼治療後11.6日に減少した。

第3群：片頭痛＋緊張型頭痛（21例）男性7例女性14例、年齢 42.2 ± 13.1 歳（MA1例、MO20例）では頭痛日数が鍼治療前22.5日から鍼治療後15.2日に減少した。

第4群：片頭痛＋薬物乱用頭痛の既往（12例）男性4例女性8例、年齢 37.2 ± 12.1 歳（MA4例、MO8例）では頭痛日数

が鍼治療前 28.3 日から鍼治療後 23.7 日に減少した。

2. 緊張型頭痛に対する鍼治療効果

国際頭痛分類第 2 版 (ICHD - II) の緊張型頭痛と診断された 61 例 (男性 16 例、女性 45 例)、平均年齢 50.8±17.2 歳 (mean ±S.D.) は以下の 2 群に分けて検討した。

第 1 群：頻発反復性緊張型頭痛 (23 例)

男性 5 例 女性 18 例

1. 年齢 51.3±16.1 歳
2. 罹病期間 2383.7±2888.3 日
3. 入院 3 例 外来 20 例
4. 薬物療法 18/23 例 78.3%

第 2 群：慢性緊張型頭痛 (38 例) : 男性 11 例 女性 27 例

1. 年齢 50.2±18.3 歳
2. 罹病期間 2415.7±2319.4 日
3. 入院 9 例 外来 29 例
4. 薬物療法 31/38 例 81.5%

結果としては、頻発反復性緊張型頭痛では、有効率が 82.6%であった。慢性緊張型頭痛では、有効率が 57.9%であった。

自覚症状が 5 割以上改善するまでの期間と回数は、頻発反復性緊張型頭痛では、2.8 回、14.9 日であった。慢性緊張型頭痛では、8.9 回、35.9 日であり、頻発反復性緊張型頭痛の方が少ない回数で短期間に有意に改善した ($p < 0.01$)

考察

片頭痛患者における鍼治療は、片頭痛のみの患者では高い有効性を得られたが、慢性化片頭痛、薬物乱用頭痛などを伴ってくると有効率がやや低下した。しかし、これらは薬剤による治療に抵抗性がつよい頭痛でもあり、鍼治療は薬物療法との併用効果や慢性化の予防効果もあるため、片頭痛治療において、今後さらに検討されるべき分野といえる。また、片頭痛患者でも、妊娠・妊娠希望など薬物療法が用いづらい患者では非薬物療法の選択肢の一つとして重要である。

緊張型頭痛を頻発反復性緊張型頭痛と慢性緊張型頭痛に分類し検討した結果、効果に差異が認められたことより、頻発反復性緊張型頭痛は、鍼治療を 3 回または 2 週間継続し、慢性緊張型頭痛は鍼治療を 8 回または 6 週間継続し効果判定することが推奨できる。緊張型頭痛を以上 2 つに分け鍼治療を行うことは、緊張型頭痛患者への鍼治療の効果発現までの回数や期間を説明するために有用と考えられる。

結論

片頭痛の発作予防に対する鍼治療効果は明らかに認められるため、今後薬物治療との併用、あるいは薬物治療が困難な例において有効と考えられた。また、緊張型頭痛に対する鍼治療効果も明らかにみとめられるため、今後緊張型頭痛の治療においても活用されるべきと考えられた。

D. 健康危険情報

本研究において健康に危険を及ぼすような情報は無い。

E. 研究発表

1. 論文

書籍：

日本神経学会・日本頭痛学会監修。

慢性頭痛の診療ガイドライン作成委員会編。慢性頭痛の診療ガイドライン 2013、東京：医学書院；2013、1-349

荒木信夫。慢性頭痛の診療ガイドライン (2013)。今日の治療指針 2014 東京：医学書院；2013、1889-1897

雑誌：

荒木信夫。片頭痛と自律神経。ペインクリニック 34 (7) : 913-918、2013

山元敏正、荒木信夫。自律神経疾患の治療の進歩。神経治療 30 (4) : 431-435、2013

荒木信夫. 「慢性頭痛の診療ガイドライン
2013 改訂版」概要と改訂のポイント.
Mursing BUSINESS 7(8):46-47、2013

荒木信夫. 慢性頭痛の診療ガイドライン
2013 改訂のポイント. 日本薬剤師会雑誌
66 (3) 261-264、2014

2. 学会発表

西洋医学的な治療で期待すべき効果が得られなかった緊張型頭痛に対する鍼治療の臨床的検討 菊池 友和、山口 智、小俣 浩、鈴木 真理、荒木 信夫 神経治療学 (0916-8443)30 巻 5 号 Page695 (2013. 09)

薬物乱用頭痛の診断と治療 荒木 信夫
神経治療学 (0916-8443)30 巻 5 号
Page603 (2013. 09)

F. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

該当なし

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

該当なし

Arterial spin labelingを用いた鍼刺激が片頭痛患者の脳血流に及ぼす影響 2

埼玉医科大学 東洋医学センター¹，埼玉医科大学神経内科² 山口 智¹ 荒木信夫²

研究要旨

【目的】片頭痛の発作予防に対する鍼治療は、予防薬物と同等な効果があることが報告されている。しかしその作用機序は不明であり、多くの課題が残されている。そこで、本研究の目的は、鍼刺激が片頭痛患者（患者群）と健康成人（健康群）の脳血流に及ぼす影響を造影剤を使用しないArterial spin labeling（ASL）MRIを用いて比較し作用機序を検討することである。

【方法】対象は患者群10例（男性3例女性7例平均年齢39.2±11.2歳（mean±S.D.））と健康群10例（男性6例女性4例平均年齢32.3±9.2歳）である。鍼刺激部位は側頭筋咬筋僧帽筋板状筋上のツボに10分間の置鍼を行った。使用鍼は非磁性針（銀鍼直径0.20mm鍼長50mm）を用いた。脳血流の測定方法は、3TのMRI（Siemens社製MAGNETOM Verio）を用い、pulsed ASL法により、脳血流測定を1回の測定で4分間行い、鍼刺激前、鍼刺激中10分、鍼刺激終了直後、終了15分・30分後に6回実施し、統計学的検定を行った。

【結果】健康群、患者群共に弁蓋部や帯状回、島および視床、視床下部の血流が鍼刺激中5・10分で増加し、さらに患者群では鍼刺激終了直後には同部位の血流増加が持続し周囲の大脳皮質にも遷延し終了後15・30分後にも同部位の血流増加が持続していた。

【考察・結論】鍼治療は高位中枢を介し片頭痛の発作予防に寄与している可能性が示された。

研究分担者

山口 智 埼玉医科大学 東洋医学センター講師
荒木信夫 埼玉医科大学神経内科 教授

A. 研究の目的

東洋古来の伝統医療である鍼治療は、単に局所の反応だけでなく、主に高位中枢を介して自律神経や免疫・内分泌機能などの反応が関与し、数多くの疾患や症状の改善に寄与しているという理念のもとに、我々は、鍼治療が各種生体機能や主に疼痛性疾患に及ぼす影響を研究してきた。これまで、一次性頭痛である緊張型頭痛の発症機序や鍼治療の作用機序について、plethysmographyやEMG, thermography, open loop video pupillographyを用いて検討した結果、頭痛の発症機序は、頭部の筋群よりも後頸部や肩甲上部・肩甲間部の筋群の過緊張が重要な役割を果たし、鍼の作用機序は

こうした筋群の過緊張を緩和し、循環動態を正常化することにより頭痛の改善に寄与していることがわかった。また、こうした鎮痛機序は単に局所の反応（軸索反射）のみならず高位中枢（Edinger-Westphal核・中脳中心灰白質）に影響を及ぼし、自律神経系が重要な役割を果たしていることを明らかにした。さらに、緊張型頭痛患者と健康成人の鍼刺激による生体反応を比較した結果、患者と健康成人に及ぼす影響は異なり、鍼刺激はホメオスターティックな反応であることも示唆された。そこで本研究の目的は、片頭痛の病態と片頭痛の発作予防に対する鍼治療の作用機序について、非侵

襲的で反復検査が可能であるASLMRIを用い、脳血流量の変化を鍼治療前後で比較することである。

B. 研究方法

対象は、関係学会のHPなどにより募集した。片頭痛患者の含有基準は、年齢が18歳以上65歳未満、国際頭痛分類第2版の片頭痛の診断分類を満たすことである。除外基準は、脳血管障害等の既往歴、緊張型頭痛、群発頭痛を有するものである。また、健康成人の含有基準は、年齢が18歳以上65歳未満、除外基準は、脳血管障害等の既往歴、国際頭痛分類第2版の一次性頭痛を有するものである。

方法は、被験者に30分間以上の安静を保持した後、鍼刺激前、鍼刺激中5分・10分、鍼刺激終了直後、終了後15分・30分において3TのMRI装置を用い、全脳平均血流に対する相対的な血流分布を分析し、鍼治療前後の脳血流量を比較した。鍼刺激部位は、頸肩部では板状筋上の完骨穴、僧帽筋上部線維部上の肩井穴および頭部では側頭筋上の額厭穴、顔面部では咬筋・翼突筋上の頬車穴へ長さ50mm、直径0.2mmの非磁性鍼（銀鍼：青木実意社製）を使用した。

統計学的手法は、鍼治療前後の比較についてはANOVA法を用い、各群間に差が認められた場合には、post-hocテストにTukey-Kramer法を用い検討した。

ASLMRIは、MRI装置3TのSiemens社製MAGNETOM Verioを用い、pulsed ASLにより、全脳で11スライスの脳血流測定を行い、1回で4分間の平均脳血流を測定した。得られた脳血流画像は脳実質外の信号を取り除いた後、スライス間の補間により28スライスの画像とした。また、安静時の画像にその後の画像の位置あわせを行った後に、線形変換と非線形変換をStatistical Parametric Mapping (SPM) により行い、灰白質の標準脳画像に変形した。さらに画像平滑化を行った後に、SPMで安静時画像とその後の画像について統計学的検定を行った。

倫理的配慮

本研究は片頭痛患者については埼玉医科大学病院IRB (Institutional Review Board) と同総合医療センターIRBを、健康成人については埼玉医科大学倫理委員会の承認を受け、対象者全員からinformed consent を得て施行した。

対象となる個人の人権の擁護

対象者は試験に先立ち本試験について十分な説明を受け、本試験を拒否する権利、又は拒否をすることにより、対象者が不利益な取り扱いを受けないことを保障した。

対象者に理解を求め同意を得る方法

本試験はヘルシンキ宣言・GCPに基づき、試験開始に先立ち被験者に対し1. 鍼治療が脳血流へ与える調査の目的 2. 脳血流の測定方法 3. 予期される臨床上的利益及び危険性又は不便 4. 試験の結果が発表される場合であっても、被験者のプライバシーは保障されることについて説明をし、文書により、本試験の参加についての自由意志による同意を得た。

C. 研究結果

対象は、片頭痛患者10例（男性3例女性7例平均年齢 39.2 ± 11.2 歳（mean \pm S.D.））と健康成人10例（男性6例女性4例平均年齢 32.3 ± 9.2 歳）であった。

鍼刺激前の片頭痛患者の脳血流量は、健康成人と比較した結果、後頭葉と右側頭葉で高く、左側頭葉と頭頂葉喫前部で低下していた。

片頭痛患者と健康成人は共に、視床や視床下部および弁蓋部や帯状回、島の血流が、鍼刺激中5分・10分後は増加した。また、片頭痛患者では刺激終了直後および15分・30分後に同部位の血流の増加が持続していた。さらに、片頭痛患者は健康成人と比較した結果、鍼刺激中・刺激終了後で視床や視床下部および弁蓋部や帯状回、島の血流増

加反応が顕著であり、頭頂葉喫前部が特異的に増加した。

考察

片頭痛患者と健康成人では鍼刺激による反応性が異なることが示された。近年、片頭痛の病態の一つに中枢における脳の機能異常が関与していることが報告されており、今回の成績から鍼治療は、こうした高位中枢の反応性を正常化することにより、発作予防に寄与している可能性が考えられた。

D. 健康危険情報

なし

E. 研究発表

1. 論文発表

1. 千々和香織, 菊池友和, 山口智, 坂井文彦, 丸木雄一. 神経難病を中心とした神経内科領域における鍼治療—専門医と鍼灸師が連携するためには— 現代鍼灸学13巻1号Page9-15, 2013
2. 菊池友和, 山口智. 貨幣状頭痛に対する鍼治療効果 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医道の日本 73 巻2号Page104 - 112 (2014 .2)
3. 小内愛, 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27回) がん患者に対する鍼治療 化学療法による末梢神経障害に対する鍼治療の実際. 医道の日本72巻11号 Page104-112(2013. 11)
4. 佐々木詠教, 小俣浩, 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26回) 帯状疱疹痛に対する鍼治療. 医道の日本72巻10号 Page102-111(2013. 10)
5. 金子聡一郎, 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24回) 重症筋無力症に対する鍼治療. 医道の日本72巻8号 Page118-127(2013. 08)

6. 山口智, 菊池友和頭痛診療におけるPitfallと解決策 薬物療法で期待すべき効果が得られない患者に対する次の治療ツール 予防薬, 湯液(漢方薬)でも患者の満足度が得られなかったら. Headache Clinical & Science4巻1号 Page24-25(2013. 05)
 7. 山口智, 菊池友和, 小俣浩, 鈴木真理, 磯部秀之. 片頭痛発作予防に対する鍼治療効果 頭痛日数の減少と頭頸部等筋群の圧痛改善との関連について. 日本温泉気候物理医学会雑誌76巻3号 Page200-206(2013. 05)
 8. 山口智, 菊池友和, 鈴木真理, 荒木信夫. 【神経内科診療における鍼灸治療】神経内科診療と連携した鍼灸活用の実際. 神経内科78巻5号 Page530-537(2013. 05)
 9. 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21回) めまいに対する鍼治療. 医道の日本72巻5号 Page116-126(2013. 05)
- ##### 2. 学会発表
1. 菊池 友和 専門医より依頼のあった片頭痛・緊張型頭痛の鍼治療効果 2013年11月 現代医療鍼灸臨床研究会
 2. 菊池友和. ここまでわかった鍼灸医学 基礎と臨床の交流 頭痛に対する鍼灸治療の効果と現状 臨床研究の立場から .全日本鍼灸学会 学術大会抄録集62回 75. 2013.
 3. 山口 智, 菊池友和, 小俣 浩, 鈴木真理, 松田博史, 本田憲業, 荒木信夫. ASL MRI を用いた鍼刺激が脳血流に及ぼす影響—片頭痛に対する鍼治療効果— 日本頭痛学会誌40巻2号 ; 337, 2013
 4. 菊池友和, 山口 智, 小俣 浩, 鈴木真理, 松田博史, 本田憲業, 荒木信夫. 片頭痛の病態と鍼の作用機序に関する検討 日本頭痛学会誌40巻2号 ; 337, 2013

5. 千々和香織, 菊池友和, 瀧口直子, 浅野賀雄, 丸木雄一, 坂井文彦. 慢性頭痛に対する鍼治療の効果と作用機序に関する研究日本頭痛学会誌40巻2号 ; 338, 2013
6. 鈴木真理, 山口 智, 菊池友和, 小俣 浩, 磯部秀之, 荒木信夫. 月経関連片頭痛患者3症例における月経時の頭痛に対する鍼治療効果の検討. 埼玉医科大学 東洋医学センター, 同 神経内科・脳卒中内科. 日本頭痛学会誌40(2) ; 336, 2013
7. 小俣浩, 菊池友和, 山口智, 大野修嗣, 磯部秀之. 鍼刺激部位差による自律神経機能の影響. 日本温泉気候物理医学会雑誌77巻1号 Page49-50(2013. 11)
8. 山口智, 菊池友和, 小俣浩, 磯部秀之, 大野修嗣, 三村俊英. 東洋医学診療(鍼・灸)で取り扱う頭痛患者の鎮痛効果について(第21報) Arterial spin-labeled MRIを用いた片頭痛患者の検討. 日本温泉気候物理医学会雑誌77巻1号 Page48-49(2013. 11)
9. 菊池友和, 山口智, 小俣浩, 鈴木真理, 荒木信夫. 西洋医学的な治療で期待すべき効果が得られなかった緊張型頭痛に対する鍼治療の臨床的検討. 神経治療学30巻5号 Page695(2013. 09)
10. 小俣浩, 山口智, 菊池友和, 田村直俊, 荒木信夫. 顔面痛と鍼治療効果. 自律神経50巻2号 Page149(2013. 06)
11. 鈴木真理, 山口智, 小俣浩, 菊池友和, 小内愛, 磯部秀之, 三村俊英, 君嶋真理子. 月経関連片頭痛に対する鍼治療効果. 全日本鍼灸学会学術大会抄録集62回 Page186(2013. 06)
12. 鈴木真理, 山口智, 菊池友和, 小俣浩, 小内愛, 磯部秀之, 石井弘子, 大野修嗣. 慢性片頭痛に対する鍼治療の効果発現期間について. 日本東洋医学雑誌64巻別冊 Page218(2013. 04)

F. 知的所有権の取得

1. 特許取得
該当なし
2. 実用新案登録
該当なし
3. その他
該当なし

Ⅲ. 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
Iwashita T, Shimizu T, Shibata M, Toriumi H, et al.	Activation of extracellular signal-regulated kinase in the trigeminal ganglion following both treatment of the dura mater with capsaicin and cortical spreading depression	Neurosci Res	77	110-119	2013
Sato H, Shibata M, Shimizu T, Toriumi H, et al.	Differential cellular localization of antioxidant enzymes in the trigeminal ganglion	Neuroscience	248	345-358	2013
Unekawa M, Tomita Y, Toriumi H, Suzuki N.	Potassium-induced cortical spreading depression bilaterally suppresses the electroencephalogram but only ipsilaterally affects red blood cell velocity in intraparenchymal capillaries	J Neurosci Res	91	578-584	2013
清水利彦	群発頭痛の治療に関する最近の進歩	臨床神経学	53	1131-1133	2013
清水利彦	臨床病態におけるRASの関与-片頭痛	Angiotensin Research	10	111-115	2013
清水利彦	群発頭痛発作期の急性期治療, 予防療法はどのように行うか	日本頭痛学会誌	40	48	2013
清水利彦	片頭痛の治療新薬	日本頭痛学会誌	40	84-86	2013

著者	論文タイトル	掲載誌	巻号	ページ	出版年
柴田 護	片頭痛の予後はどうか？	日本頭痛学会誌	40	30-31	2013
鈴木則宏	頭痛学のいま	Medical Asahi	42	12-15	2013
清水利彦	片頭痛	Medical Asahi	42	19-21	2013
鈴木則宏, 清水利彦	冷たいものを飲むと頭痛がするのは どうしてですか？	Clinical Neuroscience	31	1459	2013
鈴木則宏, 清水利彦	片頭痛／群発頭痛	日本医師会雑誌	142	S261-S263	2013
滝沢 翼, 清水利彦, 鈴木則宏.	頭痛	診断と治療	101	1600-1606	2013
清水利彦	頭痛	Clinical Neuroscience	31	523-525	2013
清水利彦	緊張型頭痛 病態と治療法	最新医学	別冊	152-159	2013
柴田 護	片頭痛の予後はどうか また、片頭痛の慢性化とは何か	Modern Physician	33	1210-1214	2013

著者	論文タイトル	掲載誌	巻号	ページ	出版年
柴田 護	慢性片頭痛	最新医学	別冊	127-135	2013
柴田 護、鈴木則宏	概日リズムと疾患 頭痛	日本臨床	71	2135-2140	2013
柴田 護	片頭痛慢性化の病態生理	臨床神経	53	1220-1222	2013
齊藤真吾, 伊藤和憲, 北小路博司	咬筋へのマスタードオイル投与により引き 起こされた口腔顔面痛に対する鍼通電の効果	PAIN RESEARCH	28	167-176	2013
伊藤和憲, 齊藤真吾	咬筋に対する遅発性筋痛モデル作成の試み	慢性疼痛	32	177-182	2013
内藤由規, 齊藤真吾, 伊藤和憲	顔面部の圧痛と身体の痛みに関連性はあるか?	慢性疼痛	32	207-212	2013
齊藤真吾, 伊藤和憲	炎症モデルの違いによる広汎性侵害抑制調節	慢性疼痛	32	171-176	2013
伊藤和憲, 内藤由規, 佐原俊作, 齊藤真吾	鍼灸刺激による脳内物質の変化から 神経内科領域の可能性を探る	神経内科	78	543-549	2013
荒木信夫	片頭痛と自律神経	ペインクリニック	34	913-918	2013

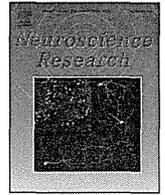
著者	論文タイトル	掲載誌	巻号	ページ	出版年
山元敏正, 荒木信夫	自律神経疾患の治療の進歩	神経治療	30	431-435	2013
荒木信夫	「慢性頭痛の診療ガイドライン 2013 改訂版」 概要と改訂のポイント	Nursing BUSINESS	7	46-47	2013
荒木信夫	慢性頭痛の診療ガイドライン 2013 改訂のポイント	日本薬剤師会雑誌	66	261-264	2014
山口 智, 菊池友和	頭痛診療におけるPitfallと解決策 薬物療法で期待すべき効果が得られない患者に対する次の治療 ツール 予防薬、湯液 (漢方薬)でも患者の満足度が得られなかったら	Headache Clinical & Science	4	24-25	2013
菊池友和, 山口 智	めまいに対する鍼治療	医道の日本	72	116-126	2013
菊池雅美, 山口 智	腰椎椎間板ヘルニアに対する鍼灸治療	医道の日本	72	111-120	2013
山口 智, 菊池友和ほか	片頭痛発作予防に対する鍼治療効果, 頭痛日数の減少と頭頸部等筋群の圧痛改善との関連について	日本温泉気候物理医学会雑誌	76	200-206	2013

著者	論文タイトル	掲載誌	巻号	ページ	出版年
山口 智 , 菊池友和, 鈴木真理, 荒木信夫	神経内科診療と連携した鍼灸活用の実際	神経内科	78	530-537	2013
鳥海春樹	頭痛専門診療における鍼灸併用の可能性	神経内科	78	550-555	2013

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
荒木信夫	慢性頭痛の診療ガイドライン(2013)	福井次矢・高木誠・小室一成	今日の治療指針 2014	医学書院	東京	2013	1889-1897

IV. 研究成果の刊行物・別冊



Activation of extracellular signal-regulated kinase in the trigeminal ganglion following both treatment of the dura mater with capsaicin and cortical spreading depression



Tatsuo Iwashita*, Toshihiko Shimizu, Mamoru Shibata, Haruki Toriumi, Taeko Ebine, Megumi Funakubo, Norihiro Suzuki

Department of Neurology, School of Medicine, Keio University, Japan

ARTICLE INFO

Article history:

Received 19 June 2013

Received in revised form 5 August 2013

Accepted 7 August 2013

Available online 17 August 2013

Keywords:

ERK

Trigeminal ganglion

TRPV1

Cortical spreading depression

ABSTRACT

Extracellular signal-regulated kinase (ERK) is known to be phosphorylated after exposure to noxious stimuli. In this study, we investigated the response in the dura mater to nociceptive stimulation, which is thought to be responsible for the pathogenesis of headaches, including migraines. We also examined the level of ERK phosphorylation in the trigeminal ganglion following cortical spreading depression (CSD), which is thought to play an important role in migraine pathophysiology. Western blot and immunohistochemical analyses showed a significant increase in the ERK phosphorylation levels 3 min following an application of 10 mM capsaicin to the dura mater. This increase was inhibited after an application of the TRPV1 antagonist capsazepine or a MEK inhibitor. An immunohistochemical analysis revealed that most of the small-sized trigeminal ganglion neurons with TRPV1-immunoreactivity that innervate the dura mater exhibited pERK-immunoreactivity, suggesting that these neurons had responded to nociceptive stimulation. CSD increased the level of ERK phosphorylation 30 min after its elicitation, and this response was inhibited by a prior intraventricular administration of TRPV1 antagonist. These results indicate that CSD can activate dural TRPV1 to send nociceptive signals to the trigeminal system, and they provide important clues regarding the relationship between CSD and the trigeminovascular system.

© 2013 Elsevier Ireland Ltd and the Japan Neuroscience Society. All rights reserved.

1. Introduction

Extracellular signal-regulated protein kinases (ERKs) are mitogen-activated protein kinases (MAPKs) that are activated by membrane depolarization and calcium influx. ERK activation is also regulated by upstream kinases, which are referred to as MAPK/ERK kinases (Roux and Blenis, 2004). The phosphorylation of ERK in response to the noxious stimulation of peripheral transient receptor potential vanilloid subfamily member 1 (TRPV1) receptors has been observed in the dorsal root ganglia, spinal dorsal horn, and the trigeminal caudal nucleus (Ji et al., 1999; Dai et al., 2002; Shimizu et al., 2006). Accordingly, changes in ERK phosphorylation levels can be regarded as a sensitive marker for TRPV1 stimulation. The phosphorylated ERK is known to induce post-translational and transcriptional regulation, and these changes are likely related to the generation of nociceptive-specific pain plasticity and to inflammation-induced pain hypersensitivity (Obata and Noguchi,

2004; Ji et al., 2009). Recent animal experiments revealed the changes in ERK phosphorylation levels in the trigeminal ganglion and meningeal arteries following the nociceptive stimulation of the dura mater, and these results are considered to contribute to the migraine-related sensitization (Yan et al., 2012; Zhang et al., 2013).

The dura mater is widely recognized as one of the most important structures in the generation of headaches (Olesen et al., 2009). It is densely innervated by trigeminal nerve fibers that contain calcitonin gene-related peptide and substance P (Andres et al., 1987; Uddman et al., 1989; Reuss et al., 1992; Messlinger et al., 1993). In addition to these nerve fibers, we have demonstrated the existence of nerve fibers in the dura mater that are positive for the TRPV1 receptor, which is known to be a capsaicin-, proton- and heat-sensitive, cation-selective channel. We have also reported that these TRPV1-containing nerve fibers are derived from the trigeminal ganglion (Shimizu et al., 2007).

In addition to the dura mater, cortical spreading depression (CSD) is responsible for the development of migraine aura (Olesen et al., 1990). CSD was initially reported by Leão in the rabbit cerebral cortex as a reversible response that manifested itself through the depolarization of neurons and glial cells that was followed by the sustained suppression of spontaneous neuronal activity (Leão, 1944). CSD is known to be provoked by chemical stimulation by

* Corresponding author at: Department of Neurology, School of Medicine, Keio University, 35 Shinanomachi, Shinjuku-ku, Tokyo 160-8582, Japan.
Tel.: +81 3 5363 3788; fax: +81 3 3353 1272.

E-mail address: iwashita@a6.keio.jp (T. Iwashita).

potassium and to spread through the cortical tissue from the initiation site at a rate of 2–5 mm/min, suppressing the EEG and deflecting direct current (DC) potential. Hadjikhani et al. observed blood oxygenation level-dependent signal changes during visual aura in migraine patients and suggested the possibility that CSD generates the aura in the human visual cortex (Hadjikhani et al., 2001). However, the relationship between CSD and the activation of the trigeminovascular system, which is known to be related to migraine pain, remains unclear.

Here, we investigated ERK phosphorylation in the trigeminal ganglion following both nociceptive stimulation of the dura mater and CSD using Western blot analysis and immunohistochemical methods. Our results provide evidence that CSD can activate dural TRPV1 receptors to send nociceptive signals to the trigeminal system.

2. Materials and methods

2.1. Animals

Experiments were performed on male Sprague-Dawley rats ($n=94$; body weight, 250–270 g), 20 of which were used for immunohistochemistry and the rest used for Western blot analysis. All experimental procedures were approved by the Animal Welfare Committee of Keio University (No. 08033). All procedures were undertaken with the utmost caution to minimize the suffering of the animals.

2.2. Experimental protocols

2.2.1. Temporal profile of capsaicin-induced ERK phosphorylation

The animals were deeply anesthetized by an intraperitoneal injection of pentobarbital sodium (30 mg/kg body weight). The head of each animal was fixed in a stereotaxic frame, and a burr hole (10 mm diameter) was made in the skull bone around the confluent sinus with the dura mater intact. A bank to prevent the spreading of the vehicle (10% ethanol in saline) or capsaicin solution was built around the burr hole using dental cement (Ionosit, DMG, Hamburg, Germany). Capsaicin was dissolved in 10% ethanol in saline. For control, we used the vehicle solution (10% ethanol in saline). To minimize the effect of the removal of the skull bone on the dural nociceptive nerve fibers, the surface of the dura mater surrounded by the dental cement was filled with saline, and the animal was kept anesthetized for 30 min. After these procedures, either the vehicle or 10 mM of capsaicin (8-methyl-*N*-vanillyl-trans-6-nononamide, NO.M2028; Sigma, St. Louis, MO) was applied to the dura mater. The animals that received 3 min of saline were assigned to the control group. The capsaicin-treated animals were divided into three groups depending on the duration capsaicin administration: 1 min, 3 min, or 5 min. Each group contained 10 animals (6 animals were analyzed by Western blotting and 4 animals by immunohistochemistry). In addition, we observed longer effects of capsaicin on ERK phosphorylation: 15 min, 30 min, or 60 min (6 animals in each group for Western blotting).

2.2.2. Effects of TRPV1 receptor antagonist and MEK inhibitors on capsaicin-induced ERK phosphorylation

To examine the effects of a TRPV1 antagonist, 25 mM of capsazepine (N-[2-(4-chlorophenyl)ethyl]-1,3,4,5-tetrahydro-7,8-dihydroxy-2H-2-benzazepine-2-carbothioamide, No. C191-5MG; Sigma, St. Louis, MO) was applied to the dura mater immediately after the removal of the skull bone. 30 min later, the capsazepine was washed out with saline, and capsaicin was applied. After 3 min, the animals were sacrificed, and the trigeminal ganglia were removed and prepared as a homogenate for Western blot analysis.

We also investigated the effects of MAPK extracellular signal-regulated kinase (MEK) inhibitors on the phosphorylation of ERK. PD98059 (50 μ M, #9900; Cell Signaling Technology, Beverly, MA) or U0126 (100 μ M, #9903; Cell Signaling Technology, Beverly, MA) was applied to the dura mater for 30 min followed by capsaicin application and homogenate preparation (4 animals in each group).

2.2.3. Retrograde tracer experiment

A burr hole (10 mm in diameter) was made in the skull bone around the confluent sinus with the dura mater left intact. A bank was built around the burr hole using dental cement (Ionosit, DMG) to prevent the spreading of the tracer. A retrograde neuronal tracer, true blue (trans-1, 2-bis [5-amidino-2-benzofuranyl] ethylene-2HCl; Invitrogen) crystal (0.5 mg), was applied to the dura mater (4 animals). Following the application of the tracer, the application site was covered with the skull bone and dental cement.

Two weeks after the tracer application, the skull bone was removed again, and the dura mater where the tracer was applied was exposed. After a 3 min application of 10 mM capsaicin, the animals were perfused transcardially, and the trigeminal ganglia were dissected and processed for immunohistochemistry.

2.2.4. Effects of CSD on the phosphorylation of ERK

Male Sprague-Dawley rats were anesthetized with isoflurane (1.0% in room air with a flow rate of 400 mL/min) via a concentration-controllable anesthesia unit (400; Univentor, Zejtun, Malta). Body temperature was maintained with a heating pad and thermocontroller (BWT-100; Bioresearch Center Co., Nagoya, Japan). Each animal was fixed to a head-holder (SG-4N, modified to be flexible around the horizontal axis; Narishige Scientific Instrument Laboratory, Tokyo). For the measurement of DC potentials, an Ag/AgCl electrode (tip diameter = 200 μ m, EEG-5002Ag; Bioresearch Center Co.) was inserted 200 μ m under the pia mater (2 mm posterior and 2 mm lateral to bregma) and fixed with dental cement. Ag/AgCl reference electrodes (EER-5004Ag; Bioresearch Center Co.) were placed in the subcutaneous tissue. DC potentials were amplified at 1–100 Hz and digitized at 1 kHz with a differential headstage and differential extracellular amplifier (Models 4002 and EX1; Dagan Co., Minneapolis, MN). The DC electrodes were set on the bilateral exposed parietal cortex under anesthesia. We also installed small open cranial windows near each electrode for inducing CSD using a 1 M KCl solution. Animals were divided into three groups with 5 animals in each group. In the control group (group-1), saline was applied to the open cranial window instead of a 1 M KCl solution. In group-2, bilateral trigeminal ganglia were dissected immediately after the first wave of CSD. In group-3, the ganglia were removed 30 min after the first wave of CSD. In another experiment, animals were divided into two groups. In one group, capsazepine (50 nM) was injected into the cisterna magna (group-5). For the control group, vehicle (20% DMSO in saline) was injected instead of capsazepine (group-4). In group 4 and 5, capsazepine or vehicle was administered 30 min before 1 M KCl application. In both groups, 1 M KCl was applied on the cranial window to induce CSD, and 30 min later, bilateral trigeminal ganglia were dissected. In both experiments, the specimens were prepared for Western blot analysis.

2.3. Western blot analysis

After the bilateral trigeminal ganglia were dissected, they were homogenized in ice-cold lysis buffer (20 mM Tris [pH 7.4], 2 mM EDTA, 20 mM glycerophosphate, 1 mM Na_3VO_4 , 2 mM NaF, and complete protease inhibitor). The proteins were separated using 10% sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and electrophoretically transferred to polyvinylidene difluoride membranes (Millipore Corporation). After treating with

a blocking solution containing 4% nonfat dry milk for 30 min, the membranes were incubated with an anti-phospho-p44/42 MAPK antibody (pERK, raised in rabbits [rabbit polyclonal], 1:1000, #9101; Cell Signaling Technology, Beverly, MA) or an anti-p44/42 MAPK antibody (ERK, raised in rabbits, 1:1000, #9102; Cell Signaling Technology, Beverly, MA) in blocking buffer overnight at 4 °C. Then, the membranes were washed with Tris-buffered saline containing 0.05% Tween-20 (TBS-T) and were incubated with horseradish peroxidase-conjugated goat anti-rabbit IgG (1:10,000; Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA) for 2 h at room temperature. The immunoreactive bands were visualized using enhanced chemiluminescence and detected using a luminoimage analyzer (Las-4000; Fujifilm, Tokyo, Japan). The ratios of the intensities of phospho-ERK1 to total ERK1 and phospho-ERK2 to total ERK2 were calculated using the image analysis software Multi Gauge version 3.0 (Fujifilm, Tokyo, Japan). The ratios were normalized to the control samples and subjected to statistical analysis.

2.4. Immunohistochemical analysis

Animals in each group were transcardially 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 a 0.01 M phosphate buffer, pH 7.0. Immediately after perfusion and fixation, the trigeminal ganglia were dissected. After cryoprotection, the specimens were processed into 7 μ m-thick sections using a cryostat (Reichert-Jung Cryocut 1800; Leica Instruments, Heidelberg, Germany). For antigen retrieval, the slides were placed in boiling 0.01 M citrate buffer solution at pH 7.0 (Muto Pure Chemicals, Tokyo, Japan) for 10 min. After this procedure, the cryostat sections were preincubated with 10% normal donkey serum for 30 min. Then, the preincubated sections were incubated with the primary antibodies for 48–72 h at room temperature, washed with 0.01 M PBS, and subsequently incubated with species-specific secondary antibodies for 2 h at room temperature. The specimens were mounted in buffered glycerol (pH 8.6), and the slides were labeled with anti-phospho-p44/42 MAPK antibody (pERK, 1:1000). For double staining, the slides were double-labeled with anti-pERK antibody and anti-NeuN antibodies (raised in a mouse; code MAB 377; Millipore, Billerica, MA; 1:200). The immunoreactivities of the primary antibodies were visualized using species-specific secondary antibodies raised in donkeys and were conjugated to Cy3 or fluorescein isothiocyanate (FITC); all of the secondary antibodies were obtained from Jackson ImmunoResearch Laboratories (West Grove, PA). For the retrograde tracing experiment, sections were labeled using anti-pERK and anti-TRPV1 (raised in a rabbit; code KM 018; TransGenic, Kumamoto, Japan; 1:200) antibodies. Secondary antibody conjugated to Cy3 and FITC were used to distinguish the immunolabeling from the labeling with true blue. The same immunostaining procedures were used for the control tissue sections with the omission of the primary antisera.

2.5. Quantitative analysis of immunohistochemistry and tracer experiments

The immunolabeled specimens were examined under an Olympus BX 50 microscope (Olympus, Tokyo, Japan) fitted with highly discriminating filters. Images from the BX 50 microscope were captured via a Sony CCD video camera (model XCD-SX 900; Sony, Tokyo, Japan) on an EPSON computer.

For quantitative immunohistochemical analysis, every third section was used. We analyzed the first 16 sections per ganglion, including the first branch of the trigeminal ganglionic neurons, because the superior sagittal sinus is known to be innervated by the ophthalmic division of the trigeminal ganglia. To calculate the ratio of pERK-immunoreactive (IR) neurons, we counted the total

number of trigeminal ganglionic neurons and the number of pERK-IR neurons. With regard to the pERK-IR neurons, only those neurons that showed a clear increase in immunoreactivity above the background staining were counted. The total number of trigeminal ganglionic neurons with visible nuclei was obtained using a conventional light microscope. All of the areas of each section were randomly analyzed by two blinded observers. For the quantitative analysis of the tracer experiment in the trigeminal ganglion, we counted, from the top to the bottom, the number of true blue-containing neurons in every third section that contained nuclei. In addition, we counted the numbers of both pERK-IR and TRPV1-IR neurons showing an accumulation of the true blue tracer. Cross-sectional areas of the soma were determined using the image analyzing software of the BZ 9000 microscope (Keyence, Japan).

2.6. Statistical analysis

The data are presented as the mean \pm SD and were compared using a Kruskal–Wallis one-way analysis of variance followed by a Mann–Whitney test for multiple comparisons (SPSS for Windows, version 21; SPSS Inc., Chicago, IL). The differences between the means were considered statistically significant at $p < 0.05$.

3. Results

3.1. Temporal profile of capsaicin-induced ERK phosphorylation in the trigeminal ganglion

To identify the temporal profile of ERK phosphorylation in the trigeminal ganglion, we stimulated the dura mater by a local application of a capsaicin solution. For the Western blot analysis, the antibody specific for the phosphorylated form of ERK identified two bands at molecular weights of 44 and 42 kDa, corresponding to phosphorylated ERK1 and ERK2, respectively. Representative blots of the trigeminal ganglion pERK and ERK are shown in Fig. 1A. In vehicle-treated animals, there was a basal level of phosphorylated ERK immunoreactivity that increased at 1 min and peaked at 3 min after stimulation. The ratios of phosphorylated ERK/total ERK at 1, 3, and 5 min after capsaicin stimulation were 1.9 ± 1.2 , 2.5 ± 1.1 , and 2.3 ± 0.5 for ERK1 and 2.0 ± 0.6 , 2.5 ± 0.7 , and 2.1 ± 0.4 for ERK2, respectively (Fig. 1B and C). Although the level of phosphorylation had begun to decrease by 5 min, it still showed higher levels at 5 min. In particular, ERK1 exhibited a significantly higher level of phosphorylation at 5 min compared to controls. Therefore, we observed the levels of phosphorylation over a longer period of time following capsaicin stimulation. The ratios of phosphorylated ERK/total ERK at 15, 30, and 60 min after capsaicin stimulation were 1.5 ± 0.5 , 1.4 ± 0.2 , and 1.4 ± 0.3 for ERK1 and 1.6 ± 0.5 , 1.3 ± 0.3 , and 1.3 ± 0.3 for ERK2, respectively. These ratios were gradually decreased, and close to the basal level by 60 min.

Both ERK1 and ERK2 displayed significantly higher levels of phosphorylation at 3 min after capsaicin stimulation compared to the vehicle-treated controls. We also observed the levels of phosphorylation over a longer period of time following capsaicin stimulation. The ratios of phosphorylated ERK/total ERK at 15, 30, and 60 min after capsaicin stimulation were 1.5 ± 0.5 , 1.4 ± 0.2 , and 1.4 ± 0.3 for ERK1 and 1.6 ± 0.5 , 1.3 ± 0.3 , and 1.3 ± 0.3 for ERK2, respectively.

3.2. Attenuation of capsaicin-induced ERK activation using a TRPV1 receptor antagonist and MEK inhibitors

We next determined whether TRPV1 receptor stimulation and MEK activation mediated the capsaicin-induced ERK phosphorylation. As shown in Fig. 2A, the phosphorylation of ERK at 3 min after capsaicin application was attenuated in animals preincubated with

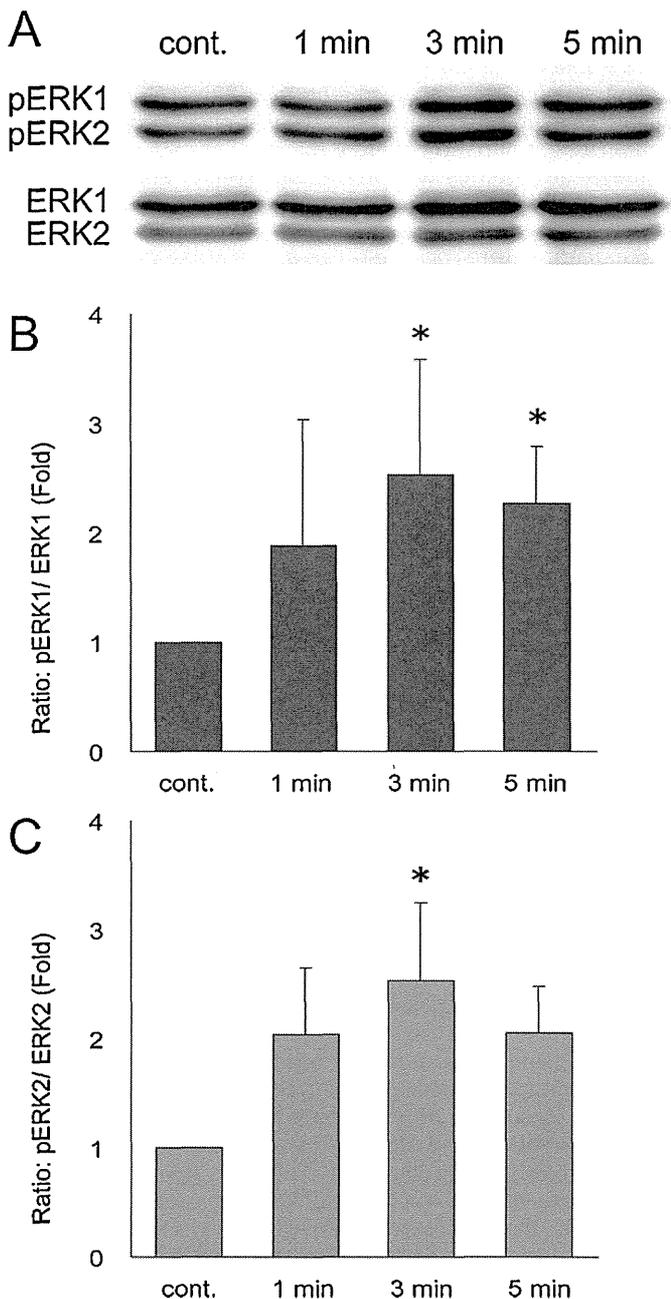


Fig. 1. Temporal profile of capsaicin-induced ERK phosphorylation in the trigeminal ganglion. Temporal profile of the phosphorylation of ERK1/2 in trigeminal ganglion neurons following the application of capsaicin to the dura mater. In vehicle-treated animals, the trigeminal ganglia were collected 3 min after vehicle stimulation of the dura mater; in capsaicin-treated animals, the specimens were collected at 1, 3, and 5 min. The time course for the phosphorylation of ERK1/2 was evaluated using Western blotting. A representative image is shown in (A), and the ratios of the intensities of pERK1 and pERK2 are shown in (B) and (C), respectively. A marked increase in the phosphorylation of ERK1/2 was observed 3 min after the application of capsaicin. The ratios of phosphorylated ERK1/2 to total ERK 1/2 were still higher levels at 5 min, and notably, ERK1 showed a significantly higher level of phosphorylation at 5 min compared to controls. (* $p < 0.05$; $n = 6$ in each group; error bars indicate SD).

capsazepine, a TRPV1 receptor antagonist (Fig. 2A, caz). In addition, the MEK inhibitors PD98059 and U0126 inhibited the phosphorylation of ERK at 3 min after capsaicin application (Fig. 2A, PD98059, U0126). The ratios of phosphorylated ERK/total ERK were 2.5 ± 1.1 (caps), 1.9 ± 0.4 (caz), 1.1 ± 0.4 (PD98059), and 0.6 ± 0.2 (U0126) for ERK1 and 2.5 ± 0.7 (caps), 1.3 ± 0.2 (caz), 1.2 ± 0.5 (PD98059), and 0.6 ± 0.2 (U0126) for ERK2 (Fig. 2B and C). The statistical

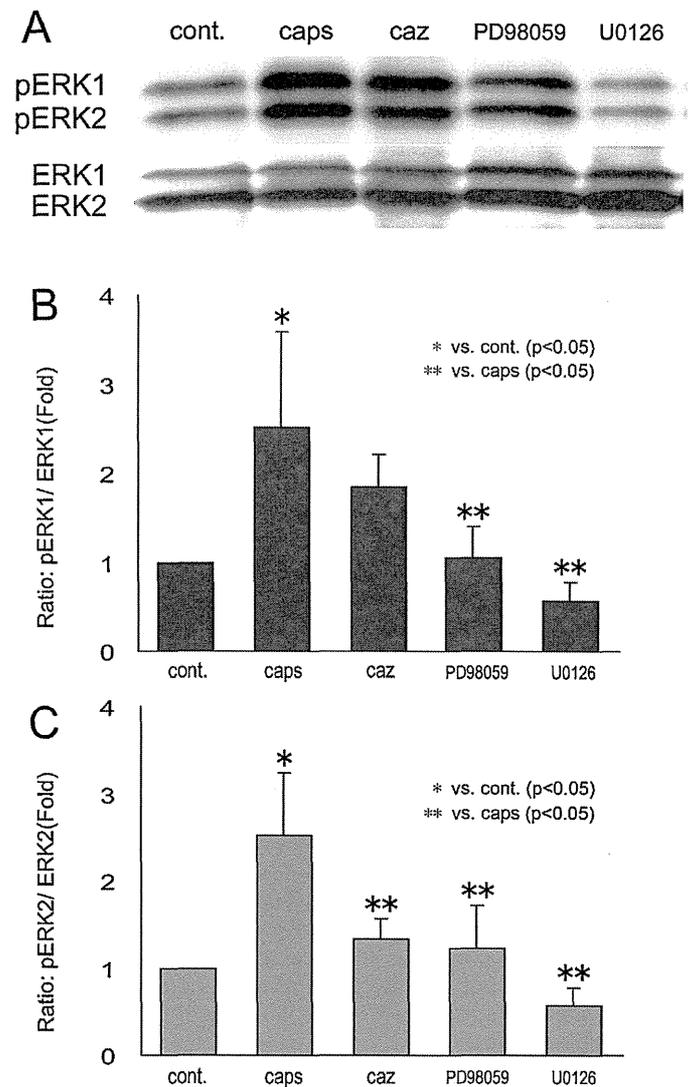


Fig. 2. Attenuation of capsaicin-induced ERK activation by a TRPV1 receptor antagonist and MEK inhibitors. Effects of TRPV1 receptor antagonist or MEK inhibitors on the phosphorylation of ERK1/2. Representative Western blot results are shown in (A), and the ratios of the intensities of pERK1/ERK1 and pERK2/ERK2 are shown in (B) and (C), respectively. For the control group (cont.), the vehicle was applied to the dura mater for 3 min. The designation "caps" indicates those animals in which capsaicin was applied to the dura mater for 3 min without preincubation with the TRPV1 receptor antagonist or MEK inhibitors. Significant increases in the ratios of the intensities of pERK1 and pERK2 were observed in the capsaicin-treated animals (caps) compared to those of the control group (cont). Conversely, the animal groups preincubated for 30 min with the TRPV1 receptor antagonist (caz) or MEK inhibitors (PD98059, U0126) exhibited decreased pERK1 and pERK2 ratios after the application of capsaicin to the dura mater compared to those of capsaicin-only-treated animals (caps). The phosphorylation of ERK1/2 was inhibited in animals preincubated with the TRPV1 receptor antagonist capsazepine; however, only ERK2 showed a significant difference between capsaicin-treated animals and animal groups preincubated with capsazepine (caz). Both MEK inhibitors, PD98059 and U0126, produced a significant decrease in the phosphorylation of ERK1/2 (* vs. control, $p < 0.05$; ** vs. capsaicin applied animals, $p < 0.05$; $n = 4$ in each group; error bars indicate SD).

analysis showed a significant decrease in ERK2 phosphorylation with capsazepine and the phosphorylation of both ERK1 and ERK2 with PD98059 or U0126 compared to the results obtained in the capsaicin-only-treated animals.

3.3. Immunohistochemical analysis of pERK in the trigeminal ganglion after dural nociceptive stimulation

We also performed an immunohistochemical analysis of phosphorylated ERK (pERK) using rat trigeminal ganglion slices. As