

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 10 月 25 日現在

機関番号：37409

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26860390

研究課題名(和文) In vivo及びIn vitro記録法を用いたボツリヌス毒素の鎮痛作用機序の解明

研究課題名(英文) Antinociceptive effects of BOTOX and A2NTX on CFA-induced hyperalgesia in rat

研究代表者

申 敏哲 (Shin, Min-Chul)

熊本保健科学大学・保健科学部・准教授

研究者番号：70596452

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：A型ボツリヌス毒素の鎮痛作用機序を検討した。BOTOXとA2NTXは1U/site以上で運動能力に影響した。CFA炎症ラットではBOTOX、A2NTXは痛み刺激に対して同様の鎮痛効果を示したが、炎症性の浮腫には無効であった。しかし、その鎮痛作用は抗毒素により抑制された。また、中枢作用の検討ではCFA注入群で増加したc-Fos発現がボツリヌス毒素によって抑制された。しかし、TNF- $\alpha$ の発現では影響与えなかった。A型ボツリヌス毒素注入群でAd、C線維の伝導速度が有意にCFA群より遅かった。これらの結果から、A型ボツリヌス毒素は中枢神経に作用し、抗炎症作用はなく抗侵害作用のみを持つことが示された。

研究成果の概要(英文)：We performed a study on the antinociceptive effects of BOTOX and A2NTX on CFA-induced chronic pain model rat. A2NTX shortened the treadmill running time and rotarod treadmill time in a concentration-dependent fashion, and such inhibitory effects were stronger than that of BOTOX. Also, both BOTOX and A2NTX had antinociceptive effects in the CFA-induced inflammatory pain model, reducing the mechanical hyperalgesia. These antinociceptive effects disappeared by the injection of Anti-toxin. Administration of BOTOX and A2NTX reduced the increase on c-Fos immunoreactivity, but had no any effect on TNF- $\alpha$  immunoreactivity in L4-L5 spinal segments induced by CFA. BOTOX and A2NTX also decreased the conduction velocity of A and C fibers in dorsal root ganglion neurons, suggesting that BOTOX and A2NTX inhibit the activation of spinal nociceptive afferent fibers that project to the CNS. Our results indicate that BOTOX and A2NTX may offer a new therapeutic tool to treat inflammatory pain.

研究分野：神経生理

キーワード：ボツリヌス毒素 A2NTX BOTOX 鎮痛効果

## 1. 研究開始当初の背景

ボツリヌス毒素は現存する最も強力な毒素で、生物化学兵器として使用される可能性を秘めている。一方、極微量では筋収縮異常による脳性麻痺、脳出血、梗塞後の筋の痙縮や関節の拘縮、また、多くの不随運動の治療およびリハビリに広く用いられている。ボツリヌス毒素の作用機序として神経筋接合部で神経終末に作用し、アセチルコリンの放出を抑制することで筋収縮を阻害し、筋の攣縮および緊張を改善することが知られている。さらに、その伝達物質放出抑制の分子機構として、放出に関わる SNARE タンパク complex 合成阻害作用やシナプス小胞の膜への融合阻害作用が知られている<sup>5)</sup>。しかし、最近多くの臨床報告によると、運動神経系に対する作用のみでなく感覚神経系に対する作用、特に慢性疼痛の鎮痛作用を有することが示唆され、慢性疼痛の治療薬としての役割が注目を集めている<sup>13)</sup>。しかしながら、その鎮痛作用が末梢神経系に対するものか、また、中枢神経系である脊髄レベルにおいての作用であるかは未だ明らかではない。

## 2. 研究の目的

末期癌性疼痛や神経損傷後に発生する神経因性疼痛などの難治性疼痛はモルヒネにも抵抗性であることが多く、その治療薬の開発が国内外で進められている中で、最近、慢性疼痛に対するボツリヌス毒素の鎮痛効果の臨床報告が急増している。その作用機序として、毒素は感覚神経終末に取り込まれ、脊髄レベルにおいて痛覚伝達をブロックすることにより鎮痛作用を発現する可能性が示唆されている。本研究では A 型ボツリヌス毒素(A1 型 = BOTOX、A2 型 = A2NTX)の作用部位と鎮痛作用機序を行動学的手法、電気生理学的手法と免疫組織化学的手法を用いて明らかにすることで、疼痛治療薬としての臨床応用への生理・薬理学的基盤を構築することを目的とした。

## 3. 研究の方法

### 3-1. 実験動物

雄の SD rat (180~200 g)を用いた。動物の飼育および実験に関しては熊本保健科学大学動物実験指針を遵守した(動 14-018)。

### 3-2. 行動薬理試験

#### 3-2-1. トレッドミルランニングとローターロード試験

トレッドミルランニングはラット専用トレッドミル装置を用い、速度は 18m/min の速度から開始し、速度を 2 分間ごと上昇させ、40m/min 時点からは、その速さで限界(走らなくなった場合、ラットを手で 3 回押しでも走れなくなった時点)までの走行時間を測定した。ローターロード試験はローターロード装置(MK-670、室町)を用いて、毒素を注入す

る前に、10 rpm の速度で回転するローラー上を走らせ、200 秒以上走行可能になるまで訓練を繰り返した。試験試行ではラットが 0~30rpm まで回転しているローラーから落下するまでの時間を最大 300 秒で測定した。

### 3-3. 足跡を用いた SFI 測定

運動機能評価を Sciatic Functional Index (SFI)を用いて評価した。A 型ボツリヌス毒素の注入後から 28 日目まで足跡プリントを測定した。神経・筋麻痺程度は SFI 公式に代入することで検討した。SFI の計算は  $SFI = -38.3 \times (EPL - NPL) / NPL + 109.5 \times (ETS - NTS) / NTS + 13.3 \times (EITS - NITS) / NITS - 8.8$  の式で行なった。

### 3-4. A 型ボツリヌス毒素の注入プロトコール

先行研究より BOTOX、A2NTX は注入後 3 日以降にその効力はほぼ最大になることが知られている。本研究では、CFA(5mg/ml)投与の 3 日前にラットをイソフルランで吸入麻酔し、右後脚足底に BOTOX と A2NTX、生理食塩水を足底に 50  $\mu$ l 注入した。

### 3-5. 炎症の誘発

炎症の誘発には毒素注入 3 日後、吸入麻酔下にラット右後脚足底に CFA(5mg/ml)を 100  $\mu$ l 注入した。

### 3-6. 痛み刺激閾値と足部容積の測定

痛み刺激に対する痛覚測定は UGO BASILE 社製の von Frey 式痛覚測定装置を使用し、反応する刺激強度を測定した。測定は 5 分以上間隔を開けて合計 3 回施行した。また、浮腫の測定のため足部容積を計測した。シリンジをチューブで繋いだ簡易の容積測定装置を作成した。測定に当たっては、足関節背屈 0 度位にて足底より 1cm の高さにペンで印を入れ、印の高さまで足をシリンジに垂直に入れることで生じる水位の差を合計 3 回計測した。

### 3-7. 細胞内記録

CFA 注入 7 日後にウレタン麻酔下で後根神経節に末梢神経を付した標本を作製し、神経節細胞から細胞内記録を行い、静止膜電位や活動電位の伝導速度を比較検討した。

### 3-8. 免疫学的手法

最終日の計測後、Pentobarbital を用いてラットを麻酔後、全身血を PBS と交換し、4% PFA で固定して脊椎標本を作製した。脊椎標本はパラフィン包埋法を用いて、切片を作製し、免疫染色法を用いて、c-Fos、Tumor Necrosis Factor (TNF) - の発現量を測定した。

### 3-9. 統計処理

トレッドミルランニング試験、ローターロード試験、SFI 評価、浮腫試験、痛み刺激閾

値試験のデータは平均±標準偏差(S.D.)で算出した。また、c-Fos、TNF- の発現量、静止膜電位や活動電位の伝導速度については平均±標準誤差(S.E.)をそれぞれ算出した。群間差は一元配置分散分析をし、事後検定としてTukey検定を用いた多重比較を行った。なお有意水準は5% (p<0.05) とした。

#### 4. 研究成果

##### 4-1. トレッドミルランニングへの A2NTX と BOTOX の効果

トレッドミルランニングでは、投与した BOTOX, A2NTX の濃度に依存して注入後一日目より走行時間は減少し、3 日目には各群間に使用濃度差に応じて有意な走行時間の減少が見られた。しかし、1U 以下の BOTOX, A2NTX では正常群の走行時間との間に有意差は認められなかった(図 1A,B)。また、臨床でよく使われている 3U の場合、A2NTX が BOTOX に比べて効果が強いことが示唆された。

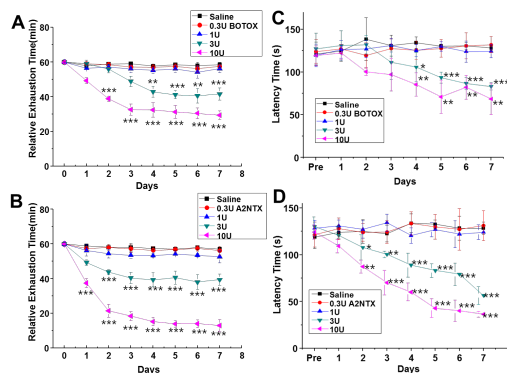


図 1. A 型ボツリヌス毒素がトレッドミル走行時間と運動能力に及ぼす効果

A. トレッドミル走行時間に対する BOTOX の効果(n=8~9)。B. トレッドミル走行時間に対する A2NTX の効果(n=8~9)。C. ローターロッド試験を用いた BOTOX の運動能力に及ぼす影響。D. ローターロッド試験を用いた A2NTX の運動能力に及ぼす影響(n=7~8)。Mean ± SD. \* p<0.05 ; \*\* p<0.01 ; \*\*\* p<0.001

##### 4-2 .A 型ボツリヌス毒素による運動能力に及ぼす影響

A 型ボツリヌス毒素による運動能力への影響を検討した。A 型ボツリヌス毒素の注入は濃度依存的に運動能力を低下させた。BOTOX, A2NTX とともに 3U と 10U ではローラーから落下するまでの時間が有意に短縮されたが、0.3U と 1U では有意に短縮は見られなかった。このことより A 型ボツリヌス毒素の 1U~3U 間に運動神経を抑制し、筋収縮力を抑制する濃度があることが示唆された(図 1C,D)。また、3U と 10U の濃度では A2NTX が BOTOX に比べ効力が強いことと早いことが示唆された。

##### 4-3 .A 型ボツリヌス毒素による神経麻痺や筋麻痺に対する抗毒素の作用

A 型ボツリヌス毒素又は抗毒素の注入後か

ら 4 週間まで足跡を測定し、神経及び筋の麻痺による歩行の変化を測定した。A2NTX は BOTOX より速い強力な筋弛緩作用を誘発した。その作用は 28 日後でもあまり変わらなかったが、抗毒素注入群では濃度依存的に筋弛緩を改善させた(図 2)。

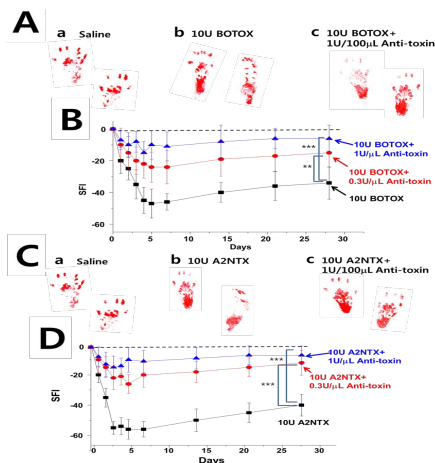


図 2. BOTOX と A2NTX の作用に対する抗毒素の効果

(A、B) BOTOX 又は BOTOX+抗毒素の注入 4 週間後のラットの足跡と SF1 値(n=6~8)。 (C、D) A2NTX 又は A2NTX+抗毒素の注入 4 週間後のラットの足跡と SF1 値(n=6~8)。 Mean ± SD. \*\* p<0.01 ; \*\*\* p<0.001

##### 4-4 .CFA を用いた慢性炎症モデルラットにおける A 型毒素の効果

痛み刺激に対する A 型毒素の効果を検討した。CFA 群では CFA 注入後、経時的に閾値が低下したが、CFA+BOTOX 注入群では濃度依存的に注入側の閾値上昇が確認された。CFA+A2NTX 注入群でも、CFA 群と比べ 0.3U, 1U 群で有意な閾値の上昇が認められた。また、A2NTX は BOTOX に比べて同濃度で高い

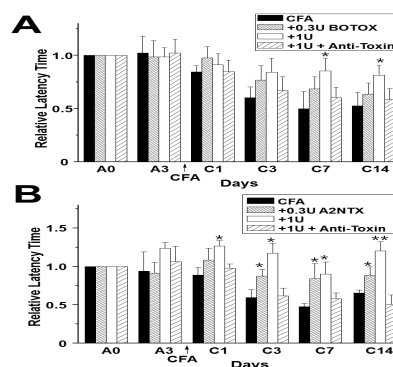


図 3. CFA 誘発痛覚過敏に対する A 型毒素の効果

A. BOTOX 又は BOTOX+抗毒素の効果。 B. A2NTX 又は A2NTX+抗毒素の効果 (n=7~8)。 A0, A 型ボツリヌス毒素注入前; A3, A 型ボツリヌス毒素注入後 3 日目; C1, CFA 注入 1 日目(A 型ボツリヌス毒素注入後 4 日目); C3, CFA 注入 3 日目; C7, CFA 注入 7 日目; C14, CFA 注入 14 日目。 Mean ± SD. \* p<0.05; \*\* p<0.01

鎮痛効果が認められた(図3)。しかし、BOTOXとA2NTXの鎮痛効果は抗毒素(1U/μL)の投与により抑制された。さらに、A型毒素の注入反対側での影響も検討したが、BOTOX、A2NTXともに影響を与えなかった。

#### 4-5. 炎症性の浮腫に対する BOTOX と A2NTX の効果

末梢の炎症によるA型ボツリヌス毒素の作用を検討するため足部容積の増加率から浮腫を測定した。CFA群では、注入後1日から注入部の浮腫が見られ、14日後でも注入部の浮腫が確認された。また、BOTOX、A2NTX、BOTOX+抗毒素、A2NTX+抗毒素注入群共にCFA注入後から足部容積の増加が見られ、注入14日後でも浮腫が残存し、CFA群と有意差は認められなかった(図4)。

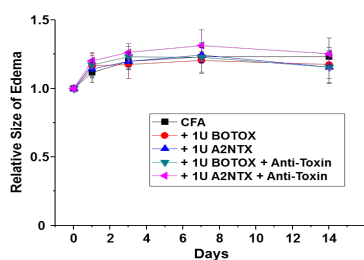


図4. 末梢の炎症による浮腫でのA型毒素の効果  
Mean ± SD.

#### 4-6 CFA誘発痛覚過敏によるc-Fos発現へのA型毒素の効果

CFAの注入による痛み刺激に対するA型ボツリヌス毒素の鎮痛効果が中枢の感覚神経に対する作用であるかを確認するために、脊椎標本を用いて神経活動のマーカであるc-Fosの発現を検討した。CFA注入群で増加したc-Fos発現はBOTOXとA2NTX注入によって抑制された。しかし、その抑制は抗毒素の注入により発現が上昇した(図5)。

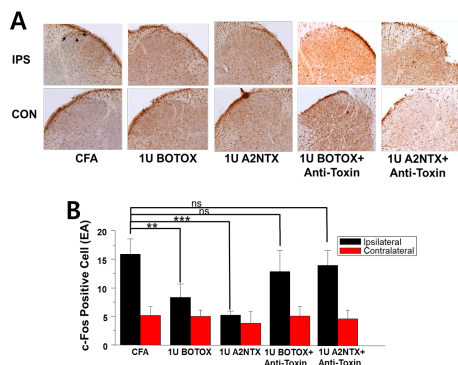


図5. A型ボツリヌス毒素がc-Fos発現に及ぼす影響

A. 注入14日後の脊椎標本。矢印は、c-Fos陽性細胞を示す(n=12~15)。IPS, Ipsilateral; CON, Contralateral。B. c-Fos陽性細胞数。Mean ± SE. \*\* p<0.01; \*\*\* p<0.001; ns, no significance.

#### 4-7 CFA誘発痛覚過敏によるTNF-α発現への

#### のA型ボツリヌス毒素の効果

CFA誘発痛覚過敏に対するTNF-α発現へのA型毒素の効果を検討した。TNF-αは炎症性疼痛ラットの腰髄後角で増加する炎症のマーカである。TNF-αの発現では、1UのBOTOXとA2NTX注入群共にCFA注入群と比べ有意差は認められなかった(図6)。

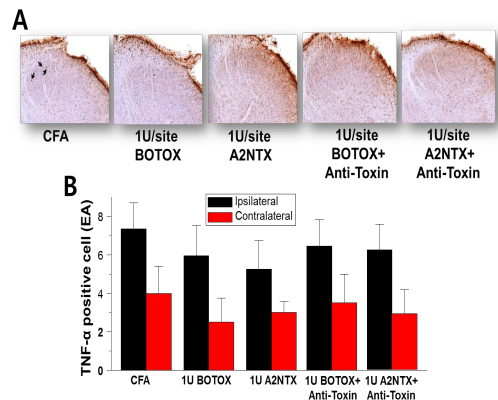


図6. CFA誘発痛覚過敏によるTNF-α発現へのA型ボツリヌス毒素の効果

A. CFA, BOTOX, A2NTX, BOTOX+抗毒素, A2NTX+抗毒素注入14日後の脊椎標本。矢印は、TNF-α陽性細胞を示す(n=11~15)。B. TNF-α陽性細胞数。Mean ± SE.

#### 4-8 後根神経節細胞の静止膜電位と活動電位に対するA型ボツリヌス毒素の影響

CFA群の後根神経節細胞から静止膜電位およびそれぞれの神経線維の伝導速度を調べた。Aβ線維の静止膜電位は $-65 \pm 2.7$  mVでその伝導速度は $26.6 \pm 2.8$  m/sであった。Aδ線維は静止膜電位が $-70 \pm 1.9$  mVで伝導速度は $15.3 \pm 1.7$  m/sであった。また、C線維の静止膜電位および伝導速度は $-67 \pm 1.5$  mV,  $1.9 \pm 0.9$  m/sであった。BOTOX注入群の静止膜電位には若干の差が見られるものの有意ではなかった(Aβ,  $-68 \pm 2.1$  mV; Aδ,  $-72 \pm 1.9$  mV; C,  $-70 \pm 2.1$  mV)。Aβ線維の伝導速度は $24.1 \pm 2.8$  m/sで有意な変化は認められなかったが、Aδ、C線維の伝導速度では $9.2 \pm 1.3$  m/sと $1.1 \pm 0.3$  m/sで有意にCFA群より遅かった。A2NTX注入群でも静止膜電位には若干の差が見られたが有意ではなかった(Aβ,  $-67 \pm 1.9$  mV; Aδ,  $-72 \pm 2.3$  mV; C,  $-69 \pm 1.8$  mV)。Aβ線維の伝導速度は $23 \pm 2.6$  m/sで有意な変化は認められなかったが、Aδ、C線維の伝導速度では $11.2 \pm 0.8$  m/sと $0.9 \pm 0.4$  m/sで有意にCFA群より遅かった。

#### 5. 考察

最近の臨床報告によると、ボツリヌス毒素が運動神経系に対する作用のみでなく感覚神経系に対する作用、特に慢性疼痛の鎮痛作用を有することが報告され、慢性疼痛の鎮痛薬としての役割が注目されている。しかし、その鎮痛作用が末梢神経系に対するものか、中枢神経系に対する作用であるかは未だ明らかではない。作用機序を明確にするために、



本研究では行動学的手法、免疫組織化学的手法及び電気生理学手法を用いて慢性疼痛に対するA型ボツリヌス毒素の鎮痛作用を検討した。

先ず、ラット右後脚足底に異なる用量のBOTOXとA2NTXを注入し、毒素が十分に拡散して効力を発現する注射後7日間に渡り、in vivo条件下でのボツリヌス毒素の濃度依存的、時間依存的生体内輸送もしくは拡散効果と運動能力に対する効果をトレッドミルランニングとローターロッド試験で検討した。A型ボツリヌス毒素は、ラットのトレッドミル走行時間とローラーから落下する時間を濃度依存的、時間依存的に短縮させた。ボツリヌス毒素は、運動神経終末から取り込まれ、AChの放出を阻害して、骨格筋への化学的伝達を遮断させる<sup>14)</sup>。今回のトレッドミル走行時間及びローターロッド走行時間に及ぼす結果から、BOTOXとA2NTXは1U以上でAChの開口放出をブロックして運動能力に影響を及ぼすことが明らかになった。また、臨床濃度である3Uの濃度では、A2NTXがBOTOXに比べ効力が強いことが示唆された。Toriiらは横隔神経-横隔膜標本を用いたin vitro試験にて、A2NTXがA1型ボツリヌス毒素より神経筋伝達に関する抑制効果が3.73倍強力だったと報告している<sup>12)</sup>。また、Pierらは神経細胞モデルを使用した薬理学的研究で、A1型よりもA2型ボツリヌス毒素の方が神経細胞に速く作用したと述べている<sup>9)</sup>。

本実験の結果CFA炎症モデルラットの痛み刺激に対して、BOTOX、A2NTX投与群ともに濃度依存的に閾値の低下を惹起した。特にA2NTX群ではラットの運動能力に影響しない濃度1U/siteで閾値の有意な低下を認めたと、炎症性浮腫に対してはBOTOX、A2NTXともに無効であった。BOTOXとA2NTXの鎮痛作用は抗毒素(1U/ $\mu$ l)の投与によって抑制された。Cuiら(2004)は、ホルマリンで誘導された炎症性の痛みモデルにA1型ボツリヌス毒素を皮下注射して、最初に鎮痛作用を証明した<sup>3)</sup>。炎症性の痛みモデルでA1型ボツリヌス毒素はホルマリンに誘導されたグルタミン酸の放出を抑制し、脊髄の後角細胞でFOS発現を抑制させて広い範囲で脊髄の後角細胞の興奮を抑制させたことが報告されている<sup>3)</sup>。最近、Shinら(2013)はcarrageenanを用いた急性炎症モデルラットに対し、A1型ボツリヌス毒素およびA2NTXとインドメタシンが痛み刺激に対して同様の鎮痛効果を示したが、炎症性の浮腫に対してはインドメタシンのみが有効だったと報告している<sup>10)</sup>。本実験の結果でもA型ボツリヌス毒素はCFAによる炎症性の浮腫に影響与えなかった。また、炎症性マーカーであるTNF- $\alpha$ の発現を検討した結果でもCFA群と有意な差は認められなかった。Carrageenanやformalinを用いて炎症を誘発させた実験動物の報告から<sup>4,7)</sup>、炎症性疼痛に対するボツリヌス毒素製剤の有効性が示されている。Mahowaldら(2010)によると、CFA

を注射し、慢性疼痛を引き起こした運動選手の間節にA型ボツリヌス毒素を投与した結果、鎮痛作用が見られたと報告している<sup>8)</sup>。これらの結果から、A型ボツリヌス毒素は急性疼痛だけでなく、慢性疼痛にも鎮痛作用があることが示唆された。また、その作用機序は、NSAIDsとは異なることが示唆された。

A型ボツリヌス毒素の直接的な中枢神経系への投与<sup>1)</sup>または末梢に投与<sup>2)</sup>したいくつかの動物実験では、毒素の中枢神経系への直接の作用を報告している。また、最近の臨床試験の一部もA型ボツリヌス毒素が直接中枢神経系に作用することを報告している<sup>5)</sup>。本実験でもA型ボツリヌス毒素の鎮痛作用が中枢に対する作用か、または末梢の作用かの確認のために脊髄の標本を用いて、神経活動のマーカーであるc-Fosの発現を確認した結果、CFA注入群で増加したc-Fos発現はBOTOXとA2NTX注入によって抑制された。これらの結果はラットの足の裏に投与したA型ボツリヌス毒素が神経に取り込まれ、CFAに誘導されたグルタミン酸の放出を抑制させた結果、脊髄の後角細胞のc-Fos発現が抑制されたと考えられる。中枢神経系でのグルタミン酸の放出抑制は炎症性痛みによる中枢神経系の活性化抑制を介して鎮痛作用を示したと考えられる。

痛みの伝導路は、侵害受容器が痛み刺激を受けた後、物理的な刺激を活動電位に交換し、脊髄後根神経節を介して脊髄後角まで伝わる。その後、その信号は視床を介して大脳皮質まで伝導される。痛みを伝える末梢神経にはA繊維とC繊維の2つの神経繊維が知られている。痛みの伝導においてA $\delta$ 繊維の方がC繊維よりも伝導速度が速い。本実験では痛みの伝導するA $\delta$ 繊維とC繊維に対するA型ボツリヌス毒素の作用を静止膜電位や活動電位の伝導速度で調べた。その結果、CFA群と比べA型ボツリヌス毒素群のA $\delta$ 、C線維の伝導速度がCFA群より有意に遅かった。痛み情報の伝達には、Nav1.6、Nav1.7、Nav1.8が関与している。炎症によりNGFの産生が増加され、後根神経節のTTX抵抗性(TTXr)NaチャンネルmRNAが増加し、Nav1.9が増加する。また、炎症によって局所に遊離されるプロスタグランジン、アデノシン、セロトニンは、TTXrNa+チャンネルをリン酸化して、このチャンネルを流れるNa+電流を増加させる。それに伴って活動電位を発生させる脱分極の閾値の低下、Na+チャンネルの活性化と不活性化の速度上昇が起こる。炎症によって産生されたNGFに誘導されて、TTXrNa+チャンネルの割合が高くなる。そのため、侵害刺激による脱分極が続いたとき、活動電位の列をより長く発生できるようになる。モルヒネ様作用をもつ $\mu$ オピオイドはTTXrNa電流の増加に拮抗することが報告されている。また、Shinら(2012)はA型ボツリヌス毒素がTTX感受性(TTXs)Na+チャンネルとTTXrNa+チャンネルの活性化を抑制したと報告している<sup>11)</sup>。これらの

報告から、本実験でのCFAの注入は炎症の誘導による脊髄後根神経節細胞のTTXrNa<sup>+</sup>チャンネル発現を促進させ、活動電位を発生させる脱分極の閾値の低下、Na<sup>+</sup>チャンネルの活性化と不活性化の速度上昇が起こしたが、A型ボツリヌス毒素の注入により脊髄後根神経節細胞のTTXrNa<sup>+</sup>チャンネル発現や発現するNa<sup>+</sup>チャンネルの種類が変化させられた結果、または神経の末端から取り込まれた毒素がグルタミン酸の放出を抑制させ、神経興奮性の抑制した結果、なんらかの原因によって伝導速度が変化した可能性が考えられる。

今回の実験で、BOTOXとA2NTXは痛み刺激に対しては同様の鎮痛効果を示したが、炎症性の浮腫に対しては無効であった。このことから、A型ボツリヌス毒素は抗炎症作用はなく、抗侵害作用のみを有しておりA2NTXはBOTOXと比較して高い鎮痛効果を発揮することが示された。

近年ボツリヌス毒素の鎮痛効果が痛み動物モデル実験やヒトの臨床治療で報告されている。ボツリヌス毒素剤は一度の注射で約3-6ヶ月位の長期的効果があり、神経末端部位に作用し、既存の痛み止めに比べて副作用が少なく安全性が高いことが報告されている。このようにボツリヌス毒素はNeuropathic painの治療にも有効と考えられている。また最近、ボツリヌス毒素は慢性疼痛の緩和にも効果的なことが明らかになってきた。現在明らかな治療法がない癌性疼痛等のモルヒネが無効の痛みに対して、ボツリヌス毒素を使用することが考えられている。

#### <引用文献>

1. Akaike N, Shin MC, Wakita M et al. Transsynaptic inhibition of spinal transmission by A2 botulinum toxin. *J Physiol.* 591(4), 2013, 1031-1043.
2. Caleo M & Schiavo G. Central effects of tetanus and botulinum neurotoxins. *Toxicon*, 54, 2009, 593-599.
3. Cui M, Khanijou S, Rubino J et al. Subcutaneous administration of botulinum toxin A reduces formalin-induced pain. *Pain*, 107, 2004, 125-133.
4. Favre-Guilmond C., Michel A., Pierre-Etienne C. Different antinociceptive effects of botulinum toxin type A in inflammatory and peripheral polyneuropathic rat models. *Eur. J. Pharmacol.*, 617, 2009, 48-53.
5. Filipovic B, Matak I, Bach-Rojecky L, Lackovic Z. Central action of peripherally applied botulinum toxin type A on pain and dural protein extravasation in rat model of trigeminal neuropathy. *PLoS One.* 7, 2012, e29803.
6. Fischer A, Montal M. Crucial role of the disulfide bridge between botulinum neurotoxin light and heavy chains in protease translocation across membranes. *J Biol Chem.*, 282(40), 2007, 29604-20611.
7. Lidija BR, Dominis M, Lackovic Z. Lack of anti-inflammatory effect of botulinum toxin type A in experimental models of inflammation. *Funda Clin. Pharmacol.* 22, 2008, 503-509.
8. Mahowald ML, Krug HE, Singh JA, Dykstra D. Intra-articular botulinum toxin type A: A new approach to treat arthritis joint pain. *Toxicon* 54(5), 2009, 658-667.
9. Pier CL, Chen C, Tepp W et al. Botulinum neurotoxin subtype A2 enters neuronal cells faster than subtype A1. *FEBS Lett.* 585(1), 2011, 199-206.
10. Shin MC, Yukihiro T, Ito Y, Akaike N. Antinociceptive effects of A1 and A2 type botulinum toxins on carrageenan-induced hyperalgesia in rat. *Toxicon*, 64(15), 2013, 12-19.
11. Shin MC, Wakita M, Xie DJ et al. Inhibition of membrane Na<sup>+</sup> channels by A type botulinum toxin at femtomolar concentrations in central and peripheral neurons. *J Pharmacol Sci.* 118(1), 2012, 33-42.
12. Torii Y, Kiyota N, Sugimoto N, et al. Comparison of effects of botulinum toxin subtype A1 and A2 using twitch tension assay and rat grip strength test. *Toxicon* 57(1), 2011, 93-99.
13. Wheeler AH. Botulinum toxin injection technique for treatment of headaches. *Aesthet Surg J.*, 22(1), 2002, 65-68.
14. Yaraskavitch M, Leonard T, Herzog W, Botox produces functional weakness in non-injected muscles adjacent to the target muscle. *J. Biomech.* 41(4), 2008, 897-902.

#### 5. 主な発表論文等

[学会発表](計 1 件)

2016 NeuroLab Symposium on Mechanisms of Cellular Signal Transduction. Kyung Hee University. 29th -30th March 2016

#### 6. 研究組織

(1)研究代表者

申 敏哲 (SHIN Min-Chul)

熊本保健科学大学・保健科学部・准教授

研究者番号：70596452