

動物の自発行動を指標とする
新規非臨床疼痛評価系の構築に関する研究

2015 年

石川 剛

目次

略語表	5
緒言	7
第 1 章 ラット神経障害性疼痛モデルにおける自発痛自動測定系の構築	12
1. 序論	12
2. 実験材料および実験方法	12
2-1. 使用動物	12
2-2. 使用化合物	13
2-3. CCI モデル	13
2-4. MicroAct による術肢動作の自動測定	13
2-5. 目視による術肢動作の測定	14
2-6. Von Frey hair による機械刺激誘発痛評価	14
2-7. Acetone 噴霧による冷刺激誘発痛評価	15
2-8. 自動測定による術肢動作の経時解析	15
2-9. 薬効評価	15
2-10. 統計学的処理	15
3. 実験結果	16
3-1. CCI および sham ラット術肢動作の観察	16
3-2. 自動測定による経時的变化	18
3-3. 自動測定による自発痛関連行動と、侵害刺激に対する回避行動との相関	19
3-4. 自発痛関連行動に対する薬効評価	20
4. 考察	22
第 2 章 変形性関節症モデルにおける動作時痛関連行動の検出と鎮痛薬感受性に関する検討	25
1. 序論	25
2. 実験材料および実験方法	27
2-1. 使用動物	27
2-2. 使用化合物	27

2-3. 膝関節 OA モデルの作成	27
2-4. 体重負荷による左右後肢荷重差測定法	27
2-5. 歩様測定法	28
2-6. 被験薬の薬効評価	28
2-7. 統計学的処理	28
3. 実験結果	30
3-1. MIA 膝関節内投与の歩様に対する効果	30
3-2. 歩様測定法における morphine の鎮痛作用に対する MIA 用量の影響	31
3-3. 左右後肢荷重差および歩様変化に対する各被験薬の鎮痛効果	33
3-4. 歩様異常に対する局所麻酔薬の薬効	38
4. 考察	39
第 3 章 変形性関節症モデルにおける動作時痛関連行動に対する抗 β -NGF 抗体の薬理作用の検討	42
1. 序論	42
2. 実験材料および実験方法	44
2-1. 使用動物	44
2-2. 使用化合物	44
2-3. ラット β -NGF に対する抗体結合確認試験	44
2-4. TrkA 受容体発現細胞を用いた β -NGF 誘発細胞内 Ca 流入に対する阻害作用確認試験	44
2-5. 血漿中 AS2886401-00 濃度の測定	45
2-6. 膝関節 OA モデルの作成	45
2-7. 歩様測定法	45
2-8. 関節痛に対する AS2886401-00 の鎮痛効果の経時的変化	46
2-9. AS2886401-00 の鎮痛効果に対する投与タイミングの影響	46
2-10. 膝関節浮腫の測定	46
2-11. 膝関節損傷度の評価	46
2-12. 統計学的処理	47
3. 実験結果	48
3-1. ラット β -NGF 機能に対する AS2886401-00 の影響	48
3-2. AS2886401-00 の体内動態解析	50
3-3. AS2886401-00 の鎮痛作用の経時的変化	50

3-4. AS2886401-00 の鎮痛作用に対する投与時期の影響.....	52
3-5. AS2886401-00 の膝関節腫脹および損傷に対する影響.....	54
4. 考察.....	55
総括.....	57
引用文献.....	60
論文目録.....	69
謝辞.....	70

略語表

Amy: Amygdala (扁桃体)

ANOVA: analysis of variance (分散分析)

ASIC3: acid-sensing ion channel subtype 3 (酸感受性イオンチャネルサブタイプ 3)

BDNF: brain-derived neurotrophic factor (脳由来神経栄養因子)

BR2: bradykinin receptor 2 (ブラジキニン受容体サブタイプ 2)

CCI: chronic constriction injury (坐骨神経絞扼損傷)

cDNA: complement deoxyribonucleic acid (相補的デオキシリボ核酸)

CGRP: calcitonin gene related peptide (カルシトニン関連遺伝子ペプチド)

CHO: Chinese hamster ovary (チャイニーズハムスター卵巣細胞)

COX: cyclooxygenase (シクロオキシゲナーゼ)

DRG: dorsal root ganglion (脊髄後根神経節)

DMEM: Dulbecco's modified Eagle medium (ダルベッコ改変イーグル培地)

ED₅₀: dose causing 50% effect (50%有効量)

ELISA: enzyme-linked immunosorbent assay (酵素免疫測定法)

FBS: fetal bovine serum (ウシ胎仔血清)

FLIPR: fluorometric imaging plate reader (蛍光イメージングプレートリーダー)

FM: fibromyalgia (線維筋痛症)

GPCR: G-protein coupled receptor (G タンパク質共役型受容体)

HEK: human embryonic kidney (ヒト胎児由来腎臓細胞)

HP: hypothalamo-pituitary adrenal axis (視床下部)

HRP: horse-radish peroxidase (西洋ワサビペルオキシダーゼ)

5HT: 5-hydroxytryptamine (5-ヒドロキシトリプタミン [セロトニン])

IgG: immunoglobulin G (免疫グロブリン G)

MIA: monoiodoacetate (モノヨード酢酸)

NAc: nucleus accumbens (側坐核)

NGF: nerve growth factor (神経成長因子)

NSAID: non-steroidal anti-inflammatory drug (非ステロイド性抗炎症薬)

OA: osteoarthritis (変形性関節症)

PAG: periaqueductal grey (中脳中心灰白質)

PBS: phosphate-buffered saline (リン酸緩衝生理食塩水)

PDN: peripheral diabetic neuropathy (糖尿病性神経障害)

PHN: post-herpetic neuropathy (帯状疱疹後神経痛)

PG: prostaglandin (プロスタグランジン)

POP: post-operative pain (術後痛)

QoL: quality of life (生活の質)

QST: quantitative sensory testing (定量的感覚検査)

RA: rheumatoid arthritis (関節リウマチ)

RVM: rostral ventromedial medulla (吻側延髄腹内側部)

SAS: statistical analysis system (統計的分析システム)
S.D.: standard deviation (標準偏差)
S.E.M.: standard error of the mean (標本平均の標準誤差)
SNRI : serotonin/norepinephrine reuptake inhibitor (セロトニン／ノルエピネフリン再取り込み阻害剤)
SP: substance P (P 物質)
TBST: Tris-buffered saline with Tween 20 (Tween 20 含有 Tris 緩衝生理食塩水)
TrkA: tropomyosin receptor kinase A (トロポミオシン受容体キナーゼ A)
TRPV1: transient receptor potential cation channel subfamily V member 1 (一過性受容器電位チャネルサブタイプ V1)
VAS: visual analogue scale (視覚的評価スケール)
NRS: numerical rating scale (数値的評価スケール)
VRS: verbal rating scale (口頭式評価スケール)
WOMAC: Western Ontario and McMaster Universities Osteoarthritis Index (ウェスタンオンタリオ・マクマスター大学変形性関節症指数)

緒言

痛みとは、「An unpleasant sensory and emotional experience associated with actual or potential tissue damage, or described in terms of such damage」（実際に何らかの組織傷害を伴う時、あるいは組織傷害が起こり得る状況下で、そのような傷害下で表現される不快な感覚あるいは情動経験である）（世界疼痛会議 1979 年）と定義される。これは痛みが患者の自覚によって表現される主観的な症状であり、各個人の自覚の程度は生涯の早い時期の損傷に関連した経験を通じた学習により形成されるとの考えに基づいている。

痛みは急性疼痛と慢性疼痛とに分類される。急性疼痛とは本来、起こり得る傷害や危害に対する危険信号であり、身体の生理的な反応である。生体の組織を侵害する刺激が末梢侵害受容体へ入力され、活動電位が脊髄後角の脊髄後根神経節 (dorsal root ganglion [DRG]) を経て 2 次神経へと伝達されて上行し、大脳皮質の体性感覚野で受容されることで自覚される。一方、慢性疼痛とは、組織損傷が治癒したにもかかわらず継続する痛みや、明らかな組織損傷がないにも関わらず自覚される痛みのことである。すなわち慢性疼痛とは、「疾患が通常治癒するのに必要な期間を超えて継続する痛み」である。またこうした疼痛には、それぞれ 1. 炎症や刺激、組織損傷による痛み（侵害受容性疼痛）、2. 神経、脊髄、または脳の損傷や機能障害による痛み（神経傷害性疼痛）および 3. 心理的要因からくる痛み（心因性疼痛）の 3 つに分類されるが、各々の混合性疼痛も存在しており、治療を複雑にしている (Figure 1)。

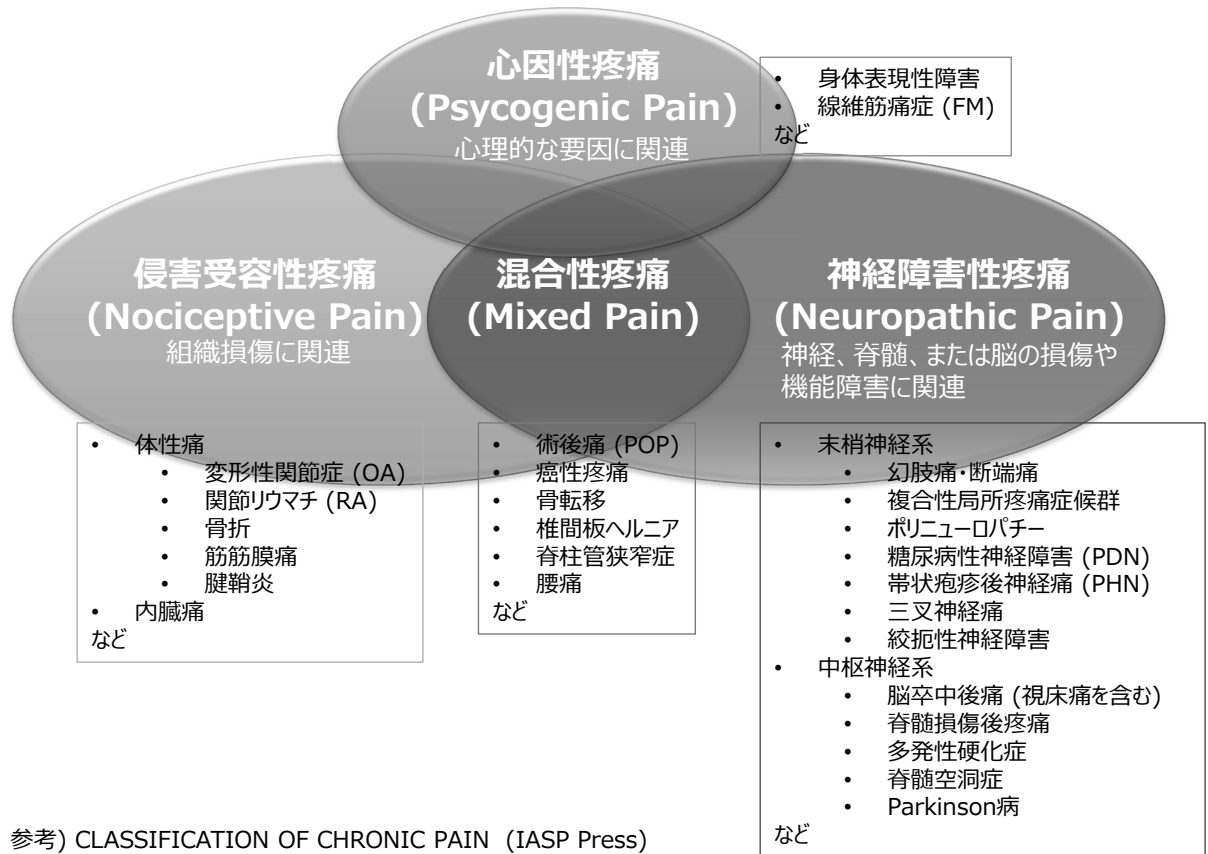


Figure 1. Types of pain

慢性疼痛は患者にとって精神的苦痛を伴うとともに、日常における身体活動の制限を強いることになる。米国における 2008 年の医療支出パネル調査によれば、1 億人もの成人が慢性疼痛に罹患しているとされ、医療コストおよび生産性低下を含んだ慢性疼痛による経済損失は 5,600 ～ 6,350 億ドルにも及ぶと推計される[1]ことから、社会的にも多大な損失と影響を与えることが医療経済学的に証明されている。それ故に慢性疼痛に高い有効性を示す新規鎮痛薬の開発は喫緊の課題である。しかしながら、慢性疼痛に対する治療薬の上市確率は決して高いとは言えないのが現状である[2]。現在臨床で使用される鎮痛薬の多くは、古くから民間療法として使用されてきた天然物由来成分[3,4]や、抗うつ薬や抗不安薬[5,6]として処方される薬剤のなかに鎮痛作用を有するとして新たに鎮痛薬としての適用を取得したものなど、はじめにヒトで鎮痛作用が見出されて鎮痛薬として新たに開発されたものが殆どである。これは、非臨床の鎮痛薬創薬研究においては齧歯類を中心とする疼痛モデル動物を用いた薬効評価法が重要な研究基盤となっているが、疼痛動物モデルで検出された鎮痛薬候補の薬効が患者において再現されない事例が少なからず見受けられることがその一因として考えられる。非臨床／臨床間で薬効の相違が表れる原因は様々考えられるが、その一つに疼痛モデル動物の臨床効果予測性が十分ではないことが含まれる[7]。従って、疼痛モデル動物における評価方法を改良することにより臨床効果予測性を向上させることは、今後の鎮痛薬の研究戦略における重要課題の一つである。

従来の評価方法は、外界から機械、熱などの人為的な刺激を動物の体表に与え、動物の回避反応惹起に必要な最小刺激量（反応閾値）を疼痛指標として用いるものが殆どである[8]。すなわち、疼痛モデル動物では主に逃避反射による行動を指標とする刺激誘発痛を評価する方法が広く用いられてきた。一方、臨床においては一般的に、外的刺激が与えられることなく視覚的アナログスケール (visual analogue scale [VAS]), 数値化スケール (numerical rating scale [NRS]), 口頭式評価スケール (verbal rating scale [VRS]) や、フェイススケール等を用いて、患者がこれまでの経験を元に主観的かつ相対的に痛みの強さを数値化する方法が用いられている。すなわち臨床では自発痛を評価していると考えられる。従って、非臨床と臨床における疼痛評価指標を一致させるためには薬効評価に用いる疼痛モデル動物においても自発痛を指標とする疼痛評価法を導入する必要がある (Figure 2)。従来の刺激誘発痛評価方法のもう一つの課題は、それらが特定の実験者の実験手技および主観的判断に依存している点である。すなわち、刺激誘発痛を指標とする評価方法では、動物への刺激負荷時の操作および回避反応の判定は特定実験者の主観的判断によって行われる。そのため手技の習熟度の違いによって実験者間で測定結果が変動する恐れがあり、またその技術習得ならびに測定中における実験者への負担も大きい。これらの課題解決のためには、自発痛指標を基にした機械による客観的な自動測定を実現する必要がある。

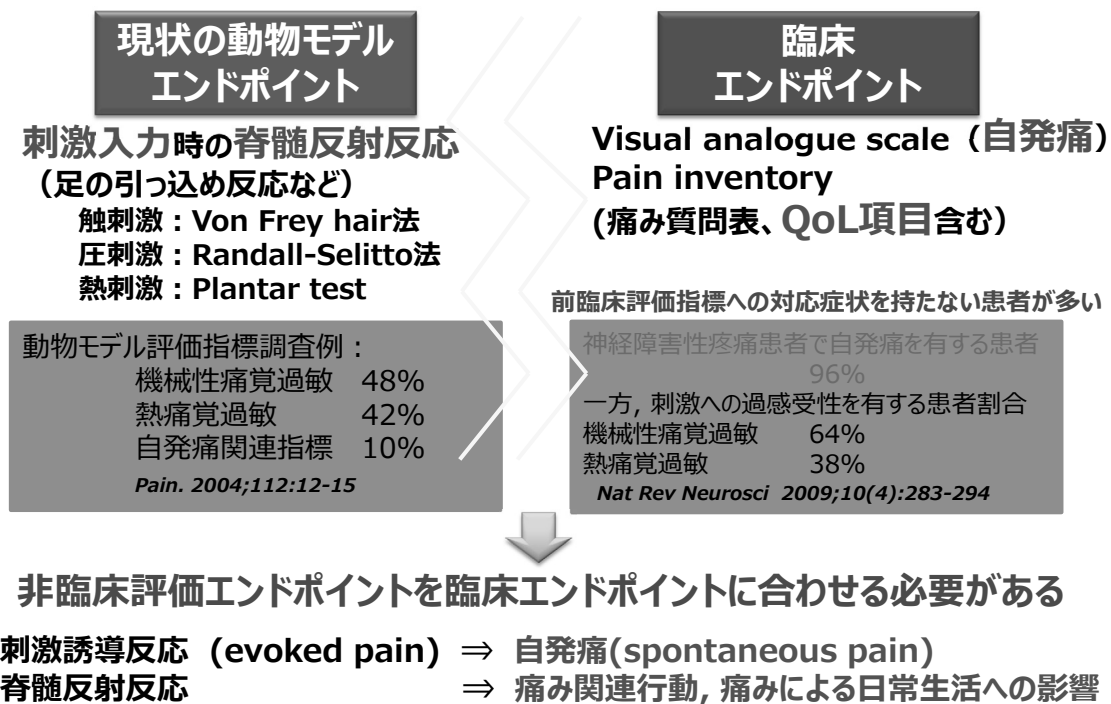


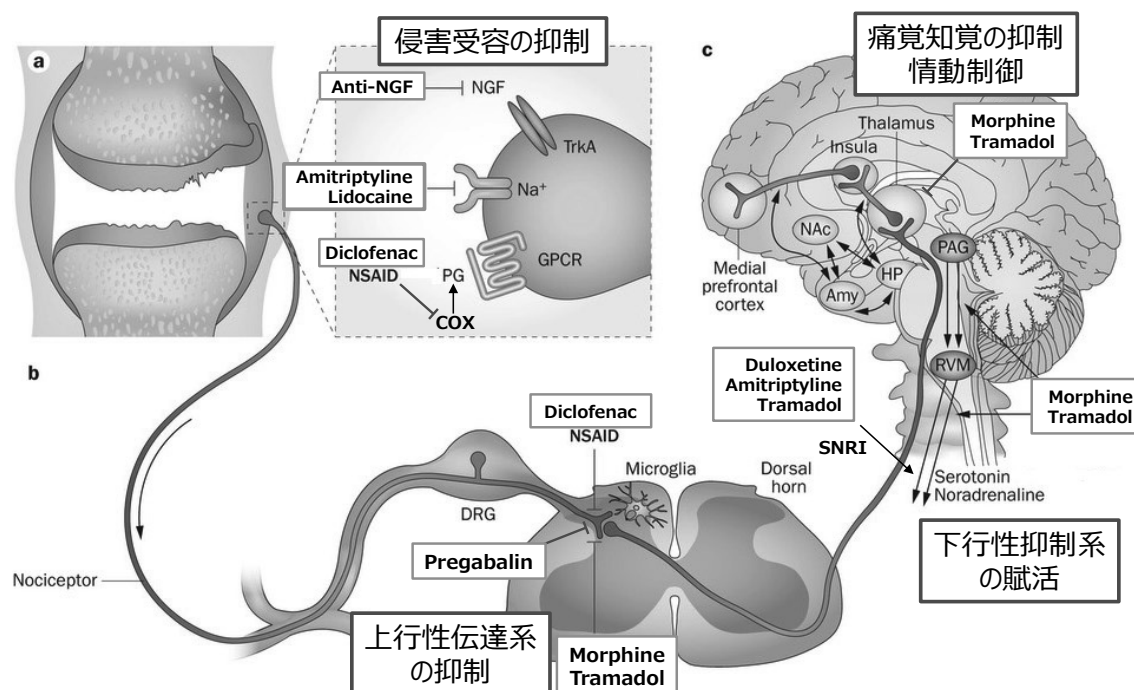
Figure 2. Gap between clinical and preclinical endpoints

自発痛検出の方法については、通常、疼痛患者は痛み症状を言葉で伝えるのに対して、当然ながら疼痛モデル動物においては言語に代わって疼痛が反映される自発痛関連指標を探索する必要がある。動物が痛みを原因として呈する可能性のある行動型として、患部気に向け行動（舐める、上げる／かばう、振るなど）の増加、静止時や動作時の姿勢（左右荷重差／歩様など）の変化、行動量（立ち上がり／探索行動）の低下、摂餌量の低下、睡眠パターンの変化、不安行動の増加などが挙げられる。実験でどの自発痛行動型を選択するかについては、疼痛モデル動物毎に最適な自発痛関連行動型を評価指標として選択することが重要である。その際、薬剤の鎮痛作用の検出力を高める上で、健常対照動物と疼痛モデル動物との差が十分に大きいといった病態に特異的な指標を選ぶことが肝要である。加えて、機械による自動計測および解析が可能である指標を選択することが客観性を担保する上で必要である。また、短期間に多くの鎮痛薬候補物質の評価を行う必要があることから、同時に多数の動物を測定できる高い処理速度を有する自動測定系であれば一層望ましいと考えられる。

本研究では、従来方法の課題解決の方策としての新しい鎮痛薬評価系、すなわち疼痛モデル動物における自発痛関連行動の自動測定法を新たに構築し、臨床効果予測性を高めることを目的とした。具体的には、神経障害性疼痛モデルラットで認められる患肢の異常動作を電磁誘導変化により自動測定する系、および変形性関節症 (OA: osteoarthritis) モデルラットに生じる自発痛様後肢異常動作を歩様変化として自動測定する系をそれぞれ構築し、上市薬を用いて臨床効果予測性について検証した。さらに現在臨床試験において、変形性関節症に伴う慢性疼痛に対して顕著な有効性を示している抗 β -nerve growth factor (NGF) 抗体を OA モデルラットの歩様変化自動測定系で評価し、臨床試験で認められている抗 β -NGF 抗体の顕著な鎮痛作用が本系においても再現し得るか、本歩様変化自動測定系の臨床効果予測性について検証した。ま

た抗 β -NGF 抗体の最も効果的な処方タイミングについて探索し、抗炎症作用や関節破壊抑制作用についても検討することで、鎮痛作用機序について考察した。

以下に本研究に使用した既存薬剤の作用機序を概説する[9](Figure 3)。



Nature Reviews Rheumatology 9, 654–664 (2013)から引用, 改変

Figure 3. Pain signaling pathway and the analgesic mechanism of various drugs

Amitriptyline は三環系抗うつ薬であり, serotonin や norepinephrine の再取り込みを抑制する serotonin/norepinephrine reuptake inhibitor (SNRI) 作用による下行性疼痛抑制系の賦活のほか電位依存性 Na^+ チャンネル Nav1.3 抑制作用もあり, 末梢レベルでも神経障害性疼痛を抑制するとされる. 臨床での主な有害事象として口渇, 傾眠, ふらつき, 排尿障害, 便秘が知られている.

Pregabalin は電位依存性 Ca^{2+} チャンネル $\alpha 2\delta$ サブユニットに結合することにより, シナプス前の Ca^{2+} イオンの流入を抑制して伝達物質の放出を抑制すると考えられている. 臨床での主な有害事象として傾眠, ふらつきが知られている.

Diclofenac は非ステロイド性抗炎症薬 (non-steroidal anti-inflammatory drug [NSAID]) であり, cyclooxygenase (COX) の 1 および 2 型の活性を抑制して arachidonic acid からの prostaglandin (PGs) の合成を阻害することで, 鎮痛作用のほか抗炎症作用や解熱作用を発揮するとされている. 一方で, PGs は消化管粘膜保護作用もあることから, NSAIDs による消化管障害が有害事象として临床上問題となっている.

Morphine は μ -opioid 受容体を介した, 1) 脊髄における上行性の痛覚情報伝達経路の抑制, 2) 視床髄板内核群や大脳皮質の上位中枢に作用することによる痛覚情報知覚の抑制, といった感覚神経から入力された疼痛シグナルの遮断, ならびに 3) 中脳水道周囲灰白質 (PAG) に作用し, 延髄 - 脊髄下行性 serotonin および norepinephrine

神経からなる下行性抑制系の賦活化, といった様々な機序により鎮痛作用を発揮するとされている. また 4) μ -opioid 受容体は扁桃体や帯状回, 腹側被蓋野, 側坐核などの部位に高密度に存在していることから, 情動制御にも深く関わっていることが示唆されている. 一方で, 5) その他の中樞神経系作用として呼吸抑制作用 (延髄呼吸中枢の抑制), 催吐作用 (第 4 脳室最後野の化学受容器引き金帯への作用), 依存などが, 6) 末梢神経系への作用として消化管運動抑制作用 (腸管膜神経叢での acetylcholine 遊離抑制) などが知られており [10], こうした有害事象が morphine の使用を大きく制限している.

Duloxetine は SNRI 作用により, 下行性抑制系神経を賦活化することで鎮痛作用を示すとされている.

Tramadol は SNRI 作用を有するとともに, その代謝物は morphine ほどの強い作用は有さないものの, μ -opioid 受容体に作用して同様の機序で鎮痛作用を示すとされている.

局所麻酔薬である lidocaine は電位依存性 Na^+ チャネル阻害作用による神経の脱分極を抑制することで, 上行性の疼痛伝達経路を遮断する.

抗 β -NGF 抗体は β -NGF が侵害受容神経に発現する tropomyosin receptor kinase A (TrkA) 受容体へ結合するのを阻害して, 神経伝達物質の産生, 侵害受容体/イオンチャネルの発現や活性の亢進, 肥満細胞からの発痛物質産生を抑制することで鎮痛効果を発揮するとされる [11]. 現在複数の抗 β -NGF 抗体が第三相臨床試験を実施中であり, OA 膝あるいは股関節疼痛に対して単回投与で持続的かつ顕著な薬効を示している [12-14]. 一方で, 大腿部骨頭壊死や末梢神経異常といった有害事象が問題となり, 開発は継続しているものの未だ上市には至っていない (Figure 4).

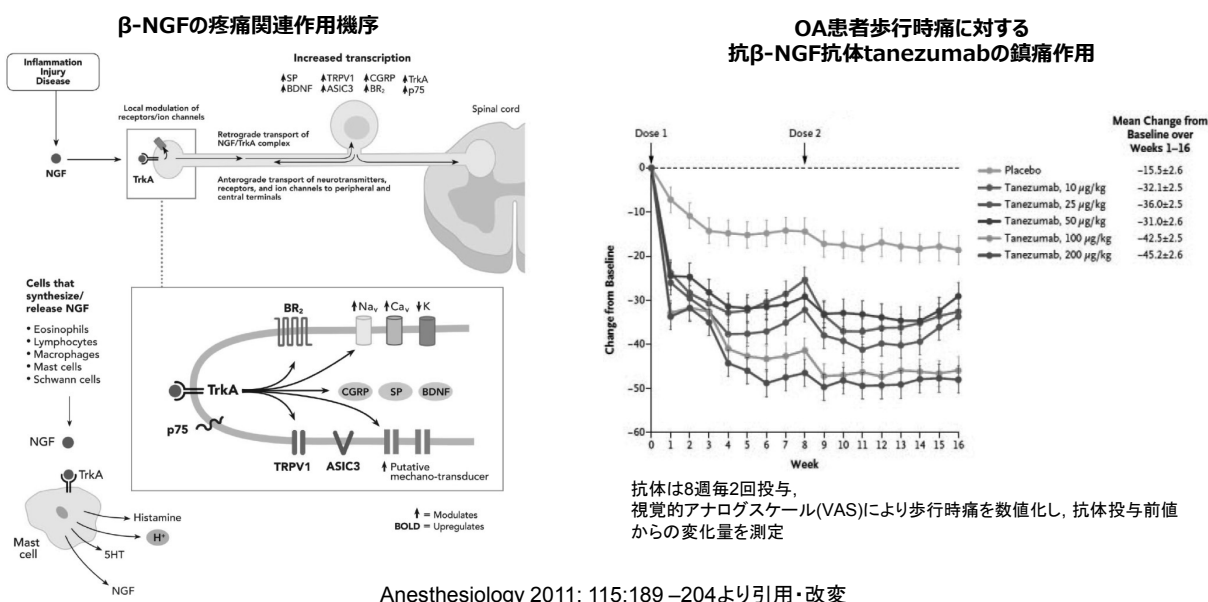


Figure 4. Pain-evoked mechanisms of β -NGF and clinical effect of anti β -NGF antibody, tanezumab on walking pain in OA patients

第 1 章 ラット神経障害性疼痛モデルにおける自発痛自動測定系の構築

1. 序論

神経障害性疼痛モデル動物を用いた非臨床試験では、これまで機械刺激や熱といった侵害刺激に対する反射反応が生じるまでの閾値を、実験者の主観的な判断によって決定するといった手法が一般的に採用されてきた[15–17]。一方、鎮痛薬の臨床試験では、侵害刺激誘発性疼痛よりも自発痛が反映される VAS や NRS といった患者主観に基づいた指標が第一評価項目となることから[18]、こうした臨床／非臨床指標の乖離が非臨床試験における鎮痛薬の臨床有効性予測精度を低下させる一因となっている可能性がある[16–18]。したがって、非臨床試験においても自発痛を評価することは鎮痛薬の臨床上的有効性を予測する上で重要であり、神経障害性疼痛モデル動物の自発痛関連行動を測定することは、上記の課題を克服する可能性がある[19–21]。

外科的処置による体性感覚神経損傷によって神経障害性疼痛を惹起させるモデル動物は古くから疼痛研究に広く用いられてきている[22–24]が、このようなモデル動物では障害肢の上げ、振り、舐めなどの非対称性の異常肢動作が頻繁に観察される[25–27]。これらの動作は健常動物ではほとんど認められない神経障害性疼痛モデル動物に特有の動作であることから自発痛様行動であることが示唆されている[8]。中でも坐骨神経を大腿部付近で緩結紮する chronic constriction injury (CCI) モデルラットでは部分的坐骨神経結紮 (partial sciatic nerve ligation) や脊髄神経結紮 (spinal nerve ligation) といった他の手術様式によるモデルラットと比較して異常肢動作頻度が高いことが報告されている[28]。しかしながら、この肢のみに限局する動作が捉えにくいことや動作が複雑であること等が原因でこれまで機械による自動測定が困難であった。そのため、定量的かつ効率良く鎮痛薬候補を評価することが求められる創薬研究におけるボトルネックとなっていた。

Yaksh らは、formalin を足裏に投与することで惹起される障害肢の異常行動を、障害肢にあらかじめ磁石を埋め込むことで生じる電磁誘導変化として測定する方法を報告しており、狭帯域周波数設定を用いて単一の肢振り (flinching/shaking) 動作のみを検出することに成功している[29]。

そこで著者は坐骨神経絞扼損傷 (CCI) 外科手術を施したラットの絞扼施術側肢に磁石を埋め込み、Yaksh らの方法よりも広帯域周波数設定を用いて、神経障害肢に表れる多種の異常肢動作、すなわち、肢上げ (lifting/guarding)、肢振り (flinching/shaking)、および肢舐め (licking) 動作を検出した。さらに、臨床で使用されている鎮痛薬を用いて本自発痛関連行動測定系における治療効果を検討した。

2. 実験材料および実験方法

2-1. 使用動物

雄性 Sprague-Dawley (SD) ラットは日本エスエルシー株式会社 (静岡) から購入した。室温 $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$ 、湿度 $55\% \pm 10\%$ の一定条件下で、7:30 から 19:30 は室内点灯し

て明期とし、19:30 から翌 7:00 は消灯して暗期とする 12 時間明暗サイクルにて、水および固形飼料は自由に摂取させ、1 ケージ当り 3 匹ずつ飼育した。3 日間以上の馴化期間を経て、実験には 6 週齢（CCI 施術時）の動物を使用した。動物の取扱いはアステラス製薬株式会社（東京）動物実験に関する指針に基づいて実施した。なお、術肢動作測定試験は全て 10:00-17:00 の間に実施した。

2-2. 使用化合物

三環系抗うつ薬の amitriptyline hydrochloride および NSAID の diclofenac sodium は Sigma-Aldrich Co LLC. (St. Louis, MO, USA) から購入した。Ca²⁺ チャネル $\alpha 2\text{-}\delta$ 阻害剤の pregabalin および SNRI の duloxetine hydrochloride はアステラス製薬株式会社にて調製した。なお、amitriptyline および pregabalin は蒸留水に溶解させ、duloxetine および diclofenac は 0.5% methyl cellulose（信越化学工業株式会社、東京）水溶液に懸濁した。全ての被験薬および溶媒は、5 mL/kg の投与液量で動物に経口投与した。なお各被験薬の投与量は塩係数からフリー体に換算して算出した。

2-3. CCI モデル

CCI 施術は Bennett らの方法[22]に準じて実施した。ラットを pentobarbital（共立製薬株式会社、東京）麻酔下右側臥位にて左大腿部を縦切開し、筋層を剥離して坐骨神経を露出させ、神経の末梢側より周囲を 1 mm 間隔で 4 箇所、4.0 chrome 糸を用いて緩く結紮した後、筋層ならびに皮膚を縫合して閉創した。Sham 群では、上記と同様に皮膚切開後に筋層を剥離して坐骨神経を露出させた後、神経絞扼せずに閉創した。

2-4. MicroAct による術肢動作の自動測定

Isoflurane (Mylan Inc., Canonsburg, USA) 麻酔下で 16G \times 2^{1/2} 留置針（テルモ株式会社、東京）を用いて絞扼施術側肢の甲部に直径 1 mm、長さ 3 mm の磁石（株式会社ニューロサイエンス、東京）を埋め込んだ (Figure 5A)。磁石を埋め込んで 2 日以上経過後に、ラットを照度約 20 lux の条件下に 20 分間以上馴化させ、その後 23 \pm 2 °C の一定室温条件下にて、7000 巻のコイルで囲まれた直径 28 cm、高さ 25 cm の測定箱（株式会社ニューロサイエンス）に入れて (Figure 5B) 5 分間馴化させた後に測定を開始した。測定箱およびアンプから成る測定ユニットは 16 基設置し、16 匹同時に測定可能とした (Figure 5C)。電磁誘導により、磁石が埋め込まれた術肢の動作に依存して生じるコイル内電圧をアンプで増幅してデジタル信号化し、電圧波形としてパソコン (PC) で 30 分間記録および解析 (MicroAct Scratching Test version 1.06, 株式会社ニューロサイエンス) することで術肢動作の回数を測定した。PC に表示される代表的な波形解析画面について Figure 5D に示す。なお、磁石の動きによって生じる電磁誘導は全て電圧を生じ、電圧の変化量は磁石の動く速度に相関するとともに、特にコイル面に対して垂直に磁石が振られた場合により強い電圧変化を生じる仕組みである。測定条件は周波数 2.5~20 Hz, 検出閾値 0.01 V, 動作持続時間 (duration) 0.09 秒以上, 動作途切れ時間 (gap duration) 0.03 秒以上に設定した。

1.2, 2.0, 3.6, 5.5, 8.5 および 15.1 g の各種フィラメントで段階的に刺激を加えて 6 秒以内の回避反応の有無から閾値を測定した。具体的には 2.0 g のフィラメントで刺激を加えることから開始し、回避反応を得た場合には一段階細いフィラメントで刺激を加え、回避反応が得られなかった場合には一段階太いフィラメントを適用し、最初の反応から 4 回反応を得るまで測定を続け、その時のフィラメント値から Dixon 昇降法により皮膚侵害閾値を算出した。

2-7. Acetone 噴霧による冷刺激誘発痛評価

CCI 後 4 週間のラットを使用し、CCI 群 (n = 12) および sham 群 (n = 12) について皮膚冷刺激に対する回避反応を既報[31]の方法を改変して測定した。すなわちラットを金網底の測定ケージに收容し、insulin 投与用シリンジ (Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, USA) を用いて acetone を 50 μ L 術肢の足裏中央に噴霧した。Acetone 噴霧後 1 分間における肢上げおよび肢振り動作の回数を測定し、侵害刺激に対する防御反応の指標とした。5 分間毎に 3 回測定し、その平均値を各個体の皮膚侵害閾値とした。

2-8. 自動測定による術肢動作の経時解析

MicroAct を用いた 30 分間の自動測定試験は、CCI 群 (n = 12) および sham 群 (n = 12) について CCI 術後 1, 2, 3, 4 および 6 週に実施した。

2-9. 薬効評価

各被験薬の薬効確認試験においては、CCI 術後 4 週のラット 48 匹および sham ラット 9 匹について薬効評価試験前日に MicroAct による 30 分間の自動測定を行い、被験薬投与前の測定値をプレ値とした。薬効評価当日に、プレ値を元に 1 群 12 匹になるよう 4 群に群分けを行った。各被験薬の投与量ならびに投与後の測定開始時間については既報を参考にした。すなわち、pregabalin[32]は 2 時間後に、duloxetine[33]は 3 時間後に、amitriptyline[34]および diclofenac[35]は 1 時間後に MicroAct による自動測定を 30 分間行った。なお、同週齢の健常ラットに対する被験薬薬効についても上記と同じ方法に則って測定した。

2-10. 統計学的処理

実験データは平均値 \pm 標準誤差で示した。統計的有意差の検定は、2 群間の比較には Student's t-test を、多群間の比較には多重性を考慮して一元分散分析 (one-way analysis of variance [ANOVA]) 後に Dunnett's multiple comparison test を用い、*P* 値が 0.05 未満の場合を統計的有意とした。相関関係の検定には Spearman correlation analysis を用いた。また、全ての統計処理およびグラフ作成には GraphPad Prism version 4 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA) を用いた。

3. 実験結果

3-1. CCI および sham ラット術肢動作の観察

目視観察下において、sham ラットは歩行に伴う正常な後肢動作を示し、術肢に特異的な異常動作を示すことはなかった。一方 CCI ラットにおいては、歩行に伴う正常な動作に加えて、肢上げ、肢振りおよび肢舐めといった特異的な異常動作を頻度高く術肢に認めた。目視にて観察されたこれらの術肢動作は、MicroAct による自動測定においても検出が可能であった。Figure 6A にラット術肢動作によって生成された波形例を示す。

Figure 6B に示すように、目視観察および自動測定ともに、CCI 群の術肢動作頻度は sham 群に比べて有意に高かった ($P = 0.030$ および 0.022)。さらに、CCI 群の後肢動作頻度は自動測定が目視観察に比べて有意に高く ($P = 0.042$)、一方 sham 群においては測定方法による有意な違いは認められなかった ($P = 0.084$)。Sham 群ならびに CCI 群ともに、目視観察による動作頻度と自動測定により検出された動作頻度には有意な相関が認められた (Figure 6C および D)。図中に Spearman 相関係数 (ρ) を示す。

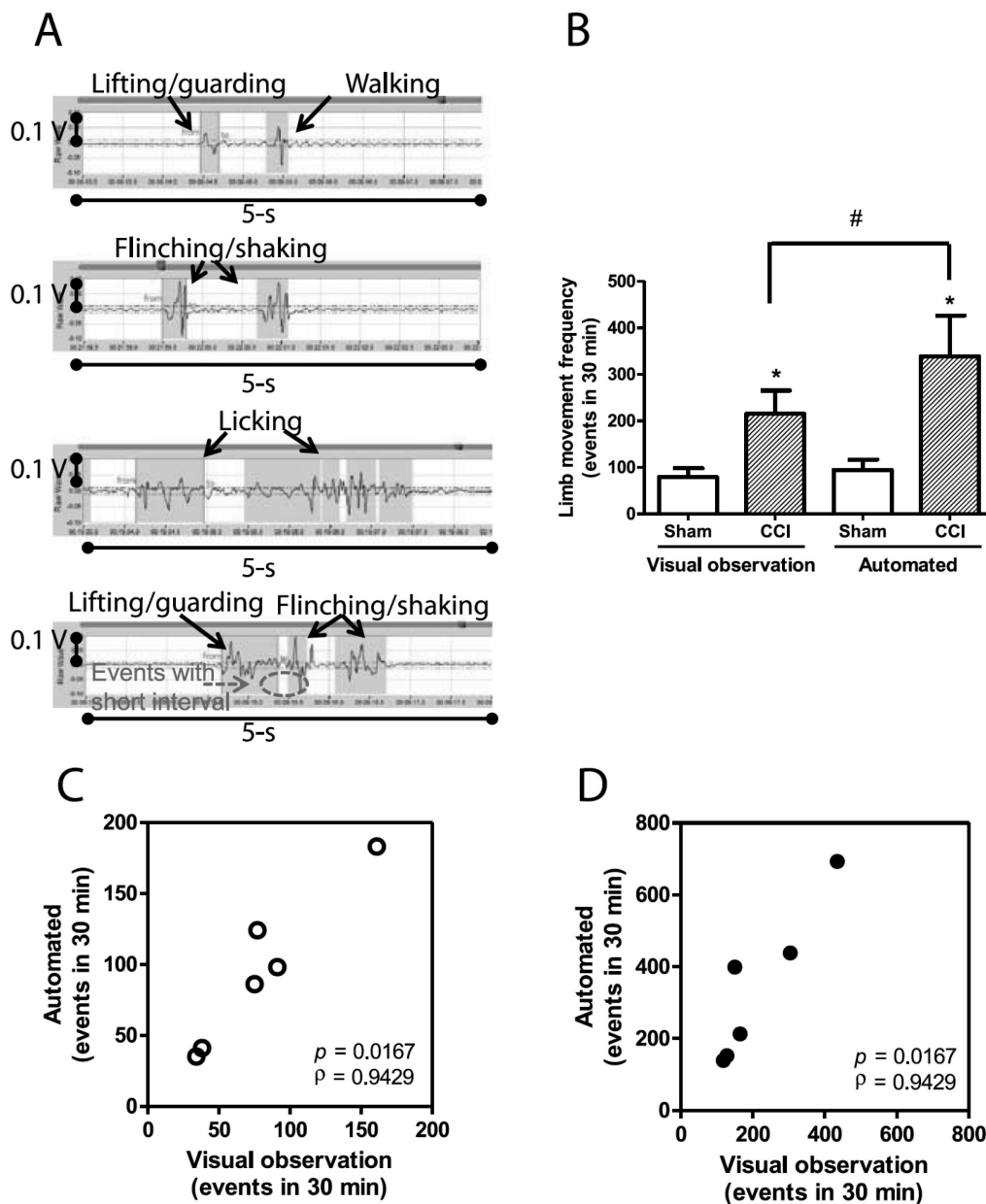


Figure 6. (A) Examples of waveform, which sham or CCI rats produced. (B) Frequency of limb movement events during a 30-min observation period determined by visual observation and automated measurements concurrently in the same animal. All data are presented as the mean \pm S.E.M. ($n = 6$); * $P < 0.05$ compared to corresponding sham group, # $P < 0.05$ compared to visual observation (Student's t-test). Frequency of limb movements in individual (C) sham rats and (D) CCI rats.

3-2. 自動測定による経時的変化

CCI 群は、測定開始時の術後 6 週間以上にわたって sham 群に比べて高い動作頻度を示し、術後 4 週間の時点で統計的解析を行ったところ CCI 群と sham 群には有意差を認めた ($P = 0.0005$)(Figure 7).

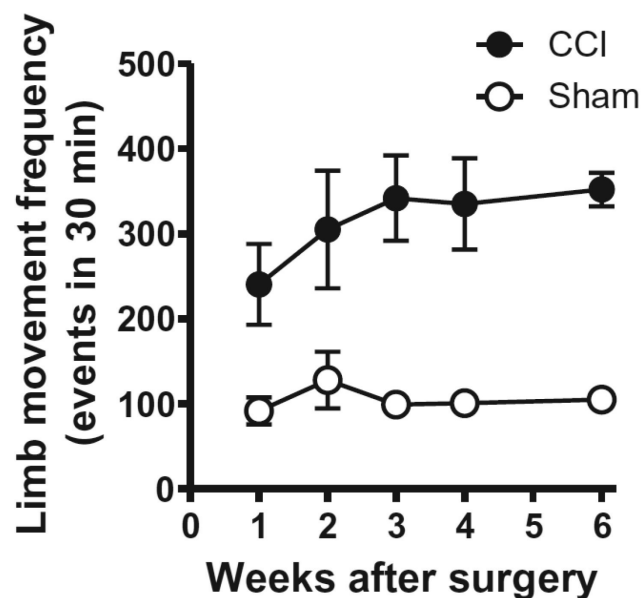


Figure 7. Limb movement frequencies over 30-min observation period determined by automated measurement during different periods postsurgery ($n = 12$ for both sham and CCI rats). All data are presented as mean \pm S.E.M. Statistical analysis for the data obtained at 4 weeks after the surgery indicated a significant difference in the frequency between sham and CCI rats.

3-3. 自動測定による自発痛関連行動と、侵害刺激に対する回避行動との相関

CCI 術後 4 週間に、自動測定によって観察される自発痛関連行動頻度と、von Frey hair テストによる侵害受容閾値との相関について Figure 8A に示した。両測定方法による値の間には相関は認められなかった ($P = 0.81$)。また、同様に自動測定による自発痛関連動作頻度と acetone 冷刺激によって誘発される後肢動作頻度とに有意な相関は認められなかった ($P = 0.52$)(Figure 8B)。図中に Spearman 相関係数 (ρ) を示す。

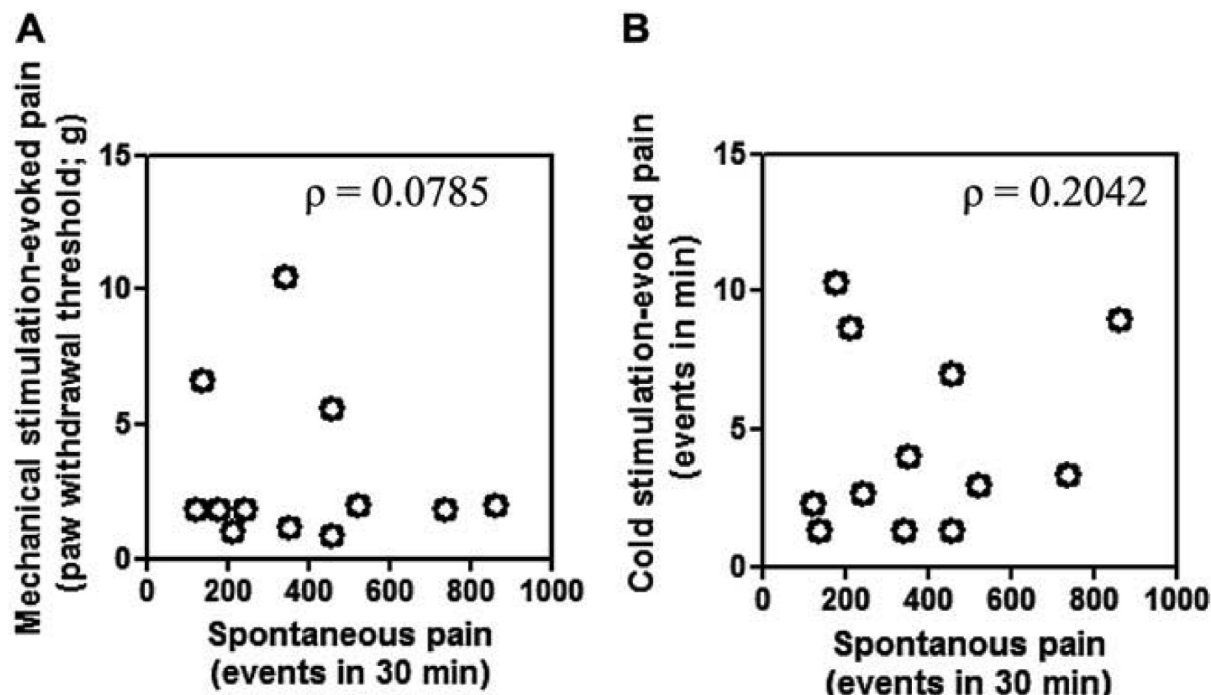


Figure 8. Correlation between spontaneous and evoked pain measures. The frequency of spontaneous pain behaviour determined by automated measurement at week 4 after CCI surgery in individual animal ($n = 12$) was plotted on X-axis. The paw withdrawal threshold in von Frey hair test and the frequency of paw movement induced by acetone spray in corresponding animal were plotted on Y-axis in Figures 8A and B, respectively.

3-4. 自発痛関連行動に対する薬効評価

CCI ラット自発痛関連行動に対する pregabalin, duloxetine, amitriptyline および diclofenac の薬効評価結果を Figure 9 に示す. Pregabalin は 30 mg/kg を経口投与することで抑制傾向を示したものの, 用量依存的かつ有意な作用は示さなかった (Figure 9A). Duloxetine は 30 mg/kg の経口投与により有意な抑制作用を示した (Figure 9B). Amitriptyline は 30 および 100 mg/kg の経口投与により有意な抑制作用を示した (Figure 9C). Diclofenac は 10 mg/kg を最大としたいずれの用量においても抑制作用を示さなかった (Figure 9D).

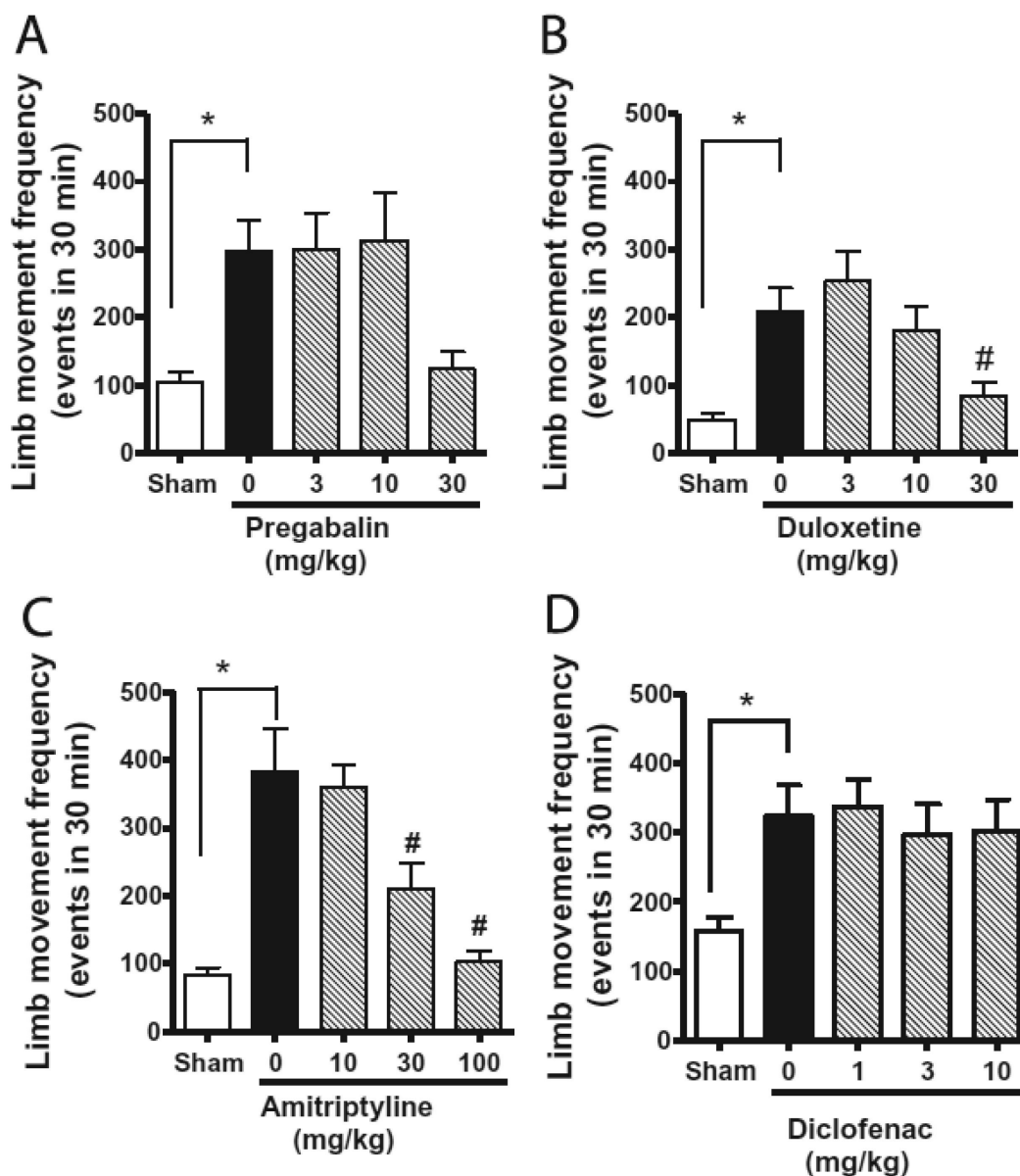


Figure 9. Effects of pregabalin (A), duloxetine (B), amitriptyline (C), and diclofenac (D) on limb movement frequency in CCI rats as determined by automated measurement. All data are mean \pm S.E.M. Each drug was tested on 12 CCI rats (48 total). The sham group consisted of nine rats. * $P < 0.05$ compared with sham group. # $P < 0.05$ compared with the corresponding vehicle.

一方健常ラットの正常行動に対する各薬剤の薬効は, pregabalin はいずれの用量においても有意な抑制作用を示さなかったものの (Figure 10A), duloxetine は 30 mg/kg から有意な抑制作用を示し (Figure 10B), amitriptyline は 100 mg/kg において有意な抑制作用を示した (Figure 10C).

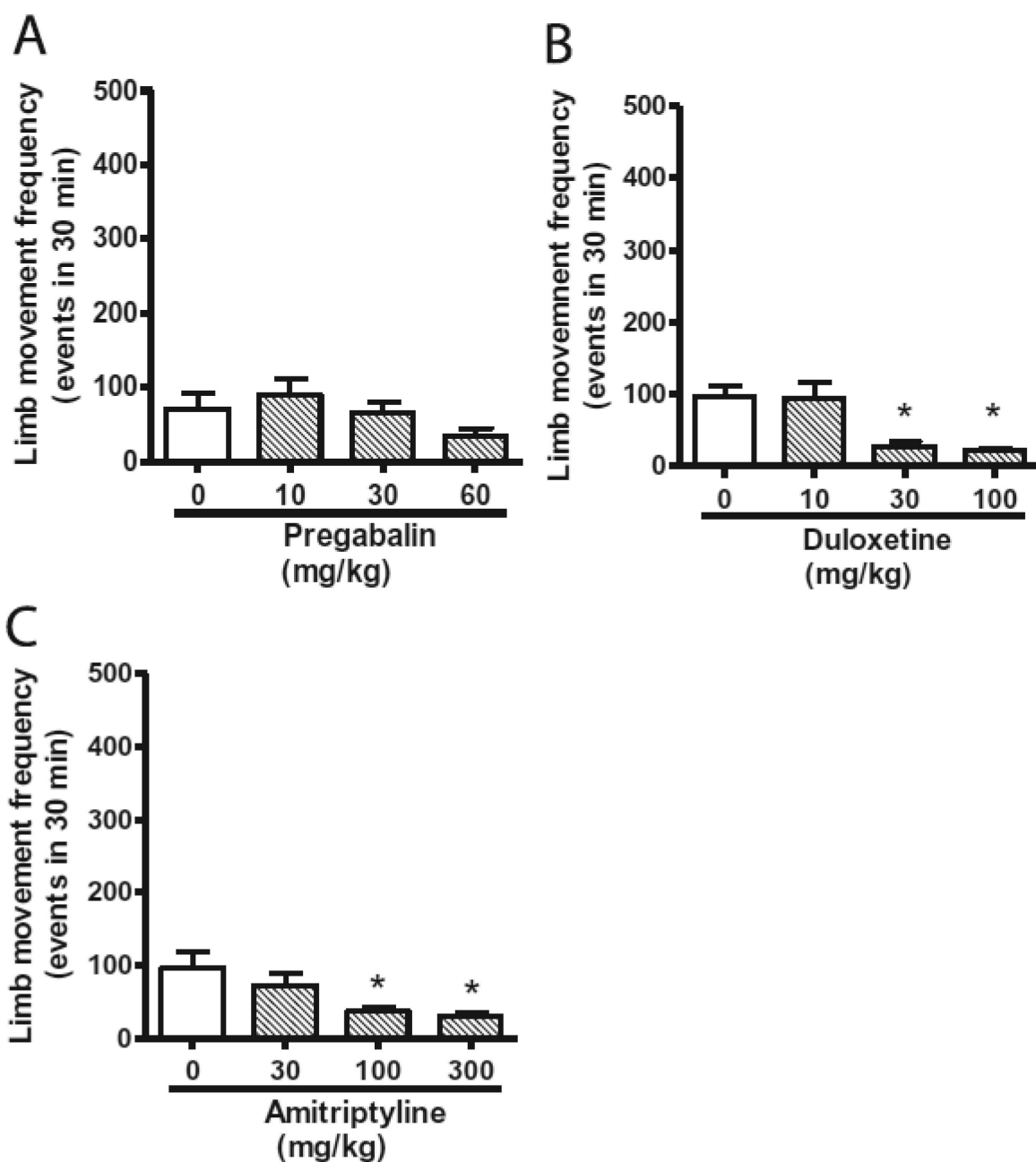


Figure 10. Effects of pregabalin (A), duloxetine (B), and amitriptyline (C) on limb movement frequency in 12 healthy control rats as determined by the automated method. All data are presented as mean \pm S.E.M. * $P < 0.05$ between drug effect and vehicle.

4. 考察

本章記載の研究において、sham ラットは歩行関連動作のみを示すのに対し、CCI ラットは通常の歩行関連動作に加えて術肢に限定した異常動作を示した。非対称の異常肢動作は自発痛指標となることが示唆されており[8]、本章記載の自動測定によって sham ラットに比べてより高頻度に認められた CCI ラットの後肢動作は、神経障害性疼痛症状に含まれる自発痛を反映している可能性がある。

これまでも、狭帯域周波数設定を用いて肢振り (約 8Hz)[29] あるいは引っ掻き (scratching)(10-20Hz)[36,37]といった単一動作を検出することは試みられてきているが、今回著者は 2.5-20Hz といった広帯域周波数設定を採用することで神経障害性疼痛に関連する一連の複雑な後肢動作を検出することに成功した。

また自動測定による異常動作頻度は目視観察による場合に比べて有意に高かった。これは自動測定時に各イベント間のギャップを 0.03 秒に設定することで、目視では区別できずに一つの動作として認識していた二つの動作を区別することが可能になった結果と考えられた。本結果が臨床症状とどのように相関するかはさらに精査が必要である。

神経障害性疼痛患者の主な症状は、侵害性疼痛よりもむしろ主観的に表現される自発痛とされている[18]。それ故神経障害性疼痛モデル動物においても自発痛関連行動を客観的に評価することが重要とされる[7,8]が、これまでは一般行動や顔の表情といった自発痛関連行動を主観的に評価する方法[38,39]か、オペラント行動[40]や場所嗜好性[41]、あるいは後肢荷重差[42]を利用したもの等比較的客観的であるものの動物のトレーニングを必要とする等煩雑な評価方法がいくつか報告されるのみであった。本研究で構築された測定方法は、神経障害性疼痛状態に伴う自発痛を客観的に効率良く解析するための新しい手法である。本手法の利点として、一般行動評価の数値化等特別なスキルを必要としないこと、加えて事前にラットをトレーニングすることなく、自発行動を評価できることが挙げられる。本手法は理論的に、患肢に特異的な異常動作を示す他の慢性疼痛動物モデルにも同様に適用可能と考えられる。

興味深いことに、CCI 術後 4 週間で測定された自発痛関連行動と von Frey hair 機械刺激や acetone 冷刺激といったこれまでの評価指標とに有意な相関は認められなかった。このことは神経障害性疼痛の CCI モデルでは、自発痛と、少なくとも機械もしくは冷刺激誘発痛においては乖離があることを示唆している。これらの結果を踏まえると、刺激誘発痛指標は自発痛の代替指標とはならないかもしれない。

1980 年代後半から、鎮痛薬候補化合物評価にいくつかの神経障害性疼痛動物モデル[22-24,43]が利用されてきた。これらの動物モデルで様々な候補化合物が著しい鎮痛作用を示してきたが、いくつかの化合物については臨床において鎮痛薬としての有効性を示すことができていない[7]。鎮痛薬候補化合物は主に神経障害性疼痛モデル動物での誘発痛評価を元に同定されてきた。一方で、こうした鎮痛薬候補化合物の神経障害性疼痛患者に対する臨床試験の主要エンドポイントは自発痛と密接に関係していると考えられる VAS や NRS 等の数値的スコア評価がほとんどであり、非臨床／臨床試験間にみられる鎮痛薬有効性の乖離が生じる原因は未だ判明していないものの、有力な理由として非臨床と臨床では測定されている疼痛要素が異なっているということが考えられた。そこで本研究では誘発痛評価と自発痛評価における薬剤の有

効性について比較するため、CCI ラットの誘発痛評価を実施している既報に準じて自動測定による既存薬の自発痛評価を行った。Field ら[32]の報告によれば、神経障害性疼痛の緩和に用いられる pregabalin の接触性アロディニアおよび熱痛覚過敏に対する最小有効用量はそれぞれ 3 および 10 mg/kg であるが、今回の検討では 30 mg/kg まで投与しても自発痛関連行動に対して抑制傾向は認められるものの統計的に有意な作用は得られなかった。De Vry ら[34]は、amitriptyline は 128 mg/kg まで投与しても機械性アロディニアを抑制しなかったが、熱痛覚過敏に対しての最小有効用量は 32 mg/kg であったと報告している。本研究の自発痛関連行動評価では、amitriptyline の最小有効用量は 30 mg/kg であった。Duloxetine 50 mg/kg は機械性アロディニア[33]ならびに熱痛覚過敏[44]を抑制するが、本研究の自発痛関連行動評価においても 30 mg/kg を投与することで有意な肢動作回数の減少を示した。NSAID の diclofenac は本研究の自発痛関連行動評価において無効であり、NSAID が神経障害性疼痛患者治療において殆ど有効性を示さない[45]ことと一致している。このように薬剤感受性において誘発反応と自発痛関連行動に相違があることは、非常に興味深い。上述のように von Frey hair 試験等の刺激誘発痛指標は自発痛の代替指標にはならないことが示唆されることと、鎮痛薬の刺激誘発痛と自発痛に対する効果の間に相違があることを考え合わせると、鎮痛薬候補の臨床での自発痛に対する効果を予測するためには疼痛モデル動物においても自発痛指標を用いることが重要と考えられる。

しかしながら、amitriptyline 100 mg/kg や duloxetine 30 mg/kg の投与は、CCI ラットにおける肢動作回数低減だけでなく、健常ラットにおける歩行動作回数も有意に減少させる。このような場合には CCI ラットにおける肢動作回数低減作用に薬剤の鎮痛作用以外の非特異的な作用が含まれていることを否定できないため、結果の解釈には注意が必要である。一方、amitriptyline 30 mg/kg の用量は CCI ラットの肢動作回数を減少させるが、健常ラットの歩行動作回数には影響しない。このような場合、肢動作回数減少は自発痛の抑制によるものであり、非特異的な作用によるものではないことが示唆される。より鎮痛作用と非特異的作用の乖離の大きい薬剤や、diazepam のように神経障害性疼痛患者に対する鎮痛作用はないが、運動機能抑制のある薬剤[46]、substance P 受容体拮抗薬[47]や riluzole [48,49]といった動物モデルにおいて誘発痛に対する鎮痛作用を示すものの、臨床において鎮痛作用を示さない薬剤等々を評価することで臨床効果予測性に関するさらなる情報が得られることが期待される。

神経障害性疼痛患者の主な症状は灼熱痛や電撃痛といった言葉で表現される自発痛であるが、アロディニアや痛覚過敏といった外的刺激によって異常な激しい痛みを感じる誘発痛を有する患者も一定の割合で存在している[18,50,51]。神経障害性疼痛の不均一性を考慮すると、誘発痛症状の程度は潜在する疼痛機序によって変化するのかもしれない。従って、臨床診断において自発痛に加えて誘発痛症状を評価することは潜在している疼痛発症機序を理解する上で大変有益であると考えられる[18]。実際に冷、温、機械といった様々な刺激に対する痛覚閾値をエンドポイントとする定量的感覚検査 (quantitative sensory testing [QST]) は神経障害性疼痛の診断に近年取り入れられてきている[52]。こうした臨床的状況を踏まえ、非臨床においても神経障害性疼痛状態を多面的に解析する上で様々な症状を評価することが好ましいと考えられる。すなわち、神経障害性動物モデルにおいて自発痛評価と誘発痛評価の両方を取り入れ

ることは非臨床試験から臨床有効性を予測する上でより効果的と考えられる。

Table 1. Summary of effects of analgesics on evoked and spontaneous pain in CCI rats and on spontaneous behavior in sham rats

Clinically-used analgesics	CCI rat		Sham rat	
	Evoked pain		Spontaneous pain (MicroAct)	Spontaneous behavior (MicroAct)
	Mechanical	heat		
Effective dose, mg/kg		Effective dose, mg/kg		
Pregabalin	Yes ^[32]	Yes ^[32]	N.S.	N.S.
	3 ^[32]	10 ^[32]	N/A	N/A
Duloxetine	Yes ^[33]	Yes ^[44]	Yes	Yes
	50 ^[33]	50 ^[44]	30	30
Amitriptyline	N.S. ^[34]	Yes ^[34]	Yes	Yes
	N/A ^[34]	32 ^[34]	30	100
Diclofenac	N.T.	N.T.	N.S.	N.S.
	N/A	N/A	N/A	N/A

Yes and N.S., significant and not significant, respectively, compared with vehicle-treated control rats (one-way ANOVA followed by Dunnett's multiple comparison test); N.T., not tested; N/A, not applicable. Superscripts show reference numbers.

本章記載の研究では、神経障害性疼痛モデルである CCI ラットの異常後肢動作を電磁誘導の変化として検出することで自動的に測定する方法を新たに構築した。本手法は、様々な自発痛関連行動の効果的解析方法を提供するとともに、自動化により客観性およびスループットの改善を達成している。本自動測定システムによる自発痛関連行動評価が鎮痛薬候補の臨床有効性を予測する上でも役立つことが期待される。

Table 2. The attainment of the current study

Goal of the study	Criteria	Results
Clinical relevancy	Measurement of spontaneous pain component	Yes
Clinical validity	Response to clinically-used analgesics	Yes
Objectivity	Automated measurement	Yes
Simplicity	No requirement for special skills	Yes
High throughput	Max. 16 rats/30 min	Yes

第 2 章 変形性関節症モデルにおける動作時痛関連行動の検出と鎮痛薬感受性に関する検討

1. 序論

OA は軟骨や軟骨下骨を含む関節組織破壊の進行を伴う慢性疾患である。OA 患者の症状は主に罹患部の関節痛であるが、動作時にしばしば痛みが増悪し[53]、鎮痛薬の薬効も減弱することが報告されている[54]。こうした現象を説明するために、例えば、末梢神経上に発現する機械的受容体が動作時に活性化することで痛みを発生させるといった、動作時痛特異的な疼痛発症機序の存在が示唆されてきた[55]。そのため、動作時か安静時かによって関節痛の鎮痛薬に対する感受性が変わる可能性がある。こうした現象を踏まえ、非臨床試験において薬剤の鎮痛効果を評価する際には、安静時と動作時の両方の条件を考慮する必要がある。しかしながら、これまで両条件を考慮した鎮痛薬評価は実施されてきていない。

上記のように関節軟骨の減少や軟骨下骨の損傷、関節痛を伴う非臨床モデルとして monoiodoacetate (MIA) 誘発関節炎ラットを用いた研究が数多く報告されており[56–58]、特に OA 膝関節痛モデルとして広く利用されてきている[59,60]。OA 疼痛は熱等の外的刺激によって誘発されるものではなく自発的に生じる痛みであることから、OA 動物モデルにおいても自発痛を評価する必要がある。MIA により片側膝だけに変形性関節症様病態を発症させると動物の姿勢に左右間の不均衡が生じるが、この不均衡は動物が関節炎による痛みをかばうために生じると考えられ、姿勢の左右間不均衡を自発痛指標として用いることができる。従来 of 左右後肢荷重差測定 (weight bearing) 法では動物を狭い測定箱の中に入れて左右それぞれの後肢への荷重を測定する[58]が、動物を測定箱内に静止させて測定するため、安静時痛を評価していると考えられる。一方、歩様測定法はラットの歩行時の足跡を自動解析することで、後肢接地面積や足振り速度などの多様なパラメーター値 (Figure 11, Table 3) を算出して動物の歩様の左右間不均衡を検出する[61,62]。これは動物の歩行時の左右間不均衡を指標にしているため、左右後肢荷重差測定法と異なり動作 (歩行) 時痛を評価していると考えられる。

そこで著者は OA 疼痛モデル動物の安静時と歩行時の痛みに対する各種鎮痛薬の有効性についての検証を試みた。

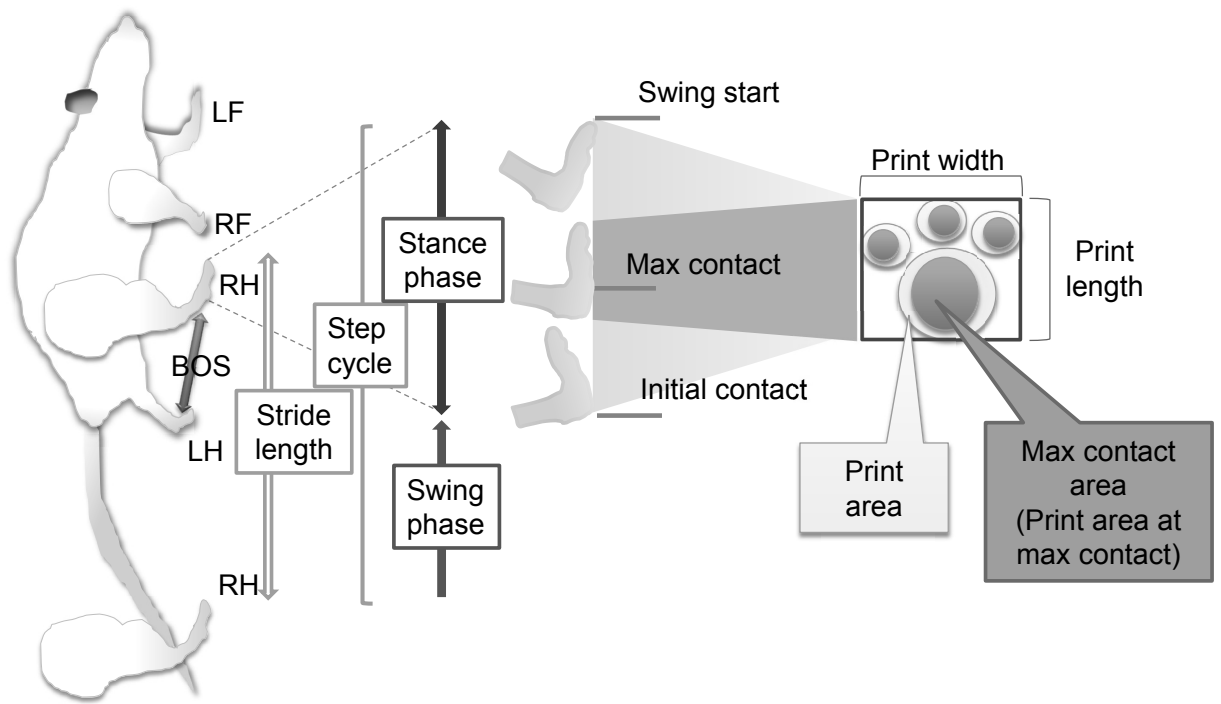


Figure 11. Glossary of gait

RF: right forepaw, LF: left forepaw, RH: right hind paw, LH: left hind paw, BOS: base of support

Table 3. Gait parameters

足跡面積に関するパラメーター	
Max contact area	最大接地時の足跡面積 (mm ²)
Print length	足跡(水平方向)の長さ (mm)
Print width	足跡(垂直方向)の幅 (mm)
Print area	足跡面積 (mm ²)
接地圧に関するパラメーター	
Max contact max intensity	最大接地時の最大蛍光強度 (0-255)
Max contact mean intensity	最大接地時の平均蛍光強度 (0-255)
Max intensity	足跡における最大蛍光強度 (0-255)
Min intensity	足跡における最小蛍光強度 (0-255)
Mean intensity	足跡における平均蛍光強度 (0-255)
時間に関するパラメーター	
Max intensity at	接地時間における最大蛍光強度到達所要時間の割合 (%)
Stands (Stance phase)	足がガラスプレートに接地している時間 (s)
Stand index	足がガラスプレートから離れる速度の指標
Max contact at	接地時間における最大接地到達所要時間の割合 (%)
Swing (Swing phase)	足がガラスプレートから離れている時間 (s)
Swing speed	足がガラスプレートから離れている際の実速度 (mm/s)
Step cycle	連続した同足の接地から次の接地までの時間 (s)
Duty cycle	Step cycleにおける接地時間が占める割合 (%)
Average speed	個体の平均歩行速度 (mm/s)
接地足の位置に関するパラメーター	
Stride length	連続する同足由来の足跡間の距離 (mm)
Base of support (BOS) hind paw	両後肢の平均歩幅 (mm)

2. 実験材料および実験方法

2-1. 使用動物

雄性 Sprague-Dawley (SD) ラットは、日本チャールズリバー株式会社（神奈川）から購入した。室温 $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$ 、湿度 $55\% \pm 10\%$ の一定条件下で、7:30 から 19:30 は室内点灯して明期とし、19:30 から翌 7:00 は消灯して暗期とする 12 時間明暗サイクルにて、水および固形飼料は自由に摂取させ、1 ケージ当り 5 匹ずつ飼育した。3 日間以上の馴化期間を経て、実験には 6 週齢（MIA 感作時）の動物を使用した。動物の取扱いは、アステラス製薬株式会社動物実験に関する指針に基づいて実施した。

2-2. 使用化合物

Diclofenac sodium は Sigma-Aldrich Co. LLC. から購入し、蒸留水に溶解して、鎮痛作用評価の 2 時間前に 3, 10 あるいは 30 mg/kg となるよう 5 mL/kg にて経口投与した。Morphine hydrochloride は武田薬品工業株式会社（大阪）から購入し、生理食塩水に溶解して、鎮痛作用評価の 1 時間前に 0.3, 1 あるいは 3 mg/kg となるよう 1 mL/kg にて皮下投与した。Tramadol hydrochloride は Sigma-Aldrich Co. LLC. から購入し、蒸留水に溶解して、鎮痛作用評価の 2 時間前に 10, 30 あるいは 100 mg/kg となるよう 5 mL/kg にて経口投与した。Duloxetine hydrochloride はアステラス製薬株式会社にて調製し、蒸留水に溶解して、鎮痛作用評価の 3 時間前に 10 あるいは 30 mg/kg となるよう 5 mL/kg にて経口投与した。Lidocaine hydrochloride は Sigma-Aldrich Co. LLC. から購入し、生理食塩水に溶解して鎮痛作用評価の 10 分前に 1, 3 あるいは 10 mg/膝となるよう術肢の膝関節内に 20 μL 注入した。なお各被験薬の投与量は塩係数からフリー体に換算して算出した。各被験薬の薬効評価は、既報[59,60,63–68]を参考にして実施した。

2-3. 膝関節 OA モデルの作成

3-4% の isoflurane (Mylan Inc.) 麻酔下にて右膝周辺部を剃毛し、70% ethanol にて消毒をした。既報[61, 62]を参考に、MIA sodium 塩 (Sigma-Aldrich Co. LLC.) を生理食塩水に溶解し、1, 1.5, あるいは 2 mg となるよう 50 μL を膝蓋腱から右膝関節内に投与した。Sham 処置群は、MIA の代わりに生理食塩水 50 μL を関節内投与した。

2-4. 体重負荷による左右後肢荷重差測定法

既報[58]に従って、左右後肢それぞれに対する荷重を incapitance tester (Linton Instrumentation, Norfolk, UK) を用いて測定した。具体的には、ラットを角度のついたプラスチック製の測定箱に収容し、約 5 分間馴化させた後、ラットの左右後肢をそれぞれ対応する左右の荷重測定板にのせ、各肢に懸る 5 秒間の平均荷重 (g) を測定した。正常肢の左荷重量と術肢である右荷重量の差を算出し、左右後肢荷重差 (g) とした。

2-5. 歩様測定法

既報[62,65]を基に若干の改変を加えた。使用した自動歩様解析システム Catwalk (Noldus Information Technology, Wageningen, Netherland) は発光ダイオード光源とガラス板の歩行路およびハイスピード高解像度カメラから構成され、ガラス板の上面にラット足裏が接すると、その接地圧に応じて輝度を変えて緑色にラットの足跡が発光する仕組みを有する。ガラス板の下部から発光したラット足跡を撮影し、その映像を専用ソフトウェア CatWalk XT version 9.0 software (Noldus Information Technology) にて自動解析することで歩様関連データを取得した。外部環境によってラットの歩行が妨げられないように、測定機器は黒いポリエチレンシートで覆い、防音実験室で試験を行った。

ラットがガラス板上を一定速度でまっすぐ歩行し、少なくとも各肢 3 足跡以上を記録できた場合のデータを採用することとして、途中で立ち止まったり、戻ったりした場合は上述の基準を満たす歩行データが得られるまで繰り返し測定した。得られた足跡データを解析することで、Table 3 に示すような各種パラメーター値を算出した。3 回の歩行で得られた各パラメーターの平均値を各個体の歩様データとした。Average speed および Base of support (BOS) hind paw 以外のパラメーターについては各肢について算出されることから、左後肢の値から術肢である右後肢の値を差し引いた値を各個体の後肢左右差 (Δ) とした。

2-6. 被験薬の薬効評価

体重負荷による左右後肢荷重差測定試験および歩様測定試験はそれぞれ異なるロットの病態ラットを作成して実施した。既報[68]に準じて、被験薬薬効評価は 1 mg の MIA を右膝関節内に投与後 3 週間に実施した。被験薬投与前日に荷重差測定試験あるいは歩様測定試験を実施して被験薬投与前の測定値をプレ値とした。MIA ラットは、各群のプレ値および体重平均値が均一となるよう、荷重差測定試験の場合は 1 群 8 匹、歩様測定試験の場合は 1 群 10 匹となるよう、各群に割り付けた。群構成は、1) 溶媒対照群および 2) 各被験薬低用量、3) 中用量あるいは 4) 高用量投与群の 4 群とした。なお、diclofenac および tramadol の後肢荷重差測定試験データは、既報[68]のデータを執筆者ならびに出版社の許諾を得て、二次使用した。

2-7. 統計学的処理

実験データは平均値 \pm 標準誤差で示した。統計的有意差の検定は、2 群間の比較には Student's t-test を、多群間の比較には多重性を考慮して一元分散分析 (one-way ANOVA) 後に Tukey's multiple comparison test を用い、 P 値が 0.05 未満の場合を統計的有意とした。また、全ての統計処理およびグラフ作成には GraphPad Prism version 5 (GraphPad Software Inc.) を用いて実施した。

被験薬の値は、溶媒投与 MIA ラット群および sham 群の平均値をそれぞれ 100% および 0% とした % コントロール値で示し、ED₅₀ 値は各歩様異常を 50% 改善する用量として GraphPad Prism version 5 により最小二乗法を用いて算出した。なお、被験薬の改善率は次式の通りに算出した。

$$\frac{(\text{溶媒投与 MIA 処置群の後肢左右差平均値} - \text{各個体の後肢左右差}) \times 100}{(\text{溶媒投与 MIA 処置群の後肢左右差平均値} - \text{sham 群の後肢左右差平均値})}$$

3. 実験結果

3-1. MIA 膝関節内投与の歩様に対する効果

始めに, MIA 1 mg 膝関節内投与による歩様変化を測定したところ, Δ Stand, Δ Stand index, Δ Max contact at, Δ Max contact area, Δ Print length, Δ Print width, Δ Print area, Δ Min intensity, Δ Swing, Δ Swing speed, Δ Duty cycle, Average speed および Base of support (BOS) hind paw において MIA 投与群で sham 群に対して有意な変化を認めた (Student t-test, $P < 0.05$)(Table 4). Figure 12 に代表的な足跡パターンを示す. 上記の MIA 投与群と sham 群間で有意な変化を認めた歩様パラメーターについて morphine 3 mg/kg 皮下投与に対する反応性を確認したところ, Δ Max contact area を始めとする足跡面積に関連するパラメーターのほか, 接地圧に関連する Δ Min intensity, 時間関連パラメーターである Δ Swing speed ならびに Δ Duty cycle において有意な改善が認められた (Student's t-test, $P < 0.05$)(Table 4). そこで, その後の被験薬評価には Δ Max contact area および Δ Swing speed を代表的な歩様パラメーターとして選択した.

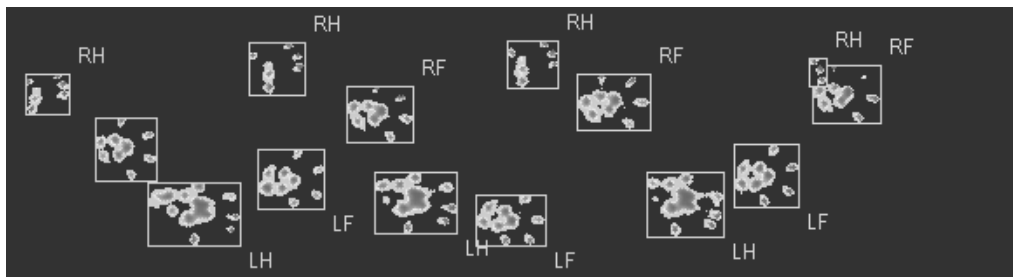
Table 4. Effect of MIA on various gait parameters in rats and the susceptibility of abnormal gait parameters to morphine in MIA rats.

Parameters	vs sham	vs morphine	Parameters	vs sham	vs morphine
Paw print-related parameters			Time-related parameters		
Δ Max contact area	$P < 0.0001$	$P = 0.0094$	Δ Max intensity at	$P = 0.61$	N/A
Δ Print length	$P < 0.0001$	$P = 0.023$	Δ Stand [Stance phase]	$P = 0.058$	N/A
Δ Print width	$P < 0.0001$	$P = 0.016$	Δ Stand index	$P = 0.0008$	$P = 0.17$
Δ Print area	$P < 0.0001$	$P = 0.0078$	Δ Max contact at	$P = 0.0049$	$P = 0.83$
Signal Intensity-related parameters			Δ Swing [Swing phase]	$P < 0.0001$	$P = 0.11$
Δ Max contact max intensity	$P = 0.14$	N/A	Δ Swing speed	$P = 0.0002$	$P = 0.021$
Δ Max contact mean intensity	$P = 0.74$	N/A	Δ Step cycle	$P = 0.97$	N/A
Δ Max intensity	$P = 0.050$	N/A	Δ Duty cycle	$P < 0.0001$	$P = 0.038$
Δ Min intensity	$P = 0.0012$	$P = 0.0075$	Average speed	$P = 0.028$	$P = 0.76$
Δ Mean intensity	$P = 0.44$	N/A	Paw position-related parameters		
			Δ Stride length	$P = 0.076$	N/A
			Base of support hind paw	$P = 0.070$	N/A

Injection of MIA at a dose of 1 mg/knee induced changes in various gait parameters in week 3 after the injection. Morphine was subcutaneously administered at 3 mg/kg 1h prior to measurement of parameters in week 3 after MIA injection.

“vs sham”, vehicle-treated MIA rats compared with sham rats (Student's t-test). “vs morphine”, vehicle-treated MIA rats compared with morphine-administered MIA rats (Student's t-test). N/A, not applicable

(A) MIA 1 mg i.a. into the knee of right hind limb



(B) Saline i.a. into the knee of right hind limb

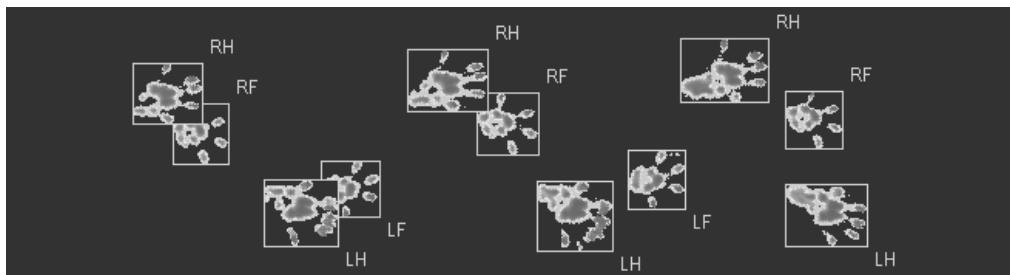


Figure 12. Representative images of the paw prints of OA model rat injected with 1 mg MIA (A) and sham control rat injected with saline (B) at 3 weeks after injection.

RF: right fore paw, LF: left fore paw, RH: right hind paw, LH: left hind paw

i.a.:intra-articular administration

3-2. 歩様測定法における morphine の鎮痛作用に対する MIA 用量の影響

MIA 1, 1.5 あるいは 2 mg を膝関節内投与後 3 週間に、溶媒である saline を皮下投与して歩様を測定したところ、全ての MIA 用量で sham 群と比べて有意な Δ Max contact area (それぞれ $P < 0.0001$, $P = 0.0018$ および $P = 0.0002$, Student's t-test) および Δ Swing speed (それぞれ $P = 0.0002$, $P < 0.0001$ および $P < 0.0001$) 両パラメーターの左右後肢不均衡を示した. 各 MIA 用量の条件下にて morphine 3 mg/kg を皮下投与した群においては、MIA 1 mg の場合のみ、溶媒投与群と比較して有意な Δ Max contact area ($P = 0.0097$) および Δ Swing speed ($P = 0.021$) の左右後肢不均衡の是正を認めた. また morphine の鎮痛作用は、MIA を 1.5 あるいは 2 mg と増量させると MIA 1 mg の場合と比べて減弱した (Figure 13A および B). 従ってその後の全ての被験薬評価には MIA 1 mg を用いることとした.

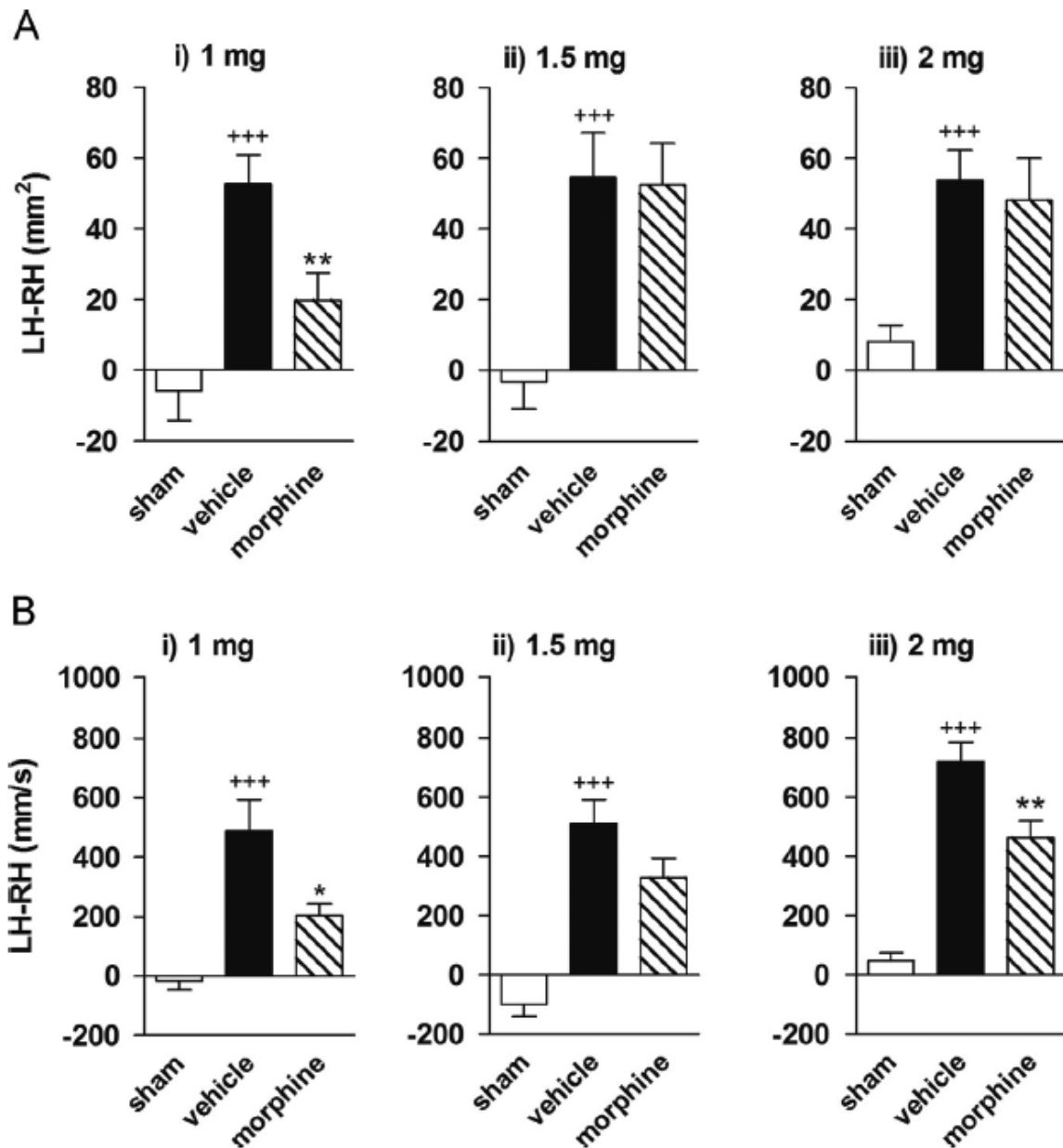


Figure 13. Effect of morphine in the gait paradigm in rats treated with MIA at different doses. Injection of MIA at doses of 1 (i), 1.5 (ii), and 2 (iii) mg/knee induced changes in Max contact area (A) and Swing speed (B) in week 3 after MIA injection. Morphine was subcutaneously administered at 3 mg/kg 1 h prior to measurement of parameters. ⁺⁺⁺ $P < 0.001$ versus sham rats (Student's t-test). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ versus vehicle-treated MIA rats (Student's t-test). All data are expressed as means \pm S.E.M. of 10 animals.

3-3. 左右後肢荷重差および歩様変化に対する各被験薬の鎮痛効果

MIA 1 mg 膝関節内投与による左右後肢荷重差および歩様変化 (Δ Max contact area および Δ Swing speed) に対する diclofenac, morphine, tramadol および duloxetine の薬効を評価した. 各 MIA 投与コントロール群を 100% とした場合の各投与群の値を Figure 14, 15, 16 および 17 に示した. 各投与量における薬効および 50% 薬効を示す被験薬用量 ED_{50} について Table 5 に示した. なお, 各被験薬はいずれの用量においてもラットに対して異常な行動を惹起させることはなかった.

Diclofenac は, 最大 30 mg/kg の経口投与において左右後肢荷重差 ($P = 0.065$, one-way ANOVA) あるいは歩様異常 (Δ Max contact area, $P = 0.22$, および Δ Swing speed, $P = 0.39$) のいずれに対しても統計的に有意な作用を示さなかった (Figure 14). なお, 後肢荷重差試験における溶媒投与 MIA ラット群および sham 群の平均値はそれぞれ 42.1 ± 2.6 g および -1.9 ± 2.9 g と溶媒投与 MIA ラット群および sham 群間で統計的に有意な差 ($P < 0.0001$, Student's t-test) を示し, 病態は成立していた. また, 歩様測定試験における溶媒投与 MIA ラット群および sham 群の Δ Max contact area 平均値は, それぞれ 44.7 ± 3.6 mm² および 9.1 ± 4.5 mm² ($P < 0.0001$), Δ Swing speed 平均値はそれぞれ 554.7 ± 63.1 mm/s および 174.7 ± 65.6 mm/s ($P = 0.0024$) といずれも溶媒投与 MIA ラット群および sham 群間で統計的に有意な差を示し, 病態は成立していた.

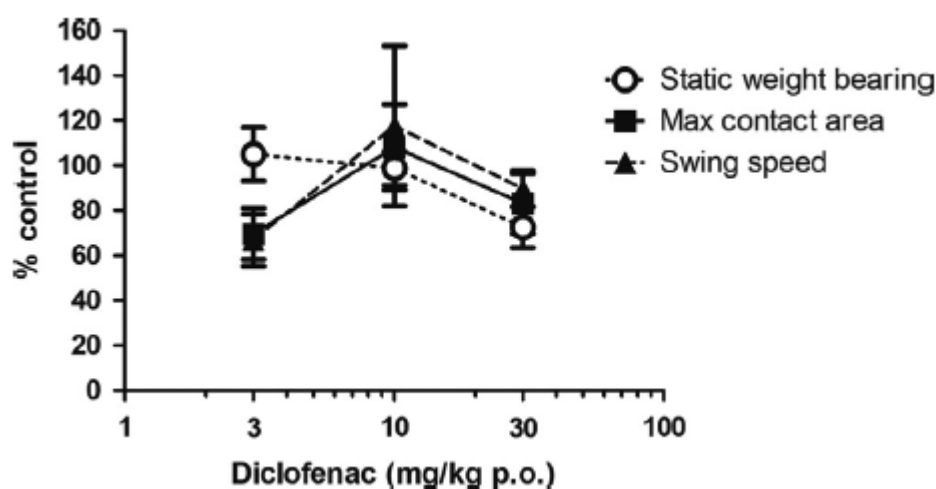


Figure 14. Effects of diclofenac on weight maldistribution in the weight bearing paradigm ($n = 8$ per group) and the max contact area and swing speed in the gait paradigm ($n = 10$ per group) in MIA-induced arthritic rats. Assessment of drugs was conducted in week 3 after intra-articular injection of MIA at 1 mg/knee. Diclofenac was orally administered 2 h prior to measurement of the gait parameters. All data are expressed as means \pm S.E.M. The data on weight bearing were calculated using published data (Yoshimi et al., 2010, J Pharmacol Exp Ther 334:955-963) with permission from the American Society for Pharmacology and Experimental Therapeutics.

Morphine は、統計的有意に左右後肢荷重差 ($P = 0.0058$, one-way ANOVA) および Δ Max contact area ($P = 0.016$) を改善した。しかしながら Δ Swing speed に対しては一元分散分析では統計的に有意な作用 ($P = 0.034$) を示したものの多重比較 (Tukey's multiple comparison test) による統計的有意な作用は認めなかった (Figure. 15). なお、1 mg/kg 投与時の左右後肢荷重差改善作用は、歩様異常改善作用に比べて高かった (Table 5). なお、左右後肢荷重差試験における溶媒投与 MIA ラット群および sham 群の平均値はそれぞれ 75.6 ± 9.7 g および -6.8 ± 3.8 g と溶媒投与 MIA ラット群および sham 群間で統計的に有意な差 ($P < 0.0001$, Student's t-test) を示し、病態は成立していた。また、歩様測定試験における溶媒投与 MIA ラット群および sham 群の Δ Max contact area 値はそれぞれ 52.5 ± 8.3 mm² および -6.0 ± 8.2 mm² ($P < 0.0001$), Δ Swing speed はそれぞれ 488.4 ± 104.8 mm/s および 14.8 ± 32.1 mm/s ($P = 0.0002$) であり、いずれも溶媒投与 MIA ラット群および sham 群間で統計的に有意な差を示し、病態は成立していた。

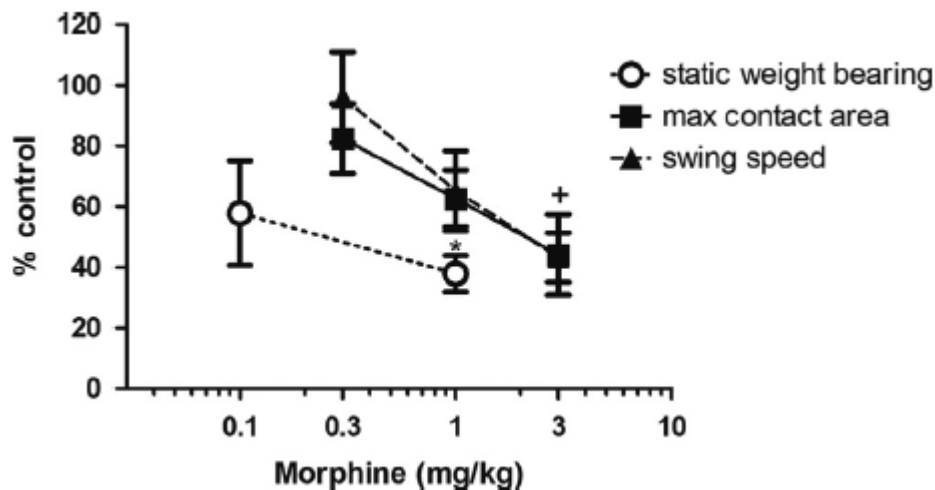


Figure 15. Effect of morphine on weight maldistribution in the weight bearing paradigm ($n = 7$ per group) and max contact area and swing speed in the gait paradigm ($n = 10$ per group) in MIA-induced arthritic rats. Tests were conducted in week 3 after intra-articular injection of MIA. Morphine was administered subcutaneously 1 h prior to measurement of the gait parameters. * $P < 0.05$ versus weight bearing in vehicle-treated rats; + $P < 0.05$ versus max contact area in vehicle-treated rats (one-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparison test). All data are expressed as means \pm S.E.M.

Tramadol は、統計的に有意に左右後肢荷重差 ($P < 0.001$, one-way ANOVA) および Δ Max contact area ($P = 0.018$) を改善した。しかしながら、 Δ Swing speed 変化に対して抑制傾向は示したものの統計的に有意な作用ではなかった ($P = 0.11$)(Figure. 16)。Tramadol 10 mg/kg の経口投与における左右後肢荷重差改善作用は、歩様異常改善作用に比べて高かった (Table 5)。なお、左右後肢荷重差試験における溶媒投与 MIA ラット群および sham 群の平均値はそれぞれ 44.5 ± 5.0 g および 0.2 ± 2.7 g であり、溶媒投与 MIA ラット群および sham 群間で統計的に有意な差 ($P < 0.0001$, Student's t-test) を示し、病態は成立していた。また、歩様測定試験における溶媒投与 MIA ラット群および sham 群の Δ Max contact area 平均値はそれぞれ 47.8 ± 13.1 mm² および 3.0 ± 8.8 mm² ($P = 0.016$)、 Δ Swing speed 平均値はそれぞれ 438.5 ± 128.2 mm/s および 27.5 ± 75.9 mm/s ($P = 0.015$) といずれも溶媒投与 MIA ラット群および sham 群間で統計的に有意な差を示し、病態は成立していた。

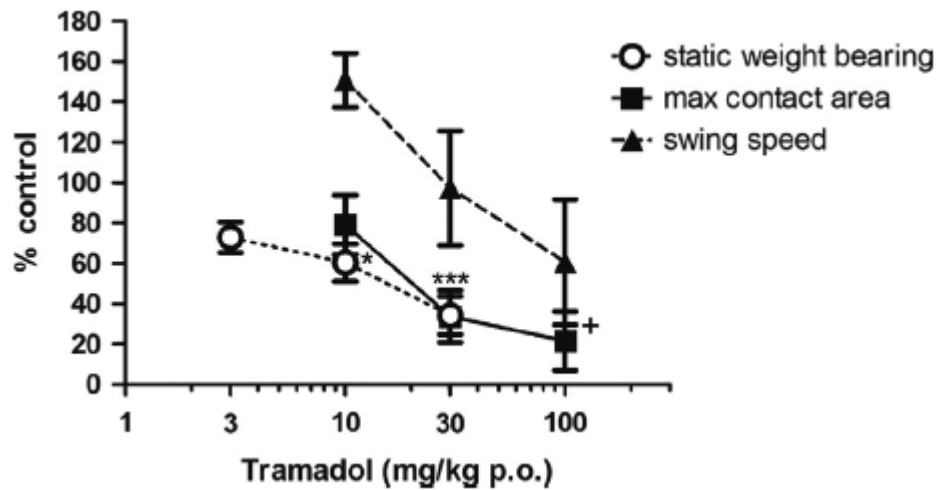


Figure 16. Effect of tramadol on weight maldistribution in the weight bearing paradigm ($n = 8$ per group) and the max contact area and swing speed in the gait paradigm ($n = 10$ per group) in MIA-induced arthritic rats. Tests were conducted in week 3 after intra-articular injection of MIA. Tramadol was orally administered 2 h prior to measurement of gait parameters. * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$ versus weight bearing vehicle-treated rats; + $P < 0.05$ versus the max contact area of vehicle-treated rats (one-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparison test). All data are expressed as means \pm S.E.M. The weight bearing data were calculated using published data (Yoshimi et al., 2010, J Pharmacol Exp Ther 334:955-963) with permission from American Society for Pharmacology and Experimental Therapeutics.

Duloxetine は、統計的有意に左右後肢荷重差を改善した ($P = 0.0039$, one-way ANOVA). しかしながら、本薬剤は歩様異常指標としての Δ Max contact area ($P = 0.87$) および Δ Swing speed ($P = 0.42$) に対しては統計的有意な作用を示さなかった (Figure. 17). なお、左右後肢荷重差試験における溶媒投与 MIA ラット群および sham 群の平均値はそれぞれ 45.6 ± 4.0 g および 1.3 ± 1.0 g であり、統計的に有意な差 ($P < 0.001$, Student's t-test) を示し、病態は成立していた. また、歩様測定試験における溶媒投与 MIA ラット群および sham 群の Δ Max contact area 平均値はそれぞれ 57.4 ± 7.1 mm² および -2.7 ± 5.1 mm² ($P < 0.0001$), Δ Swing speed はそれぞれ 659.2 ± 86.6 mm/s および 39.2 ± 37.2 mm/s ($P < 0.0001$) といずれも溶媒投与 MIA ラット群および sham 群間で統計的に有意な差を示し、病態は成立していた.

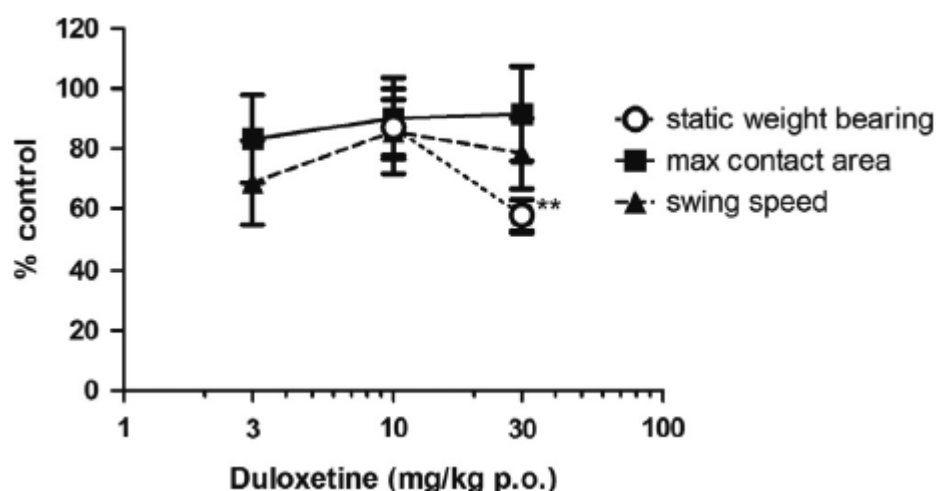


Figure 17. Effect of duloxetine on weight maldistribution in the weight bearing paradigm ($n = 8$ per group) and the max contact area and swing speed in the gait paradigm ($n = 10$ per group) in MIA-induced arthritic rats. Tests were conducted in week 3 following intra-articular injection of MIA. Duloxetine was administered orally 3 h prior to measurement of the gait parameters. ** $P < 0.01$ versus vehicle-treated rats (one-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparison test). All data are expressed as means \pm S.E.M.

Table 5. Summary of analgesic efficacy of drugs in the weight-bearing and gait paradigms in MIA-induced arthritic rats.

	Dose (mg/kg)	Weight bearing	Max contact area	Swing speed
Diclofenac	<i>ED₅₀ (95% CI), mg/kg</i>	N/A	N/A	N/A
% Improvement (mean ± SEM)	3, p.o.	N.S.	N.S.	N.S.
	10, p.o.	N.S.	N.S.	N.S.
	30, p.o.	N.S.	N.S.	N.S.
Morphine	<i>ED₅₀ (95% CI), mg/kg</i>	N/A	2.1 (0.81–5.4)	2.2 (1.1–4.5)
% Improvement (mean ± SEM)	0.1, s.c.	N.S.	N.S.	N.S.
	1, s.c.	62 ± 5.9 ^a	N.S.	N.S.
	3, s.c.	N.T.	56 ± 13 ^a	N.S.
Tramadol	<i>ED₅₀ (95% CI), mg/kg</i>	14 (7.2–27)	23 (11–46)	N/A
% Improvement (mean ± SEM)	10, p.o.	40 ± 9.4 ^a	N.S.	N.S.
	30, p.o.	66 ± 9.4 ^c	N.S.	N.S.
	100, p.o.	N.T.	78 ± 15 ^a	N.S.
Duloxetine	<i>ED₅₀ (95% CI), mg/kg</i>	N/A	N/A	N/A
% Improvement (mean ± SEM)	3, p.o.	N.T.	N.S.	N.S.
	10, p.o.	N.S.	N.S.	N.S.
	30, p.o.	42 ± 5.2 ^b	N.S.	N.S.

N/A, not applicable; N.T.; not tested; N.S., not significant compared with vehicle-treated MIA rats (one-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparison test); CI, confidence interval.

^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$, ^c $P < 0.001$ versus vehicle-treated rats (one-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparison test). The data on static weight bearing for tramadol and diclofenac were calculated using published data (Yoshimi et al., 2010, J.Pharmacol. Exp. Ther. 334: 955–963) with permission from the American Society for Pharmacology and Experimental Therapeutics.

3-4. 歩様異常に対する局所麻酔薬の薬効

MIA 1 mg 膝関節内投与 3 週間後のラットに対して、局所麻酔薬 lidocaine の膝関節内投与は有意に Δ Max contact area ($P = 0.040$, one-way ANOVA) および Δ Swing speed ($P = 0.029$) 両パラメーターの左右後肢不均衡を是正した (Figure 18). なお、溶媒投与 MIA ラット群および sham 群の Δ Max contact area 平均値はそれぞれ $57.0 \pm 6.9 \text{ mm}^2$ および $-4.5 \pm 3.9 \text{ mm}^2$ ($P < 0.0001$, Student's t-test), Δ Swing speed 平均値はそれぞれ $452.7 \pm 66.0 \text{ mm/s}$ および $13.2 \pm 36.5 \text{ mm/s}$ ($P < 0.0001$) といずれも統計的に有意な差を示し、病態は成立していた.

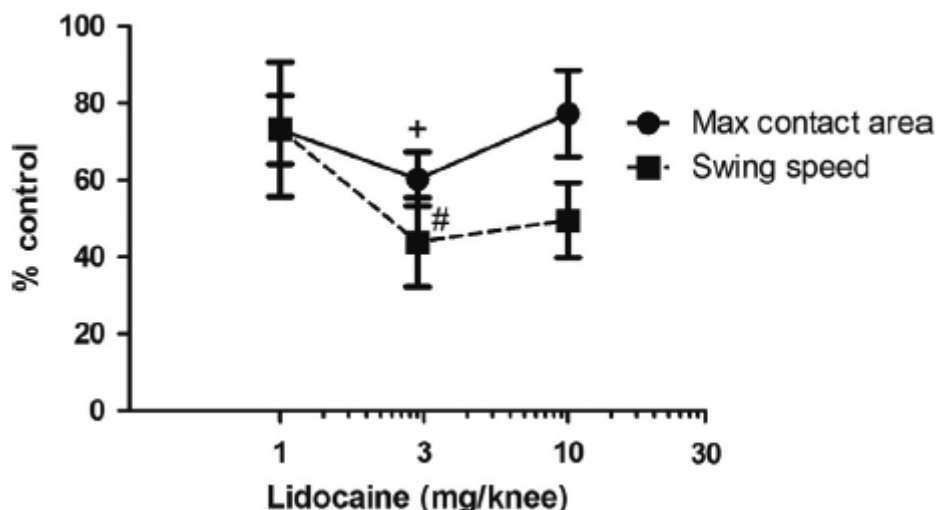


Figure 18. Effect of lidocaine on the max contact area and swing speed in the gait paradigm in MIA-induced arthritic rats ($n = 10$ per group). Tests were conducted in week 3 after intra-articular injection of MIA. Intra-articular injection of lidocaine was administered 10 min prior to measurement of the gait parameters. ⁺ $P < 0.05$ versus the max contact area of vehicle-treated rats; [#] $P < 0.05$ versus the swing speed of vehicle-treated rats (one-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparison test). All data are expressed as means \pm S.E.M. of 10 animals.

4. 考察

本章記載の研究では、静止時の安静時痛および歩行動作時に増悪する動作時痛といった OA 臨床症状[53]を反映する静止時および歩行時の疼痛関連行動を測定し、各種鎮痛薬の有効性について検証した。

体重負荷による左右後肢荷重差測定法は、静止時の痛みを測定する方法であり、MIA 投与によって痛みが生じている足を庇う結果として反対足への荷重が増加する現象を利用している。これは膝 OA 患者にも認められる現象である[70]。一方、歩様測定法は間接的に歩行動作時の痛みを測定する方法であり、MIA によって誘発された膝の痛みが歩行によって増悪するのを回避するための行動が歩様に反映されるとの仮定に基づいている。これは膝 OA 患者において歩行時に痛みが増悪する症状を反映する[71,72]。安静時痛および歩行時痛は OA 患者の生活の質 (QoL) に大きく影響するものであることから[73]、本章記載の研究では OA 動物モデルにおける両方の疼痛タイプを評価した。

OA における自発痛は VAS や、自発痛を含む疾患特異的尺度としての Western Ontario and McMaster 大学変形性関節症指数 (WOMAC) といった疼痛スコアで評価されてきている。これまで侵害刺激に対する回避反応を評価する方法が開発されてきたが、こうした手段は動作時あるいは安静時に関節にかかる負荷に伴う自発痛を評価するには不適切である。それ故 OA 動物モデルにおいても誘発痛ではなく、自発痛を評価する必要がある。本章記載の研究では、二つの歩様不均衡の指標が、膝関節における自発痛の程度を反映することを示した。OA 動物モデルにおいて自発痛を測定することは、より正確に OA 臨床症状を反映し、OA 鎮痛薬評価の臨床エンドポイントに一致することになる。

本研究では、異なる作用機序を有する各種鎮痛薬が MIA 誘発の歩様左右不均衡に対して異なる効果を有することを示した。非ステロイド性抗炎症薬 diclofenac は、体重負荷による左右後肢荷重差や、歩様異常に対して有意な作用を示さなかった。これまでの研究によると、MIA 誘発関節炎ラットにおいて、NSAID に対する反応性は投与時期により異なることが示唆されている。特に MIA 誘発関節炎惹起後早期（およそ MIA 投与後 2 週間）では、炎症が疼痛に寄与しており、NSAIDs に対して感受性を示す[60,67,74]が、一方で非炎症期には NSAIDs に対して抵抗性を示す[62,68,75]ことが報告されている。これまでの知見から類推される通り、diclofenac は MIA 投与後 3 週間の関節炎後期においては歩様異常に対する有意な薬効を示さず、この時期に認められる歩行時痛の主要因は非炎症性であることが示唆された。本結果は、ある患者層では OA 疼痛は NSAIDs に対して治療抵抗性を示す臨床知見と一致するものであり[76–78]、おそらく非 prostaglandin 経路によって疼痛が生じていることを示唆している。MIA 誘発関節炎モデルにおける疼痛が抗炎症薬に対して治療抵抗性を示す理由の一つに神経障害性疼痛の寄与が考えられるが、実際、膝関節への MIA 投与により DRG における AMP 依存的転写因子 ATF-3 の発現亢進が認められることが報告されている[64,66]。

μ -opioid 受容体アゴニストである強 opioid の morphine は中等度から重度の疼痛を緩和するために用いられる。本章記載の研究においても、morphine は鎮静作用を発現しない用量で静止時痛や歩行時痛両評価法において疼痛に伴う左右後肢不均

衡を有意に改善しており、OA 患者の疼痛治療における臨床有効性とも矛盾していない[79]. 同じく μ -opioid 受容体アゴニストであるが、親和性は morphine に比べて低い弱 opioid の tramadol は、加えて神経プレシナプスにおける serotonin/norepinephrine の再取り込みを抑制する SNRI 作用も有している[80]. Tramadol もまた静止時痛や歩行時痛両評価法において疼痛に伴う左右後肢不均衡を有意に改善しており、OA 患者の歩行時痛に対する鎮痛作用報告に一致している[81,82]. SNRI である duloxetine は体重負荷による左右後肢荷重不均衡に対して是正効果を示したものの、歩様異常に対する有意な効果は認められなかった. Duloxetine は近年骨格筋痛治療への適用が承認されているが、動作時痛に対する有効性については結論の一致を見ない様々な結果が報告されている[83,84]. 歩様異常に対する SNRI としての duloxetine が無効であったことを考慮すると、MIA 誘発関節炎ラットにおける tramadol の歩行時痛に対する有効性は μ -opioid 作用に基づいているのかもしれない.

Table 5 に示したように、両評価方法における各種鎮痛薬の ED₅₀ 値あるいは有効性を比較したところ、左右後肢荷重差試験に比べて歩様異常評価試験における有効性の方が一般的に低い傾向が認められた. 今回明らかとなった知見は、安静時の痛みであるか動作時の痛みであるかによって鎮痛薬に対する有効性が異なるとされる臨床知見と一致するものである[54]. 一つの可能性として、罹患部位における安静時痛と動作時痛の発現機序は異なるということがある[55]. 考え得るもう一つの理由として動作時には疼痛シグナルが増幅されており、疼痛発現機序に関わらず鎮痛効果発現のためにより高い用量を必要とする可能性がある. 動作が疼痛の鎮痛薬応答性にどのように影響しているのか明らかにするためにさらなる検討が必要である.

MIA 誘発関節炎ラットモデルにおいては、後肢握力測定法といった本研究とは異なる手法で動作時痛に対する鎮痛薬有効性を検証した報告がなされている[63]. 後肢握力測定法と本研究で用いた手法とはいくつかの異なる点がある. 後肢握力測定法では、実験者がラットを引っ張ることで後肢握力を測定している. 一方体重負荷による左右後肢荷重差測定法や歩様測定法では、疼痛忌避行動に基づいており、実験者による外的な負荷を動物に加える必要はない. Tramadol は後肢握力測定法においても本研究で用いた測定法においても有意な鎮痛作用は検出されているが、NSAIDs は後肢握力測定法でより感度良く鎮痛作用が検出されている. Duloxetine は中等度の鎮痛効果が後肢握力測定法により検出されており、本研究においても静止時痛評価結果は概ね一致するものの、歩行時痛評価結果は一致していない. Morphine の鎮痛作用を正確に測定することは後肢握力測定法では難しく、これは正常動物の握力を低下させる作用も有することによる[63]. 臨床エンドポイントに関連して後肢握力や後肢荷重、歩様等様々な評価指標を用いることは OA における痛みを理解する上で有用であり、より良い疼痛治療の開発にも貢献すると考えられる.

局所麻酔薬である lidocaine の関節内投与により、有意な歩様異常是正効果が認められた. 本結果は、膝 OA 患者においても lidocaine の関節内投与による有意な疼痛緩和作用が認められている臨床所見と一致する[72]. しかしながら、注意すべ

き点として、高用量の局所麻酔薬では感覚喪失を引き起こすためか歩様不均衡を完全に是正する効果は認められなかった。この限定的な歩様異常改善効果は一部鎮痛薬に感受性を示さない要因(例えば、関節の安定性、廃用性萎縮による筋力低下や関節変形等)が寄与している可能性もある。本章記載の研究において、著者は MIA を 1 mg 以上投与した場合に歩様の左右不均衡が生じることを確認している。MIA 1 mg における歩様の左右不均衡は morphine 3 mg/kg に対して有意な改善を示したが、MIA 1.5 mg 以上の条件では morphine に対する感受性は低下した。本結果は、MIA 1 mg が歩様変化や体重負荷による左右後肢荷重差測定に基づく鎮痛薬評価に適することを示唆するものである[74]。病理組織学的解析[69,74]によると MIA 1.5 mg 以上では重篤な関節変形が生じており、鎮痛薬に対する応答性低下を引き起こしている可能性が示唆される。

本章では、安静時と歩行時の自発痛について、それぞれ体重負荷による左右後肢荷重差測定法および歩様測定法を用いて精査した。各種異なる作用機序を有する鎮痛薬を評価した結果、体重負荷による左右後肢荷重差の方が歩様不均衡よりも鎮痛薬有効性が高いことが明らかになった。また μ -opioid 受容体アゴニストは歩様変化測定系において非 opioid 系鎮痛薬に比べて高い有効性を示すことが明らかとなった。非臨床疼痛モデルの安静時ならびに動作時の両疼痛に対する被験薬の鎮痛効果を評価することは、OA 患者における臨床有効性をより精度良く予測し得る可能性がある。

第 3 章 変形性関節症モデルにおける動作時痛関連行動に対する抗 β -NGF 抗体の薬理作用の検討

1. 序論

OA 患者はしばしば安静時の痛みに加えて動作時に痛みが増悪することを経験する[53]. 動作時に痛みが増悪することで, OA 患者の活動は制限され, QoL は著しく低下しており, 動作時痛を抑制することの意義は大きい. しかしながら, 現行の治療薬は安静時痛と動作時痛に対する有効性は異なっており[54,85,86], 動作時痛に対する有効性は十分とは言えない状況にある. 前章では, 静止時痛と動作時痛に対する各種鎮痛薬の有効性の違いについて動物モデルを用いて検証し, 動作時痛に対して opioid 系薬剤が一定の有効性を示すことを明らかにした. ただし, 臨床現場においては安全性の問題[12,87]から, opioid 系薬剤の鎮痛作用が十分に発揮されているとは言い難い. そのため, 動作時痛を効果的に抑制する鎮痛薬のアンメットメディカルニーズは大きく, 製薬会社各社は OA 疼痛に対する新しい鎮痛薬の開発に注力している. 注目すべき点としては, 近年, β サブタイプの神経成長因子 (β -NGF) に対する抗体の臨床試験が, OA 疼痛を適応として複数実施されて顕著な有効性を示しており, その一つである tanezumab は安静時痛のみならず歩行時といった動作時痛に対して著明かつ持続的な鎮痛作用を示すことが報告されている[13,14,88].

NGF は α , β , γ の 3 種のサブユニット複合体として産生されるが, このうちの分子量 13kDa の小さな分泌型ポリペプチドである β -NGF が serine protease 活性を有する γ サブユニットにその N 末端を切断されて二量体となることで, 対象となる神経の成長, 維持・生存に重要な役割を持つ[89,90]. β -NGF の生理的機能は β -NGF に対して親和性の高い tyrosine kinase 型受容体である TrkA 受容体と低親和性の p75 を介して発現されるとされる. TrkA 受容体はマイネルト基底核や末梢神経[91]の他, 単球[92]や軟骨細胞[93]上での発現が認められているが, 特に痛みとの関連においては, β -NGF が感覚神経終末に発現する TrkA 受容体に結合して DRG へ逆行輸送されることによって, 細胞表面の侵害受容に関連する受容体やチャネルの発現を増強して, 神経を感作することが報告されている[94,95]. 以上のように β -NGF はヒトを始めとする哺乳動物において侵害性疼痛に非常に重要な役割を担っていることが報告されている[96]. ヒトにおいて TrkA 受容体遺伝子の変異は, 先天性無痛症を引き起こす[97]. β -NGF の OA 病態との関連性については, β -NGF 発現が OA 患者由来の軟骨細胞や滑膜線維芽細胞で亢進していることが報告されている[98,99]. 軟骨細胞での β -NGF の発現やタンパク質遊離は, 炎症性メディエーターのみならず機械性刺激によっても引き起こされる[100].

本章では, 臨床試験で認められている抗 β -NGF モノクローナル抗体の鎮痛作用が MIA 誘発関節炎動物モデルにおいても再現し得るか, 動作時痛指標としての歩様不均衡, 炎症および関節破壊に対する薬効について検証を試みた. 第二章でも使用した MIA 誘発関節炎動物モデルは膝関節に MIA が注入されることで著しい関

節破壊を引き起こしており、重篤な痛みを呈する後期 OA 患者を模しているとされる[101]. 本モデルは MIA 投与 2 週間以内の早期には NSAID に対して感受性を示すが、MIA 投与後 3 週間以上の後期には耐性を示す[65,68,102]. 臨床上、NSAID 抵抗性の OA 疼痛は OA 治療の重要課題となっている[76–78]ことから、本章記載の研究においても主に MIA 投与後 3 週間に鎮痛効果の検証試験を実施した.

2. 実験材料および実験方法

2-1. 使用動物

雄性 Sprague-Dawley (SD) ラットは、日本チャールズリバー株式会社から購入した。室温 $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$ 、湿度 $55\% \pm 10\%$ の一定条件下で、7:30 から 19:30 は室内点灯して明期とし、19:30 から翌 7:00 は消灯して暗期とした 12 時間明暗サイクルにて、水および固形飼料は自由に摂取させ、1 ケージ当り 5 匹ずつで飼育した。3 日間以上の馴化期間を経て、実験には 6 週齢 (MIA 感作時) の動物を使用した。動物の取扱いは、アステラス製薬株式会社動物実験に関する指針に基づいて実施した。

2-2. 使用化合物

ヒト抗 β -NGF immunoglobulin 抗体 (IgG) AS2886401-00 は既報[103]を参考にして安定的にチャイニーズハムスター卵巣 (CHO) 細胞に発現させた。Glutamine synthase ベクター pEE12.4 および pEE6.4 (Lonza Group Ltd., Basel, Switzerland) を発現ベクターとして目的遺伝子を CHO 細胞に導入した。細胞は CD CHO 培地 (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) にて培養した。抗 β -NGF 抗体は培養上清から精製してリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) に溶解し、0.1, 0.3 あるいは 1 mg/kg となるよう投与液量 1 mL/kg にてラットの尾静脈内に投与した。

2-3. ラット β -NGF に対する抗体結合確認試験

PBS に溶解した rat β -NGF (R&D Systems, Inc., Minneapolis, MN, USA) を 10ng ずつ 384 ウェルプレート (MaxisorpTM surface clear plate, Thermo Fisher Scientific Inc.) のウェル内に加えて 4°C にて一晚コートした。プレートは各試薬を加えて反応させる毎に Tween20 含有 Tris 緩衝生理食塩水 (TBST; pH 7.4, 20 mM Tris, 150 mM NaCl, 0.05% Tween 20) にて 3 回ずつ洗浄した。20% Blocking One/TBST 溶液 (ナカライテスク株式会社, 京都) 50 μL を各ウェルに加えて室温にて 1 時間ブロッキングした後、5% Blocking One/TBST 溶液に溶解した AS2886401-00 あるいはアイソタイプ・コントロール IgG を最終濃度が 0.001 から 3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ になるよう 20 μL ずつ各ウェルに加えて室温にて 1 時間反応させた。その後 5% Blocking One/TBST にて 500 倍に希釈した horseradish peroxidase (HRP) 結合ヤギ抗ヒト κ 抗体 (SouthernBiotech, Birmingham, AL, USA) を 20 μL ずつ各ウェルに加えて室温にて 1 時間反応させた。最後に 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine 基質液を (Dako, Glostrup, Denmark) 40 μL ずつ各ウェルに加えて室温にて 10 分間反応させ、1 M 硫酸 (和光純薬工業株式会社, 大阪) を添加して反応停止させた。450 nm における各ウェルの吸光度をマイクロプレートリーダーにて測定した。

2-4. TrkA 受容体発現細胞を用いた β -NGF 誘発細胞内 Ca 流入に対する阻害作用確認試験

ヒトメラノーマおよび胎児脳由来 cDNA ライブラリーからクローニングしたヒト TrkA 受容体 cDNA を pCDNA3.1-V5-His-topo 発現ベクター (Thermo Fisher Scientific Inc.) を用いてヒト胎児由来腎臓 (HEK) 293 細胞に遺伝子導入させること

で、ヒト TrkA 受容体発現細胞を樹立した。TrkA 受容体発現 HEK293 細胞は 10% ウシ胎児血清 (FBS), 100 U/mL streptomycin・100 µg/mL penicillin (Sigma-Aldrich Co. LLC.) および 200 µg/mL G418 (ナカライテスク株式会社) 含有ダルベッコ改変イーグル培地 (DMEM)(Thermo Fisher Scientific Inc.) 内で 37 °C, 5% CO₂ 条件下で培養した。

ヒト TrkA 受容体発現 HEK293 細胞を 2×10^4 個となるよう 96 ウェル poly-D-lysine コートプレート (Becton, Dickinson and Company) の各ウェルに 100 µL ずつ播種し、一晚培養した。測定当日、細胞を 20 mM HEPES pH 7.4, 0.1% ウシ血清 albumin (BSA), 2.5 mM probenecid (Sigma-Aldrich Co. LLC.) および 1.55 µM Fluo-4 AM Ca²⁺ 指示薬 (株式会社同仁堂研究所, 熊本) を含むハンクス平衡塩溶液内で 37 °C, 5% CO₂ 条件下にて 1 時間培養した。その後、細胞を Ca²⁺ 指示薬を含まない上記ハンクス平衡塩溶液 200 µL にて 2 回洗浄し、150 µL の同緩衝液を各ウェルに加えた後、プレートを蛍光イメージングプレートリーダー (FLIPR) TETRA (モレキュラーデバイス ジャパン株式会社, 東京) にセットした。AS2886401-00 およびアイソタイプ・コントロール IgG を 40 あるいは 150 ng/mL の rat β-NGF と 30 分間反応させた混合液を 50 µL ずつ FLIPR にて各ウェルに添加した。抗体/β-NGF 混合液添加直後からの蛍光強度の変化を経時的にモニターし、最大蛍光強度を記録した。

β-NGF のみを添加した場合の蛍光強度平均値を 100%, 緩衝液のみを添加した場合を 0% とし、β-NGF と各抗体を添加した場合の % コントロール値を算出し、濃度-阻害曲線を示した。β-NGF 濃度依存 Ca²⁺ 流入曲線ならびに抗体濃度-阻害曲線は GraphPad Prism[®] version 5 を用いて非線形回帰曲線にて算出した。

2-5. 血漿中 AS2886401-00 濃度の測定

AS2886401-00 0.003, 0.03 あるいは 0.3 mg/kg (n = 3) を静脈内投与後の健常ラットから、AS2886401-00 投与後 15 分間, 24 時間, 3 日および 14 日に heparin 存在下にて尾静脈から採血して血漿を得た。ラット血漿中の AS2886401-00 は 2-3 項に記載した enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) 法に準じて検出した。その際に 5% Blocking One/TBST にて 5,000 倍に希釈した HRP 結合抗ヒト IgG 抗体 (Dako, Glostrup, Denmark) を HRP 結合ヤギ抗ヒト κ 抗体の代わりに使用した。検量線は AS2886401-00 を健常ラット血漿に溶解した 0.003 から 10 µg/mL までの 3 倍希釈列を作成して定量した。

2-6. 膝関節 OA モデルの作成

第二章記載の方法に準じて作成した。

2-7. 歩様測定法

第二章記載の方法に準じて実施した。

2-8. 関節痛に対する AS2886401-00 の鎮痛効果の経時的変化

ラットを各群の体重平均値が均一となるよう MIA 投与群と sham 群とに割り付けた。MIA 投与後 2 日に歩様変化を測定し、被験薬処置前の各個体のプレ値を得た。MIA 投与ラットは、各群のプレ値および体重の平均値が均一となるよう、statistical analysis system (SAS) ソフトウェア (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) を使用して AS2886401-00 0.1, 0.3 あるいは 1 mg/kg 静脈内投与群および溶媒投与群の 4 群 (各群 n=12) に割り付けた。MIA 投与後 3 日に、AS2886401-00 あるいは溶媒を静脈内投与した。Sham 群には同様に溶媒を投与した。薬効評価としての歩様測定は、MIA 投与後 4, 6, 10, 14, 17, 21, 24, 31 および 35 日に実施した。なお、0.3 mg/kg 投与群の 1 例については、薬効に起因しないと思われる健康状態不良となったために除外した。

2-9. AS2886401-00 の鎮痛効果に対する投与タイミングの影響

ラットを各群の体重平均値が均一となるよう MIA 投与群と sham 群とに割り付けた。AS2886401-00 投与一日前に歩様変化を測定し、被験薬処置前の各個体のプレ値を得た。MIA 投与ラットは、各群のプレ値および体重の平均値が均一となるよう、SAS 統計解析ソフトウェアを用いて、AS2886401-00 0.1, 0.3 あるいは 1 mg/kg 静脈内投与群および溶媒投与群の 4 群 (各群 n = 10) に割り付けた。AS2886401-00 あるいは溶媒を歩様による薬効評価の 1 時間, 24 時間, 7 日あるいは 18 日前に静脈内投与した。Sham 群には同様に溶媒を投与した。薬効評価としての歩様測定は、MIA 投与後 3 週間におこなった。なお、被験薬投与後 18 日の薬効評価については、2-8 項で得られた MIA 投与後 21 日の結果を再解析することにより、データを得た。

2-10. 膝関節浮腫の測定

2-8 項記載の経時的変化測定最終日 (MIA 投与後 35 日)、すなわち AS2886401-00 投与後 32 日に、膝関節の浮腫を既報[60]に準じて測定した。具体的には、溶媒あるいは被験薬を投与した MIA 投与群各 7 匹、sham 群各 5 匹を無作為に選択し、ラットの膝関節の直径をデジタルノギス (株式会社ミットヨ、神奈川) にて測定した。術肢である右膝関節の直径から、正常肢である左膝関節の直径を差し引いた値を浮腫による増加とした。

2-11. 膝関節損傷度の評価

2-8 項記載の経時的変化測定最終日 (MIA 投与後 35 日)、すなわち AS2886401-00 投与後 32 日に、脛骨頭の損傷度をスコア化した。具体的には、ラットを二酸化炭素吸入により安楽死させ、右後肢脛骨を単離後 10% formalin 緩衝液 (和光純薬工業株式会社) にて固定した。既報[69]に従って、損傷度合を次の 0 から 4 までの 5 段階の基準で目視観察下での盲検にてスコア化した。0; 正常, 1; 粗面, 2; 中等度の軟骨表面の損傷, 3; 重度の軟骨下骨損傷, 4; 重度の軟骨下骨損傷および骨棘の形成。

なお、二人の独立した観察者によりスコア評価した平均値を各脛骨頭の損傷スコアとした。

2-12. 統計学的処理

実験データは平均値 ± 標準偏差 (S.D.) で示した。統計的有意差の検定は、パラメトリック値の場合、2 群間の比較には Student's t-test を、多群間の比較には多重性を考慮して Dunnett's multiple comparison test を用いた。また、全ての統計処理およびグラフ作成には GraphPad Prism version 5 を用いて実施した。

経時的変化の測定試験においては、two-way repeated measures of ANOVA test を用いて、全測定期間における歩様不均衡に対する AS2886401-00 投与の影響について検定を行った。なお、MIA 投与後 35 日の時点で、溶媒投与群に対する AS2886401-00 の効果について Dunnett's multiple comparison test を用いて比較した。ノンパラメトリック値の場合、2 群間の比較には Wilcoxon rank sum test を、多群間の比較には Kruskal-Wallis test にて検定後に Dunn's multiple comparison test を実施した。いずれの検定においても *P* 値が 0.05 未満の場合を統計的有意とした。なお、歩様測定試験における被験薬の改善率は次式の通りに算出した。

$$\frac{(\text{溶媒投与 MIA 処置群の後肢左右差平均値} - \text{各個体の後肢左右差}) \times 100}{\div (\text{溶媒投与 MIA 処置群の後肢左右差平均値} - \text{sham 群の後肢左右差平均値})}$$

3. 実験結果

3-1. ラット β -NGF 機能に対する AS2886401-00 の影響

始めに AS2886401-00 のラット β -NGF に対する結合活性について ELISA 法に基づいて評価を行った。結合に伴うシグナルは、AS2886401-00 の濃度依存的に増加し、AS2886401-00 のラット β -NGF に対する結合活性を認めた (Figure 19)。

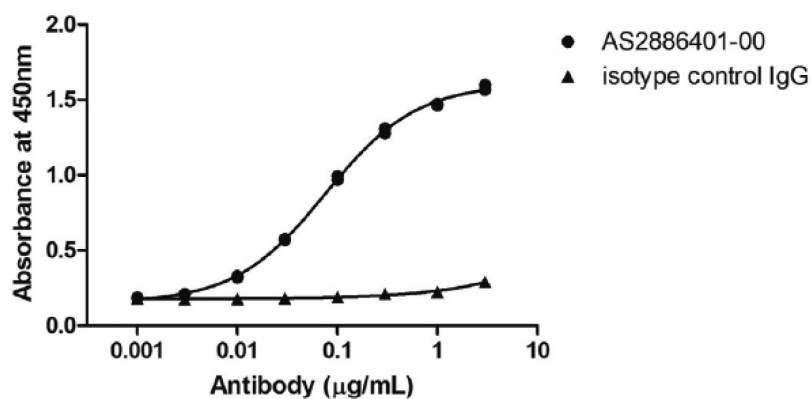


Figure 19. Confirmation of binding of AS2886401-00 to rat β -NGF. Binding activities of AS2886401-00 and isotype control IgG to rat β -NGF detected using ELISA-based assay. Data are presented as each replicate from duplicate experiments.

続いて、ラット β -NGF 機能に対する AS2886401-00 の阻害活性について検証を行った。著者はまずラット β -NGF に応答して細胞内 Ca^{2+} 流入を引き起こすヒト TrkA 受容体発現細胞を構築し、ラット β -NGF が濃度依存的に細胞内 Ca^{2+} 濃度を上昇させることを確認した (Figure 20A)。このラット β -NGF 誘発の細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇に対する AS2886401-00 の影響について評価したところ、AS2886401-00 は濃度依存的に、 β -NGF によって誘発される細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇を抑制し、0.1 あるいは 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度でそれぞれ β -NGF 40 あるいは 150 ng/mL の作用を完全に抑制した (Figure 20B)。

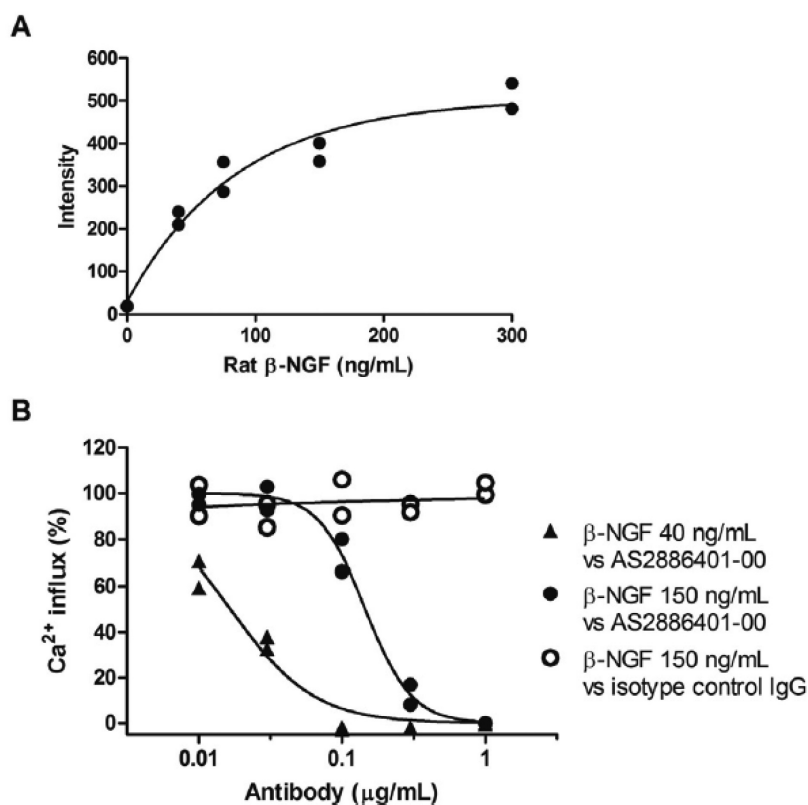


Figure 20. Increasing cytosolic calcium influx by rat β -NGF and inhibition by AS2886401-00. Cytosolic calcium concentration increase in human TrkA expressed in HEK293 cells by rat β -NGF detected using FLIPR (A). Cytosolic calcium influx inhibition by AS2886401-00, with 40 and 150 ng/mL rat β -NGF used as stimulator (B). Antibody concentration range from 0.01 to 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Data are presented as each replicate from duplicate experiments.

3-2. AS2886401-00 の体内動態解析

次に, AS2886401-00 を静脈内に単回投与した場合の, 正常ラットにおける血中動態について測定した. 血漿中の AS2886401-00 濃度は投与量に依存して増加し, 0.3 mg/kg を投与した場合で 0.1 $\mu\text{g/mL}$ 以上の濃度が 14 日以上検出された (Figure 21). 本系における AS2886401-00 の検出限界濃度は 0.01 $\mu\text{g/mL}$ 未満であり, AS2886401-00 を 0.003 mg/kg および 0.03 mg/kg 投与した場合の 0.01 $\mu\text{g/mL}$ 以上の血漿中持続時間はそれぞれ 15 分および 4 日間であった.

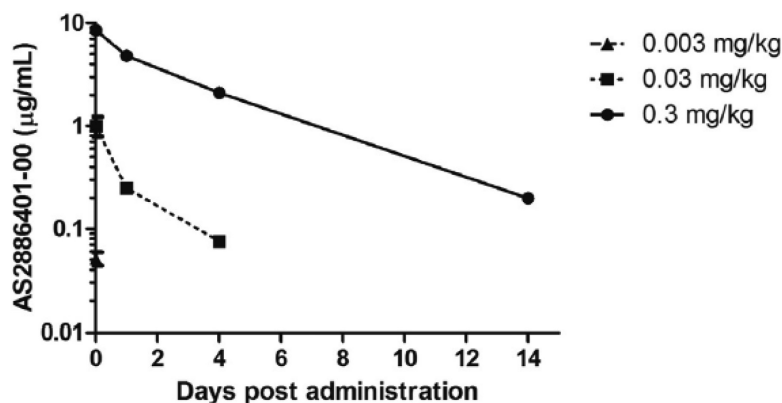


Figure 21. In vivo pharmacokinetic profile of AS2886401-00. AS2886401-00 was intravenously administered to rats, and plasma samples were drawn at indicated time points. Plasma concentration of AS2886401-00 was measured using an ELISA-based method. The points on each graph represent the mean \pm S.D. for three rats.

3-3. AS2886401-00 の鎮痛作用の経時的変化

MIA を投与することにより, sham 群に比べて有意な $\Delta\text{Max contact area}$ (Figure 22A, $P < 0.0001$, two-way repeated measures of ANOVA) および $\Delta\text{Swing speed}$ (Figure 22B, $P < 0.0001$) といった歩様パラメーターにおける持続的な左右後肢不均衡を認めた. このとき MIA 投与 3 日後に AS2886401-00 を投与した群では, 溶媒投与群に比べて有意な $\Delta\text{Max contact area}$ ($P < 0.0001$, two-way repeated measures of ANOVA) および $\Delta\text{Swing speed}$ ($P < 0.0001$) の改善を認めた. 本効果は MIA 投与後 35 日 (すなわち AS2886401-00 投与 32 日後) においても, 0.3 および 1 mg/kg 投与群において有意な改善作用を示していた (Figure 22A および B, $P < 0.0001$, Dunnett's multiple comparison test). なお, AS2886401-00 投与によるラットの行動異常はすべての投与量において認められなかった.

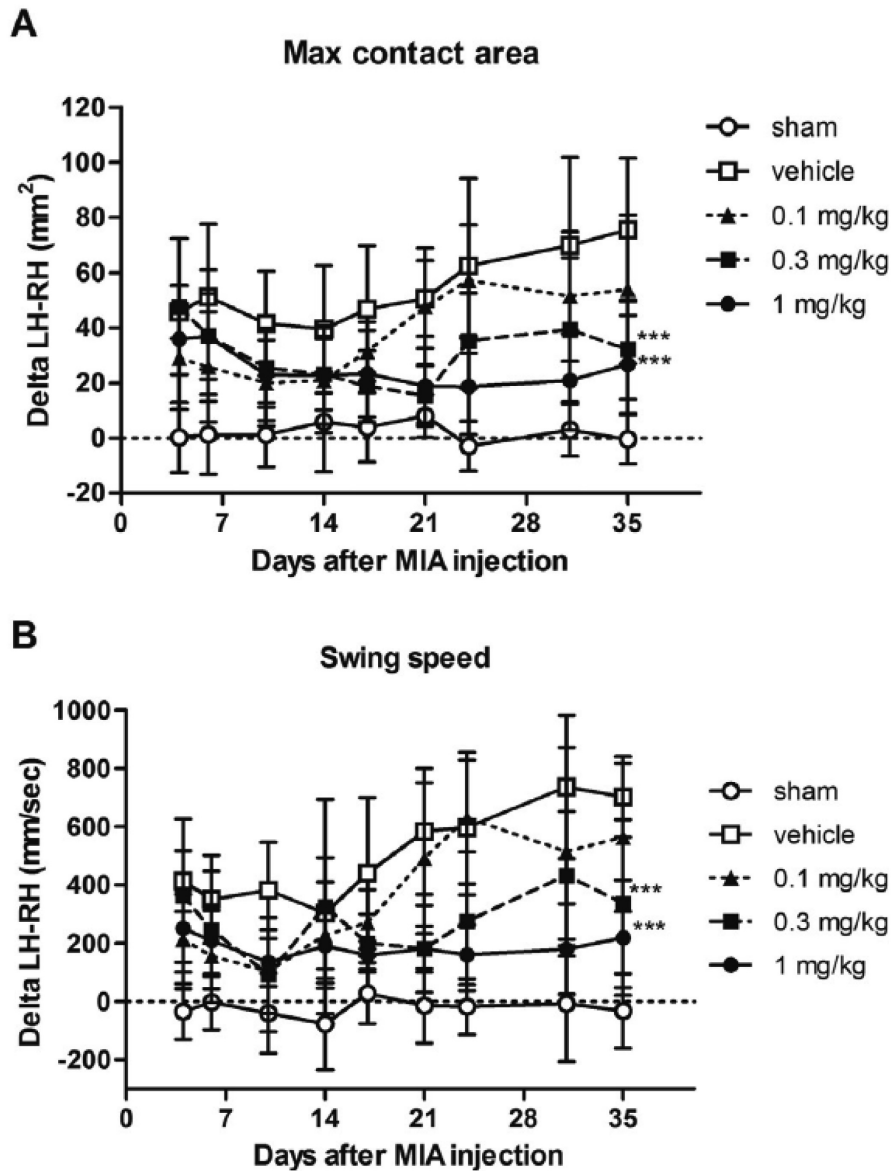


Figure 22. Long-lasting effect of a single administration of AS2886401-00 on the imbalance in max contact area (A) and swing speed (B) measured by gait analysis paradigm in MIA-induced arthritis rats. Imbalances in max contact area and swing speed immediately developed following MIA administration and were sustained during the experimental period (open squares). AS2886401-00 was intravenously administered on Day 3 post-MIA administration. Data represent the difference between ipsilateral and contralateral hind limb and are presented as mean \pm S.D. ($n = 12$ for 0.1 or 1 mg/kg of AS2886401-00, $n = 11$ for 0.3 mg/kg of AS2886401-00, $n = 12$ for vehicle and $n = 10$ for sham). Statistical comparison was performed on Day 35.

*** $P < 0.001$ compared to corresponding vehicle (Dunnett's multiple comparison test).

3-4. AS2886401-00 の鎮痛作用に対する投与時期の影響

歩様評価の 1 時間前に AS2886401-00 を投与したところ、MIA 投与による Δ Max contact area ($P = 0.43$, one-way ANOVA) および Δ Swing speed ($P = 0.14$) のいずれの歩様変化に対する改善効果も認められなかった (Figure 23A および E). これは歩様評価の 24 時間前に AS2886401-00 を投与した場合においても Δ Max contact area ($P = 0.13$) および Δ Swing speed ($P = 0.12$) 変化に対する有効性は認められず、同様な結果であった (Figure 23B および F). 一方、7 日前に AS2886401-00 を投与した場合には、溶媒投与群に比べて有意な Δ Max contact area の改善が認められ ($P = 0.013$), その時の最大改善率は $54\% \pm 32\%$ であった. 同様に Δ Swing speed についても改善効果を示し ($P = 0.0035$), 最大改善率は $56\% \pm 14\%$ であった (Figure 23C および G). 歩様評価の 18 日前に投与した場合にも有意な Δ Max contact area の改善が認められ ($P < 0.0001$), 最大改善率は $82\% \pm 27\%$ であった. 同様に Δ Swing speed においても有意な改善効果を示し ($P < 0.0001$), 最大改善率は $67\% \pm 13\%$ であった (Figure 23D および H). なお, AS2886401-00 の歩様評価 18 日前の結果は、先に記述した、経時的変化を評価した試験 (Figure 23A および B) における MIA 投与後 21 日のデータを再解析したものである.

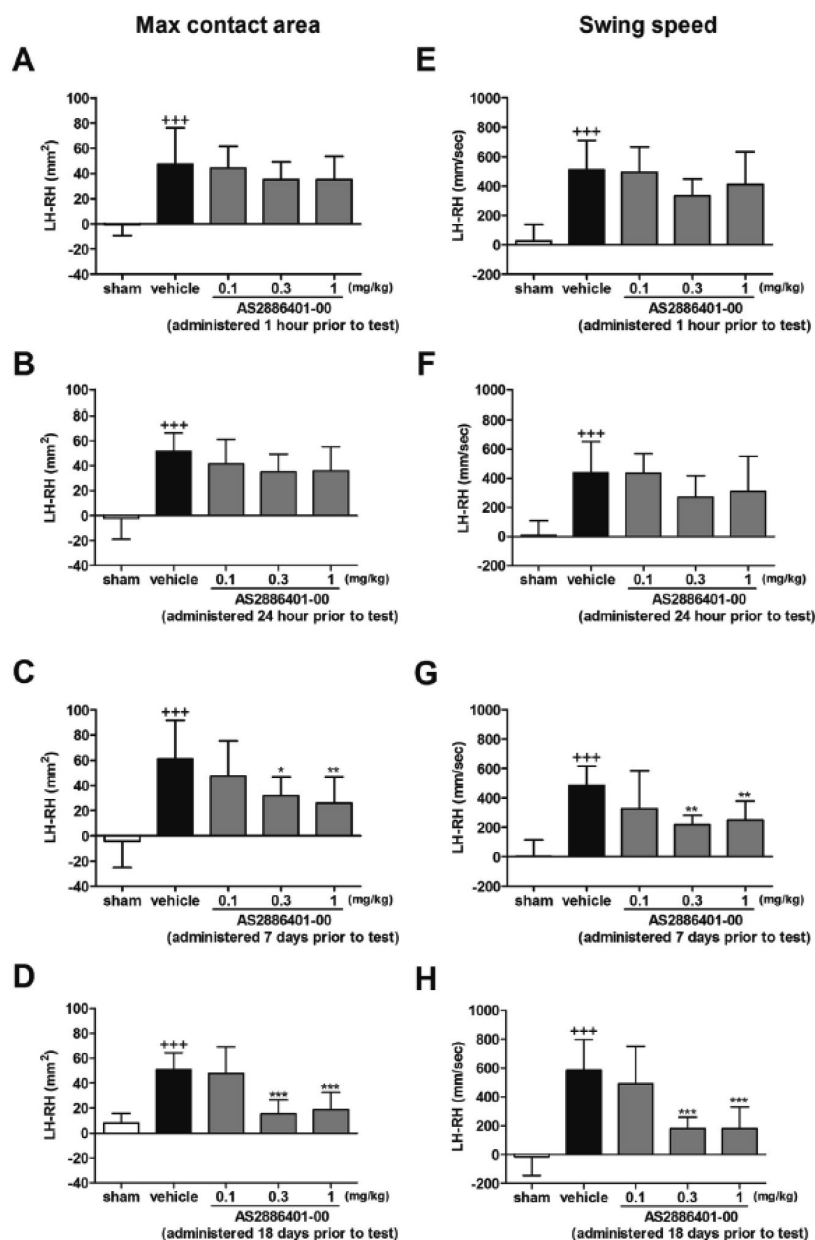


Figure 23. Influence of timing of intervention with AS2886401-00 on analgesic outcome. Imbalance in max contact area (left) and swing speed (right) was measured by the gait analysis paradigm in MIA-induced arthritis rats. AS2886401-00 was intravenously administered 1 h (A, E)(n = 10 per group), 24 h (B, F)(n = 10 per group), 7 days (C, G)(n = 10 per group) or 18 days (D, H)(n = 12 for 0.1 or 1 mg/kg of AS2886401-00, n = 11 for 0.3 mg/kg of AS2886401-00, n = 12 for vehicle and n = 10 for sham) prior to gait measurement (i.e., efficacy evaluation) which was conducted at Week 3 post-MIA administration. Data represent the difference between ipsilateral and contralateral hind limb and are presented as mean \pm S.D. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, and *** $P < 0.001$ compared to corresponding vehicle control (Dunnett's multiple comparison test). ⁺⁺⁺ $P < 0.001$ compared to corresponding sham control (Student's t test).

4. 考察

MIA 投与により投与部位に局限した単関節炎が誘導され、1 か月以上の長期に渡って有意な後肢の歩様異常を引き起こした。これに対して抗 β -NGF 抗体 AS2886401-00 は、MIA 投与後早期に単回投与されることで、その鎮痛作用により本歩様異常を長期間改善することが示唆された。MIA 投与後 3 日の時点ではまだ OA 様の病理所見は確立されていないとされるが[74]、疼痛関連行動は MIA 投与後 1 週間以内に観察されるとの報告がある[58,74]。今回の検討においても MIA 投与後 3 日で歩様異常を認めた。特に β -NGF は MIA 投与後 4 日の早期から膝関節内での産生亢進が認められるとの報告[104]があることから、 β -NGF は OA 疼痛の維持のみならず、発症にも寄与している可能性がある。MIA 投与後早期に投与された AS2886401-00 は、こうした β -NGF の OA 疼痛発症および維持機能を抑制することで、長期間持続の鎮痛作用を示しているのかもしれない。本章記載の研究によって明らかとなった AS2886401-00 の鎮痛作用は、近年臨床研究において示されている抗 β -NGF 抗体の OA 疼痛に対する鎮痛効果[78–80, 94]と関連している可能性がある。しかしながら、MIA 投与後 3 日の OA 病理像が確認できない時点で AS2886401-00 を処置するという実験条件と、すでに OA 病態が確立されている OA 患者に抗 β -NGF 抗体が投与される臨床試験とでは条件は全く異なるという点には留意する必要がある。

AS2886401-00 はラット β -NGF に結合し、その中和活性により β -NGF の機能を強力に阻害する。これら *in vitro* 活性から 0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の AS2886401-00 は 40 ng/mL のラット β -NGF の機能を完全に抑制することが明らかとなった。また AS2886401-00 のラット体内動態解析から、0.3 mg/kg を静脈内投与した場合には 14 日間以上に渡って 0.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ を超える血漿中濃度が維持されることが示された。したがって、AS2886401-00 の継続的な歩様不均衡是正作用は、内因性の β -NGF を持続的に中和することによってもたらされた可能性がある。より長期に渡る AS2886401-00 の血漿中濃度解析と MIA ラットにおける血漿中 β -NGF 濃度測定による抗原-抗体濃度相関を明らかにすることは、AS4886401-00 の長期鎮痛作用の発現機序を考察するうえで必要である。

AS2886401-00 の投与タイミングの違いによる薬効への影響を検討した結果から、MIA 投与後早期（歩様評価の 7 あるいは 18 日前）に AS2886401-00 を投与した場合には、MIA 投与後後期（歩様評価の 1 あるいは 24 時間前）に AS2886401-00 を投与した場合に比べて高い有効性が得られることが明らかとなった。 β -NGF は感覚神経終末に発現する TrkA 受容体に結合することで DRG へ逆行輸送され、細胞表面の侵害受容に関連する受容体やチャネルの発現を増強して、神経を感作するとされる[94,95]。加えて MIA を投与した感作肢を支配する神経 DRG での TrkA 受容体の発現が亢進していることが報告されており[106]、 β -NGF-TrkA シグナル経路が亢進していることが示唆されている。抗 β -NGF 抗体の鎮痛作用は、こうした侵害受容体やチャネルの発現抑制あるいは β -NGF-TrkA シグナル経路の亢進抑制を介して発現されている可能性がある。また MIA 感作早期に抗 β -NGF 抗体を投与した場合に高い有効性が認められる理由の一つに、こうした侵害受容関連分子の発現亢進を十分に抑制するためには長期間を必要とする可能性が考えられる。

本章記載の研究において、AS2886401-00 は膝関節腫脹や損傷に対する有意な抑制作用は示さなかった。作用機序は不明であるが、AS2886401-00 はむしろ既報に一致して膝関節腫脹を有意に増強していた[107,108]。また AS2886401-00 は膝損傷スコアに対する有意な作用を示さなかった。これらの結果は AS2886401-00 投与による感作肢への荷重増加が抗炎症や関節軟骨破壊抑制作用ではなく鎮痛作用に基づくことを示唆するものである。ただし、本結果は目視による観察結果であり、病理組織学的解析等による精査が必要である。また本モデルは重度の関節損傷を引き起こすため、他の関節症モデルでの評価等、抗 β -NGF 抗体が疾患修飾作用を有するか否かについてはより詳細な検討が必要である。

第二章記載の研究では、morphine や tramadol など臨床で使用される鎮痛剤が歩様異常を是正したことを報告したが、それらの結果を考慮すると AS2886401-00 の著明な歩様異常是正作用もおそらくは主に鎮痛作用に基づくと考えられた。化学的に誘発された関節炎モデルと OA 患者の間には違いがあることから、その関節炎の背景にある疫学や病態生理学を検討することが重要である。ヒト OA を一つの動物モデルで完全に再現することは困難であり、外科的処置によって誘導されるモデルや、自然発症のモデルといったその他の OA 動物モデルについても AS2886401-00 の鎮痛効果を検討する必要がある。歩様不均衡は近年疼痛指標として用いられてきているが、刺激誘発モデルでの評価など複数組み合わせ合わせた総合的な解析も考慮すべきと考えられる。

本章記載の研究から、抗 β -NGF 抗体が単回投与されることによって、ラット OA モデルにおける動作時痛に対して長期間持続する鎮痛効果を発揮すること、第二章の結果との比較から、その有効性は μ -opioid 受容体アゴニスト並であることが明らかとなった。また本効果は関節腫脹や損傷を抑制した結果ではないことが示唆され、早期介入することでより高い鎮痛効果が得られることが明らかとなった。本発見は近年ヒト OA 患者に対して抗 β -NGF 抗体が示した最近の臨床研究結果を反映している可能性がある。

総括

本論文では、臨床と非臨床の疼痛評価指標のギャップを埋めるべく、自発痛関連行動を指標とした各種疼痛モデルに対する評価系の構築を目指した。具体的には神経障害性モデルが示す自発痛関連行動の自動測定系ならびに変形性関節症モデルが示す歩様異常からの動作時痛測定系を構築し、様々な作用機序の既存薬を評価することで、臨床効果予測性に関する検証を行った。本研究から明らかとなった点は以下の通りである。

第一章記載の研究では、神経障害性疼痛の動物モデルであるラット CCI モデルの行動観察から、ラットが示す患肢特異的な行動の自動検出系を構築し、各種鎮痛薬の有効性について検討した。

1. 搔痒評価に用いられてきた **MicroAct** を流用してその測定条件を検討することによって、ラットの様々な自発行動が識別可能となった。その結果、30 分間で同時に 16 匹のラットの疼痛関連自発行動を自動かつ客観的に測定可能な高スループットの評価系が構築できた。
2. 患肢特異的に認められる自発痛関連行動の発現回数は、目視観察下と **MicroAct** による自動測定下で相関が認められた。
3. 一方、既存の刺激誘発痛評価系である von Frey hair による機械刺激や acetone による冷刺激評価と、**MicroAct** による評価結果との間に相関は認められなかった。
4. 各種既存鎮痛薬の CCI モデルおよび健常ラット自発行動に対する薬効が **MicroAct** を用いた自動測定系によって検出された。Amitriptyline 30 mg/kg p.o. の用量は CCI ラットの肢動作総回数を減少させるが、健常ラットの歩行動作回数には影響しなかった。

以上から、**MicroAct** を用いた自動測定によって検出されるラット CCI モデルの患肢特異的な自発行動は、既存鎮痛薬に対して感受性を示し、かつこれまでの刺激誘発痛評価系で検出されるものとは異なることから、自発痛を反映している可能性があることが示唆された。また、その定量的評価として **MicroAct** が有用であることが明らかとなった。本測定系は客観的かつ自動的に測定が可能であり、本系は臨床／非臨床ギャップを埋めて、臨床有効性の高い鎮痛薬を高スループットで探索することを可能にするものであり、今後の鎮痛薬開発に非常に有益なものとなり得る。

第二章記載の研究では、変形性関節症の動物モデルであるラット MIA 誘発関節炎モデルの安静時ならびに動作時の左右後肢不均衡を測定し、既存鎮痛薬に対する応答性について検討した。

5. 歩様測定による鎮痛薬評価には、MIA 1mg が関節炎惹起に適した用量であり、歩様パラメーターは、主に Δ Max contact area ならびに Δ Swing speed が歩行時痛を反映していることが示唆された。

6. ラット OA モデルにおいても、臨床で認められる歩行時痛が存在することが、既存鎮痛剤の安静時の左右荷重差不均衡ならびに歩様異常に対する有効性を評価することによって示唆された。
7. MIA 投与後 3 週間のラット疼痛行動は NSAID では是正されず、非 prostaglandin 系の疼痛シグナルが関与することが示唆された。
8. 本系で認められた歩行時痛に対しては、主に μ -opioid 受容体アゴニストが高い有効性を示すことが明らかとなった。一方、SNRI は有効性を示さず、臨床での有効性を反映する結果であった。

本章で用いた歩様測定による疼痛評価系は、ラットが無拘束自由行動下で無用なストレスを感じることがないため、既存の評価系より感度良く自発痛を検出できると思われる。またこれまでの評価系と異なり、本系では鎮静等行動抑制をもたらす作用を有する薬剤は評価できないため、疑陽性を検出する可能性は低いと考えられる。

以上から、本系のラット歩行時痛に有効な鎮痛薬は臨床においても強い鎮痛作用を示す可能性があり、歩様異常評価系は今後の OA 鎮痛薬スクリーニングにおいて有用であることが示唆された。

第三章記載の研究では、第二章と同じくラット MIA 誘発関節炎モデルの歩行時痛に対する抗 β -NGF 抗体の薬効について検討した。

9. 臨床試験において、単回静脈内投与で OA 歩行時痛に持続的かつ顕著な有効性を示している抗 β -NGF 抗体は、ラット OA 疼痛モデルにおいても単回静脈内投与により歩行時痛に持続的かつ顕著な鎮痛作用を示すことが明らかとなり、一部臨床効果を反映することが示唆された。
10. OA 惹起後早期から抗 β -NGF 抗体を投与することでより強い、持続的な作用を示すことが明らかとなり、 β -NGF は発痛に関与するばかりでなく、慢性疼痛病態の形成にも寄与することが示唆された。
11. 第二章の結果との比較から、抗 β -NGF 抗体は歩行時痛に対して μ -opioid 受容体アゴニスト並の有効性を示すことが明らかとなった。
12. 抗 β -NGF 抗体は関節腫脹を悪化させるにもかかわらず、歩様異常は改善しており、本系でみられる歩様異常是正効果は鎮痛作用に基づくことが示唆された。

以上、本研究では、臨床における自発痛を反映する動物の自発痛関連行動の検出、およびその機械による自動測定法の開発に取り組み、神経障害性疼痛モデルにおける自発痛関連行動を一度に複数匹、客観的に自動測定できる高スループットな測定系を構築した。また変形性関節症モデルにおける痛みが反映される歩様パラメータを精査し、歩行時痛を客観的に自動測定できる測定系を構築した。これら自発痛評価と既存の刺激誘発痛評価とでは既存薬剤の有効性に相違がみられ、刺激誘発痛と自発痛の発症機序が異なることが示唆された。以上から本研究にて構築された測定系は、従来法の課題であった非臨床/臨床の評価指標の不一致、および特定実験者の実験手技/主観的判断への依存を解決できていると考えられる。そのなかで

も OA 鎮痛薬の新しい評価系である本歩様評価系において、抗 β -NGF 抗体は持続的かつ顕著な薬効を示すことが明らかとなり、これは臨床で認められる有効性を一部反映しており、本系の高い臨床効果予測性が示唆された。以上より、自発痛関連行動評価から自発痛・動作時痛に関するさらなる機序解明が進み、新規機序に基づく強い鎮痛薬が見出されることが期待される。

引用文献

- [1] Darrell J. *Reliving Pain in America: A Blueprint for Transforming Prevention, Care, Education, and Research*. Washington (DC), 2011.
- [2] Kola I, Landis J. Can the pharmaceutical industry reduce attrition rates? *Nat. Rev. Drug Discov.* 2004;3: 711-115.
- [3] GOETZL FR, PARSONS CM. The influence of acetylsalicylic acid upon analgesic effects of induced pain. *Proc. Am. Fed. Clin. Res.* 1945;2: 92.
- [4] Wolff HG, Hardy JD, Goodell H. STUDIES ON PAIN. MEASUREMENT OF THE EFFECT OF MORPHINE, CODEINE, AND OTHER OPIATES ON THE PAIN THRESHOLD AND AN ANALYSIS OF THEIR RELATION TO THE PAIN EXPERIENCE. *J. Clin. Invest.* 1940;19: 659-680.
- [5] Dunner DL, Goldstein DJ, Mallinckrodt C, Lu Y, Detke MJ. Duloxetine in treatment of anxiety symptoms associated with depression. *Depress. Anxiety* 2003;18: 53-61.
- [6] Selak I. Pregabalin (Pfizer). *Curr. Opin. Investig. Drugs* 2001;2: 828-834.
- [7] Mogil JS. Animal models of pain: progress and challenges. *Nat. Rev. Neurosci.* 2009;10: 283-294.
- [8] Mogil JS, Crager SE. What should we be measuring in behavioral studies of chronic pain in animals? *Pain* 2004;112: 12-15.
- [9] Malfait A-M, Schnitzer TJ. Towards a mechanism-based approach to pain management in osteoarthritis. *Nat. Rev. Rheumatol.* 2013;9: 654-664.
- [10] Chapman CR, Lipschitz DL, Angst MS, Chou R, Denisco RC, Donaldson GW, Fine PG, Foley KM, Gallagher RM, Gilson AM, Haddox JD, Horn SD, Inturrisi CE, Jick SS, Lipman AG, Loeser JD, Noble M, Porter L, Rowbotham MC, Schoelles KM, Turk DC, Volinn E, Von Korff MR, Webster LR, Weisner CM. Opioid pharmacotherapy for chronic non-cancer pain in the United States: a research guideline for developing an evidence-base. *J. Pain* 2010;11: 807-829.
- [11] Mantyh PW, Koltzenburg M, Mendell LM, Tive L, Shelton DL. Antagonism of nerve growth factor-TrkA signaling and the relief of pain. *Anesthesiology* 2011;115: 189-204.
- [12] Gehling M, Hermann B, Tryba M. Meta-analysis of dropout rates in randomized controlled clinical trials. *Der Schmerz* 2011;25: 296-305.
- [13] Lane NE, Schnitzer TJ, Birbara CA, Mokhtarani M, Shelton DL, Smith MD, Brown MT. Tanezumab for the Treatment of Pain from Osteoarthritis of the Knee. *N. Engl. J. Med.* 2010;363: 1521-1531.
- [14] Schnitzer TJ, Ekman EF, Spierings ELH, Greenberg HS, Smith MD, Brown MT, West CR, Verburg KM. Efficacy and safety of tanezumab monotherapy or combined with

non-steroidal anti-inflammatory drugs in the treatment of knee or hip osteoarthritis pain. *Ann. Rheum. Dis.* 2015;74: 1202-1211.

[15] Blackburn-Munro G. Pain-like behaviours in animals - how human are they? *Trends Pharmacol. Sci.* 2004;25: 299-305.

[16] Negus SS, Vanderah TW, Brandt MR, Bilsky EJ, Becerra L, Borsook D. Preclinical assessment of candidate analgesic drugs: recent advances and future challenges. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2006;319: 507-514.

[17] Rice ASC, Cimino-Brown D, Eisenach JC, Kontinen VK, Lacroix-Fralish ML, Machin I, Mogil JS, Stohr T. Animal models and the prediction of efficacy in clinical trials of analgesic drugs: a critical appraisal and call for uniform reporting standards. *Pain* 2008;139: 243-247.

[18] Backonja M-M, Stacey B. Neuropathic pain symptoms relative to overall pain rating. *J. Pain* 2004;5: 491-497.

[19] Jourdan D, Ardid D, Eschalier A. Automated behavioural analysis in animal pain studies. *Pharmacol. Res.* 2001;43: 103-110.

[20] Whiteside GT, Adedoyin A, Leventhal L. Predictive validity of animal pain models? A comparison of the pharmacokinetic-pharmacodynamic relationship for pain drugs in rats and humans. *Neuropharmacology* 2008;54: 767-775.

[21] Berge O-G. Predictive validity of behavioural animal models for chronic pain. *Br. J. Pharmacol.* 2011;164: 1195-1206.

[22] Bennett GJ, Xie YK. A peripheral mononeuropathy in rat that produces disorders of pain sensation like those seen in man. *Pain* 1988;33: 87-107.

[23] Seltzer Z, Dubner R, Shir Y. A novel behavioral model of neuropathic pain disorders produced in rats by partial sciatic nerve injury. *Pain* 1990;43: 205-218.

[24] Kim SH, Chung JM. An experimental model for peripheral neuropathy produced by segmental spinal nerve ligation in the rat. *Pain* 1992;50: 355-363.

[25] Desmeules JA, Kayser V, Weil-Fuggaza J, Bertrand A, Guilbaud G. Influence of the sympathetic nervous system in the development of abnormal pain-related behaviours in a rat model of neuropathic pain. *Neuroscience* 1995;67: 941-951.

[26] Kupers R, Yu W, Persson JK, Xu XJ, Wiesenfeld-Hallin Z. Photochemically-induced ischemia of the rat sciatic nerve produces a dose-dependent and highly reproducible mechanical, heat and cold allodynia, and signs of spontaneous pain. *Pain* 1998;76: 45-59.

[27] Djouhri L, Koutsikou S, Fang X, McMullan S, Lawson SN. Spontaneous pain, both neuropathic and inflammatory, is related to frequency of spontaneous firing in intact C-fiber nociceptors. *J. Neurosci.* 2006;26: 1281-1292.

[28] Kim KJ, Yoon YW, Chung JM. Comparison of three rodent neuropathic pain models. *Exp. brain Res.* 1997;113: 200-206.

- [29] Yaksh TL, Ozaki G, McCumber D, Rathbun M, Svensson C, Malkmus S, Yaksh MC. An automated flinch detecting system for use in the formalin nociceptive bioassay. *J. Appl. Physiol.* 2001;90: 2386-2402.
- [30] Chaplan SR, Bach FW, Pogrel JW, Chung JM, Yaksh TL. Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw. *J. Neurosci. Methods* 1994;53: 55-63.
- [31] Choi Y, Yoon YW, Na HS, Kim SH, Chung JM. Behavioral signs of ongoing pain and cold allodynia in a rat model of neuropathic pain. *Pain* 1994;59: 369-376.
- [32] Field MJ, Bramwell S, Hughes J, Singh L. Detection of static and dynamic components of mechanical allodynia in rat models of neuropathic pain: are they signalled by distinct primary sensory neurones? *Pain* 1999;83: 303-311.
- [33] Joshi SK, Hernandez G, Mikusa JP, Zhu CZ, Zhong C, Salyers A, Wismer CT, Chandran P, Decker MW, Honore P. Comparison of antinociceptive actions of standard analgesics in attenuating capsaicin and nerve-injury-induced mechanical hypersensitivity. *Neuroscience* 2006;143: 587-596.
- [34] De Vry J, Kuhl E, Franken-Kunkel P, Eckel G. Pharmacological characterization of the chronic constriction injury model of neuropathic pain. *Eur. J. Pharmacol.* 2004;491: 137-148.
- [35] Leon-Reyes MR, Castaneda-Hernandez G, Ortiz MI. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of diclofenac in the presence and absence of glibenclamide in the rat. *J. Pharm. Pharm. Sci.* 2008;11: 68-76.
- [36] Elliott GR, Vanwersch RA, Bruijnzeel PL. An automated method for registering and quantifying scratching activity in mice: use for drug evaluation. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods* 2000;44: 453-459.
- [37] Inagaki N, Igeta K, Kim JF, Nagao M, Shiraishi N, Nakamura N, Nagai H. Involvement of unique mechanisms in the induction of scratching behavior in BALB/c mice by compound 48/80. *Eur. J. Pharmacol.* 2002;448: 175-183.
- [38] Roughan J V, Flecknell PA. Behaviour-based assessment of the duration of laparotomy-induced abdominal pain and the analgesic effects of carprofen and buprenorphine in rats. *Behav. Pharmacol.* 2004;15: 461-472.
- [39] Langford DJ, Bailey AL, Chanda ML, Clarke SE, Drummond TE, Echols S, Glick S, Ingrao J, Klassen-Ross T, Lacroix-Fralish ML, Matsumiya L, Sorge RE, Sotocinal SG, Tabaka JM, Wong D, van den Maagdenberg AMJM, Ferrari MD, Craig KD, Mogil JS. Coding of facial expressions of pain in the laboratory mouse. *Nat. Methods* 2010;7: 447-449.
- [40] Vierck CJJ, Kline R 4th, Wiley RG. Comparison of operant escape and innate reflex responses to nociceptive skin temperatures produced by heat and cold stimulation of rats. *Behav. Neurosci.* 2004;118: 627-635.
- [41] King T, Vera-Portocarrero L, Gutierrez T, Vanderah TW, Dussor G, Lai J, Fields HL, Porreca F. Unmasking the tonic-aversive state in neuropathic pain. *Nat. Neurosci.* 2009;12: 1364-1366.

- [42] Schott E, Berge OG, Angeby-Moller K, Hammarstrom G, Dalsgaard CJ, Brodin E. Weight bearing as an objective measure of arthritic pain in the rat. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods* 1994;31: 79-83.
- [43] Aley KO, Reichling DB, Levine JD. Vincristine hyperalgesia in the rat: a model of painful vincristine neuropathy in humans. *Neuroscience* 1996;73: 259-265.
- [44] Le Cudennec C, Castagne V. Face-to-face comparison of the predictive validity of two models of neuropathic pain in the rat: analgesic activity of pregabalin, tramadol and duloxetine. *Eur. J. Pharmacol.* 2014;735: 17-25.
- [45] Attal N, Cruccu G, Haanpaa M, Hansson P, Jensen TS, Nurmikko T, Sampaio C, Sindrup S, Wiffen P. EFNS guidelines on pharmacological treatment of neuropathic pain. *Eur. J. Neurol.* 2006;13: 1153-1169.
- [46] Henze D a, Urban MO. Chapter 17 Large Animal Models for Pain Therapeutic Development. *Translational Pain Research: From Mouse to Man.* 2010. pp. 1–16.
- [47] Hill R. NK1 (substance P) receptor antagonists--why are they not analgesic in humans? *Trends Pharmacol. Sci.* 2000;21: 244-246.
- [48] Galer BS, Twilling LL, Harle J, Cluff RS, Friedman E, Rowbotham MC. Lack of efficacy of riluzole in the treatment of peripheral neuropathic pain conditions. *Neurology* 2000;55: 971-975.
- [49] Coderre TJ, Kumar N, Lefebvre CD, Yu JSC. A comparison of the glutamate release inhibition and anti-allodynic effects of gabapentin, lamotrigine, and riluzole in a model of neuropathic pain. *J. Neurochem.* 2007;100: 1289-1299.
- [50] Rowbotham MC, Fields HL. The relationship of pain, allodynia and thermal sensation in post-herpetic neuralgia. *Brain* 1996;119 (Pt 2): 347-354.
- [51] Finnerup NB, Johannesen IL, Fuglsang-Frederiksen A, Bach FW, Jensen TS. Sensory function in spinal cord injury patients with and without central pain. *Brain* 2003;126 (Pt 1): 57-70.
- [52] Maier C, Baron R, Tolle TR, Binder A, Birbaumer N, Birklein F, Gierthmuhlen J, Flor H, Geber C, Hugel V, Krumova EK, Landwehrmeyer GB, Magerl W, Maihofner C, Richter H, Rolke R, Scherens A, Schwarz A, Sommer C, Tronnier V, Uceyler N, Valet M, Wasner G, Treede R-D. Quantitative sensory testing in the German Research Network on Neuropathic Pain (DFNS): somatosensory abnormalities in 1236 patients with different neuropathic pain syndromes. *Pain* 2010;150: 439-450.
- [53] Sinkov V, Cymet T. Osteoarthritis: understanding the pathophysiology, genetics, and treatments. *J. Natl. Med. Assoc.* 2003;95: 475-482.
- [54] Petrella RJ, DiSilvestro MD, Hildebrand C. Effects of hyaluronate sodium on pain and physical functioning in osteoarthritis of the knee: a randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial. *Arch. Intern. Med.* 2002;162: 292-298.

- [55] Kelly S, Dunham JP, Murray F, Read S, Donaldson LF, Lawson SN. Spontaneous firing in C-fibers and increased mechanical sensitivity in A-fibers of knee joint-associated mechanoreceptive primary afferent neurones during MIA-induced osteoarthritis in the rat. *Osteoarthritis Cartilage* 2012;20: 305-313.
- [56] Guzman RE, Evans MG, Bove S, Morenko B, Kilgore K. Mono-iodoacetate-induced histologic changes in subchondral bone and articular cartilage of rat femorotibial joints: an animal model of osteoarthritis. *Toxicol. Pathol.* 2003;31: 619-624.
- [57] Kalbhen DA. Chemical model of osteoarthritis--a pharmacological evaluation. *J. Rheumatol.* 1987;14 Spec No: 130-131.
- [58] Kobayashi K, Imaizumi R, Sumichika H, Tanaka H, Goda M, Fukunari A, Komatsu H. Sodium iodoacetate-induced experimental osteoarthritis and associated pain model in rats. *J. Vet. Med. Sci.* 2003;65: 1195-1199.
- [59] Combe R, Bramwell S, Field MJ. The monosodium iodoacetate model of osteoarthritis: a model of chronic nociceptive pain in rats? *Neurosci. Lett.* 2004;370:111-112.
- [60] Fernihough J, Gentry C, Malcangio M, Fox A, Rediske J, Pellas T, Kidd B, Bevan S, Winter J. Pain related behaviour in two models of osteoarthritis in the rat knee. *Pain* 2004;112: 83-93.
- [61] Ferreira-Gomes J, Aadaes S, Castro-Lopes JM. Assessment of movement-evoked pain in osteoarthritis by the knee-bend and CatWalk tests: a clinically relevant study. *J. Pain* 2008;9: 945-954.
- [62] Ferland CE, Laverty S, Beaudry F, Vachon P. Gait analysis and pain response of two rodent models of osteoarthritis. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 2011;97: 603-610.
- [63] Chandran P, Pai M, Blomme EA, Hsieh GC, Decker MW, Honore P. Pharmacological modulation of movement-evoked pain in a rat model of osteoarthritis. *Eur. J. Pharmacol.* 2009;613: 39-45.
- [64] Di Cesare Mannelli L, Bani D, Bencini A, Brandi ML, Calosi L, Cantore M, Carossino AM, Ghelardini C, Valtancoli B, Failli P. Therapeutic effects of the superoxide dismutase mimetic compound MnIIME2DO2A on experimental articular pain in rats. *Mediators Inflamm.* 2013;2013: 905360.
- [65] Ferreira-Gomes J, Aadaes S, Mendonca M, Castro-Lopes JM. Analgesic effects of lidocaine, morphine and diclofenac on movement-induced nociception, as assessed by the Knee-Bend and CatWalk tests in a rat model of osteoarthritis. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 2012;101: 617-624.
- [66] Ivanavicius SP, Ball AD, Heapy CG, Westwood FR, Murray F, Read SJ. Structural pathology in a rodent model of osteoarthritis is associated with neuropathic pain: increased expression of ATF-3 and pharmacological characterisation. *Pain* 2007;128: 272-282.

- [67] Pulichino A-M, Rowland S, Wu T, Clark P, Xu D, Mathieu M-C, Riendeau D, Audoly LP. Prostacyclin antagonism reduces pain and inflammation in rodent models of hyperalgesia and chronic arthritis. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2006;319: 1043-1050.
- [68] Yoshimi E, Kumakura F, Hatori C, Hamachi E, Iwashita A, Ishii N, Terasawa T, Shimizu Y, Takeshita N. Antinociceptive effects of AS1892802, a novel Rho kinase inhibitor, in rat models of inflammatory and noninflammatory arthritis. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2010;334: 955-963.
- [69] Takeshita N, Yoshimi E, Hatori C, Kumakura F, Seki N, Shimizu Y. Alleviating effects of AS1892802, a Rho kinase inhibitor, on osteoarthritic disorders in rodents. *J. Pharmacol. Sci.* 2011;115: 481-489.
- [70] Hurwitz DE, Ryals AR, Block JA, Sharma L, Schnitzer TJ, Andriacchi TP. Knee pain and joint loading in subjects with osteoarthritis of the knee. *J. Orthop. Res.* 2000;18: 572-579.
- [71] Henriksen M, Aaboe J, Bliddal H. The relationship between pain and dynamic knee joint loading in knee osteoarthritis varies with radiographic disease severity. A cross sectional study. *Knee* 2012;19: 392-398.
- [72] Henriksen M, Simonsen EB, Alkjaer T, Lund H, Graven-Nielsen T, Danneskiold-Samsøe B, Bliddal H. Increased joint loads during walking--a consequence of pain relief in knee osteoarthritis. *Knee* 2006;13: 445-450.
- [73] Perrot S, Bertin P. "Feeling better" or "feeling well" in usual care of hip and knee osteoarthritis pain: determination of cutoff points for patient acceptable symptom state (PASS) and minimal clinically important improvement (MCII) at rest and on movement in a national mult. *Pain* 2013;154: 248-256.
- [74] Bove SE, Calcaterra SL, Brooker RM, Huber CM, Guzman RE, Juneau PL, Schrier DJ, Kilgore KS. Weight bearing as a measure of disease progression and efficacy of anti-inflammatory compounds in a model of monosodium iodoacetate-induced osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* 2003;11: 821-830.
- [75] Nagase H, Kumakura S, Shimada K. Establishment of a novel objective and quantitative method to assess pain-related behavior in monosodium iodoacetate-induced osteoarthritis in rat knee. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods* 2012;65: 29-36.
- [76] Scott DL, Berry H, Capell H, Coppock J, Daymond T, Doyle D V, Fernandes L, Hazleman B, Hunter J, Huskisson EC, Jawad A, Jubb R, Kennedy T, McGill P, Nichol F, Palit J, Webley M, Woolf A, Wotjulewski J. The long-term effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs in osteoarthritis of the knee: a randomized placebo-controlled trial. *Rheumatology (Oxford)*. 2000;39: 1095-1101.
- [77] Yocum D, Fleischmann R, Dalgin P, Caldwell J, Hall D, Roszko P. Safety and efficacy of meloxicam in the treatment of osteoarthritis: a 12-week, double-blind, multiple-dose, placebo-controlled trial. The Meloxicam Osteoarthritis Investigators. *Arch. Intern. Med.* 2000;160: 2947-2954.

- [78] Bjordal JM, Ljunggren AE, Klovning A, Slordal L. Non-steroidal anti-inflammatory drugs, including cyclo-oxygenase-2 inhibitors, in osteoarthritic knee pain: meta-analysis of randomised placebo controlled trials. *BMJ* 2004;329: 1317.
- [79] Caldwell JR, Rapoport RJ, Davis JC, Offenberg HL, Marker HW, Roth SH, Yuan W, Eliot L, Babul N, Lynch PM. Efficacy and safety of a once-daily morphine formulation in chronic, moderate-to-severe osteoarthritis pain: results from a randomized, placebo-controlled, double-blind trial and an open-label extension trial. *J. Pain Symptom Manage.* 2002;23: 278-291.
- [80] Raffa RB, Friderichs E, Reimann W, Shank RP, Codd EE, Vaught JL. Opioid and nonopioid components independently contribute to the mechanism of action of tramadol, an "atypical" opioid analgesic. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1992;260: 275-285.
- [81] Babul N, Noveck R, Chipman H, Roth SH, Gana T, Albert K. Efficacy and safety of extended-release, once-daily tramadol in chronic pain: a randomized 12-week clinical trial in osteoarthritis of the knee. *J. Pain Symptom Manage.* 2004;28: 59-71.
- [82] Roth SH. Efficacy and safety of tramadol HCl in breakthrough musculoskeletal pain attributed to osteoarthritis. *J. Rheumatol.* 1998;25: 1358-1363.
- [83] Chappell AS, Ossanna MJ, Liu-Seifert H, Iyengar S, Skljarevski V, Li LC, Bennett RM, Collins H. Duloxetine, a centrally acting analgesic, in the treatment of patients with osteoarthritis knee pain: a 13-week, randomized, placebo-controlled trial. *Pain* 2009;146: 253-260.
- [84] Chappell AS, Desai D, Liu-Seifert H, Zhang S, Skljarevski V, Belenkov Y, Brown JP. A double-blind, randomized, placebo-controlled study of the efficacy and safety of duloxetine for the treatment of chronic pain due to osteoarthritis of the knee. *Pain Pract.* 2011;11: 33-41.
- [85] Bradley JD, Brandt KD, Katz BP, Kalasinski LA, Ryan SI. Comparison of an Antiinflammatory Dose of Ibuprofen, an Analgesic Dose of Ibuprofen, and Acetaminophen in the Treatment of Patients with Osteoarthritis of the Knee. *N. Engl. J. Med.* 1991;325: 87-91.
- [86] Herrmann G, Steeger D, Klasser M, Wirbitzky J, Furst M, Venbrocks R, Rohde H, Jungmichel D, Hildebrandt HD, Parnham MJ, Gimbel W, Dirschedl H. Oxaceprol is a well-tolerated therapy for osteoarthritis with efficacy equivalent to diclofenac. *Clin. Rheumatol.* 2000;19: 99-104.
- [87] Benyamin R, Trescot AM, Datta S, Buenaventura R, Adlaka R, Sehgal N, Glaser SE, Vallejo R. Opioid complications and side effects. *Pain Physician* 2008;11: S105-120.
- [88] Brown MT, Murphy FT, Radin DM, Davignon I, Smith MD, West CR. Tanezumab reduces osteoarthritic knee pain: results of a randomized, double-blind, placebo-controlled phase III trial. *J. Pain* 2012;13: 790-798.
- [89] Levi-Montalcini R. The nerve growth factor 35 years later. *Science* 1987;237: 1154-1162.

- [90] Smith AP, Varon S, Shooter EM. Multiple forms of the nerve growth factor protein and its subunits. *Biochemistry* 1968;7: 3259-3268.
- [91] Muragaki Y, Timothy N, Leight S, Hempstead BL, Chao M V, Trojanowski JQ, Lee VM. Expression of trk receptors in the developing and adult human central and peripheral nervous system. *J. Comp. Neurol.* 1995;356: 387-397.
- [92] la Sala A, Corinti S, Federici M, Saragovi HU, Girolomoni G. Ligand activation of nerve growth factor receptor TrkA protects monocytes from apoptosis. *J. Leukoc. Biol.* 2000;68: 104-110.
- [93] Grimsholm O, Guo Y, Ny T, Forsgren S. Expression patterns of neurotrophins and neurotrophin receptors in articular chondrocytes and inflammatory infiltrates in knee joint arthritis. *Cells. Tissues. Organs* 2008;188: 299-309.
- [94] Pezet S, McMahon SB. Neurotrophins: mediators and modulators of pain. *Annu. Rev. Neurosci.* 2006;29: 507-538.
- [95] Ji R-R, Samad TA, Jin S-X, Schmall R, Woolf CJ. p38 MAPK Activation by NGF in Primary Sensory Neurons after Inflammation Increases TRPV1 Levels and Maintains Heat Hyperalgesia. *Neuron* 2015;36: 57-68.
- [96] Watson J, Allen S, Dawbarn D. Targeting nerve growth factor in pain: what is the therapeutic potential? *BioDrugs* 2008;22: 349-359.
- [97] Indo Y, Tsuruta M, Hayashida Y, Karim MA, Ohta K, Kawano T, Mitsubuchi H, Tonoki H, Awaya Y, Matsuda I. Mutations in the TRKA/NGF receptor gene in patients with congenital insensitivity to pain with anhidrosis. *Nat. Genet.* 1996;13: 485-488.
- [98] Iannone F, De Bari C, Dell'Accio F, Covelli M, Patella V, Lo Bianco G, Lapadula G. Increased expression of nerve growth factor (NGF) and high affinity NGF receptor (p140 TrkA) in human osteoarthritic chondrocytes. *Rheumatol.* 2002;41: 1413-1418.
- [99] Manni L, Lundeberg T, Fiorito S, Bonini S, Vigneti E, Aloe L. Nerve growth factor release by human synovial fibroblasts prior to and following exposure to tumor necrosis factor-alpha, interleukin-1 beta and cholecystokinin-8: the possible role of NGF in the inflammatory response. *Clin. Exp. Rheumatol.* 2003;21: 617-624.
- [100] Pecchi E, Priam S, Gosset M, Pigenet A, Sudre L, Laiguillon M-C, Berenbaum F, Houard X. Induction of nerve growth factor expression and release by mechanical and inflammatory stimuli in chondrocytes: possible involvement in osteoarthritis pain. *Arthritis Res. Ther.* 2014;16: R16.
- [101] Vincent TL, Williams RO, Maciewicz R, Silman A, Garside P. Mapping pathogenesis of arthritis through small animal models. *Rheumatology (Oxford).* 2012;51: 1931-1941.
- [102] Ishikawa G, Nagakura Y, Takeshita N, Shimizu Y. Efficacy of drugs with different mechanisms of action in relieving spontaneous pain at rest and during movement in a rat model of osteoarthritis. *Eur. J. Pharmacol.* 2014;738: 111-117.

- [103] Pons J, Rosenthal A, inventors; RINAT NEUROSCIENCE CORP A. Anti-NGF antibodies and methods using same. United States Pat. US 20040237124, 2004;Nov 25.
- [104] Orita S, Ishikawa T, Miyagi M, Ochiai N, Inoue G, Eguchi Y, Kamoda H, Arai G, Toyone T, Aoki Y, Kubo T, Takahashi K, Ohtori S. Pain-related sensory innervation in monoiodoacetate-induced osteoarthritis in rat knees that gradually develops neuronal injury in addition to inflammatory pain. *BMC Musculoskelet. Disord.* 2011;12: 134.
- [105] Tiseo PJ, Kivitz AJ, Ervin JE, Ren H, Mellis SJ. Fasinumab (REGN475), an antibody against nerve growth factor for the treatment of pain: results from a double-blind, placebo-controlled exploratory study in osteoarthritis of the knee. *Pain* 2014;155: 1245-1252.
- [106] Ashraf S, Mapp PI, Burston J, Bennett AJ, Chapman V, Walsh DA. Augmented pain behavioural responses to intra-articular injection of nerve growth factor in two animal models of osteoarthritis. *Ann. Rheum. Dis.* 2014;73: 1710-1718.
- [107] Sabsovich I, Wei T, Guo T-Z, Zhao R, Shi X, Li X, Yeomans DC, Klyukinov M, Kingery WS, Clark JD. Effect of anti-NGF antibodies in a rat tibia fracture model of complex regional pain syndrome type I. *Pain* 2008;138: 47-60.
- [108] Shelton DL, Zeller J, Ho W-H, Pons J, Rosenthal A. Nerve growth factor mediates hyperalgesia and cachexia in auto-immune arthritis. *Pain* 2005;116: 8-16.

論文目録

主論文を構成する論文

1. S. Kawasaki-Yatsugi, Y. Nagakura, S. Ogino, T. Sekizawa, T. Kiso, M. Takahashi, G. Ishikawa, H. Ito, Y. Shimizu. Automated measurement of spontaneous pain-associated limb movement and drug efficacy evaluation in a rat model of neuropathic pain. *European Journal of Pain* 2012;16:1426–1436
2. G. Ishikawa, Y. Nagakura, N. Takeshita, Y. Shimizu. Efficacy of drugs with different mechanisms of action in relieving spontaneous pain at rest and during movement in a rat model of osteoarthritis. *European Journal of Pharmacology* 2014;738:111–117.
3. G. Ishikawa, Y. Koya, H. Tanaka, Y. Nagakura. Long-term analgesic effect of a single dose of anti-NGF antibody on pain during motion without notable suppression of joint edema and lesion in a rat model of osteoarthritis. *Osteoarthritis and Cartilage* 2015;23:925-32.

参考論文

1. M. Aoki, M. Fukunaga, M. Kitagawa, K. Hayashi, T. Morokata, G. Ishikawa, S. Kubo, T. Yamada. Effect of a novel anti-inflammatory compound, YM976, on antigen-induced eosinophil infiltration into the lungs in rats, mice, and ferrets. *THE JOURNAL OF PHARMACOLOGY AND EXPERIMENTAL THERAPEUTICS* 2000;295:1149-55.
2. G. Ishikawa, K. Azumi, H. Yokosawa. Involvement of tyrosine kinase and phosphatidylinositol 3-kinase in phagocytosis by ascidian hemocytes. *Complemental Comparative Biochemistry and Physiology Part A* 2000;125:351-7.
3. Y. Abe, G. Ishikawa, H. Satoh, K. Azumi, H. Yokosawa. Primary structure and function of superoxide dismutase from the ascidian *Halocynthia roretzi*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B* 1999;122:321-6.
4. H. Takahashi, G. Ishikawa, K. Ueki, K. Azumi, H. Yokosawa. Cloning and tyrosine phosphorylation of a novel invertebrate immunocyte protein containing immunoreceptor tyrosine-based activation motifs. *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY* 1997;272:32006-10.

謝辞

本論文の作成にあたり、終始懇切丁寧なるご指導、ご鞭撻及びご校閲を賜りました東京理科大学 薬学部 薬理学研究室 岡淳一郎教授に深く感謝申し上げます。また、本論文の内容を詳細にご校閲賜りました東京理科大学 薬学部 応用薬理学研究室 磯濱洋一郎教授、生物薬剤学研究室 廣田孝司教授、分子病理・代謝学研究室 樋上賀一教授、DDS・製剤設計学研究室 山下親正教授に心より感謝申し上げます。

本研究の遂行、発表及び学位取得に際し、ご支援及びご配慮を賜りましたアステラス製薬株式会社 研究本部長 内田渡博士、リサーチポートフォリオ&サイエンス (RPS) 部長 岩井晃彦博士、研究本部専任理事 宮田圭司博士、研究本部トランスレーショナルサイエンス研究所長 須藤勝美博士、RPS 部疾患フロンティア研究ユニット長 鈴木丈太郎博士、製品戦略部科学戦略グループ長 志鷹義嗣博士に謹んで感謝申し上げます。

本研究の遂行にあたり、終始多大なるご指導及びご支援賜りました青森大学 薬学部 薬物治療学研究室 永倉透記博士、アステラス製薬株式会社 研究本部再生研究所 清水保明博士、Astellas Research Institute of America 伊東洋行博士に深く感謝申し上げます。

最後に、共同研究者として、本研究の遂行にご協力賜りましたアステラス製薬株式会社 ドラッグリパーキング部 竹下暢昭博士、RPS 部 関澤俊洋氏、木曾哲男博士、薬事部 矢次さちこ博士、エボルビングメディカルソリューション部 荻野真一氏、バイオサイエンス部 神谷由香里氏、製品戦略部 田中浩嗣博士、アルケア株式会社 高橋正泰博士、アステラスリサーチテクノロジー株式会社 越智武洋博士及び関係者各位に厚く御礼申し上げます。