

博士論文

反復寒冷ストレス負荷により誘起されるラット体性痛・内臓痛における
下行性疼痛抑制系の機能解析および各種薬剤の薬効評価

2021年

糸見 安生 (イトミ ヤスオ)

本論文は、以下の報告内容を総括したものである。

1. Yasuo Itomi, Toru Kawamura, Yasuhiro Tsukimi. Specific alteration of rhythm in temperature-stressed rats possess features of abdominal pain in IBS patients. *Journal of Pharmacological Sciences*. **2015**, 129, 26-30.
2. Yasuo Itomi, Yasuhiro Tsukimi, Toru Kawamura. Impaired diffuse noxious inhibitory controls in specific alteration of rhythm in temperature-stressed rats. *European Journal of Pharmacology*. **2016**, 784, 61-68.
3. Yasuo Itomi, Takahiro Tanaka, Kozo Matsushita, Toru Kawamura, Takuto Kojima, Kazuyoshi Aso, Shiho Matsumoto-Okano and Yasuhiro Tsukimi. Pharmacological evaluation of a novel corticotropin-releasing factor 1 receptor antagonist T-3047928 in stress-induced animal models in a comparison with alosetron. *Neurogastroenterology and Motility*. **2020**, 32, e13795.

目次

序論	1
第1章 SART ストレス負荷ラットを用いた体性痛における 下行性疼痛抑制系の機能解析	8
第1節 緒言	9
第2節 実験材料および方法	11
1. 実験動物	11
2. 使用薬物	11
3. 機械および電気刺激に対する反応閾値測定	11
4. DNIC 反応の評価	13
5. SART ストレス負荷	13
6. 脳室内カニューレ留置	14
7. 統計解析	14
第3節 結果	15
1. 正常ラットにおける capsaicin 誘発 DNIC 反応の検出	15
2. DNIC 反応における下行性疼痛抑制系の関与	16
3. SART ラットにおける痛覚閾値の変化	17
4. SART ラットにおける DNIC 反応の検討	18
5. SART ラットの痛覚過敏に対する鎮痛薬の効果	19
6. SART ラットにおける morphine の鎮痛効果	20
第4節 考察	22
第5節 小括	26
第2章 SART ストレス負荷ラットを用いた内臓痛における 下行性疼痛抑制系の機能解析	27
第1節 緒言	28
第2節 実験材料および方法	30

1.	実験動物	30
2.	使用薬物	30
3.	SART ストレス負荷	30
4.	Visceromotor response (VMR)の測定	31
5.	DNIC 反応の評価	31
6.	RMCP-II mRNA の発現解析	32
7.	恐怖条件付けストレス (Conditioning fear stress, CFS)	33
8.	拘束ストレス (Restraint stress, RS)	35
9.	統計学的解析	35
第3節 結果		36
1.	SART ラットにおける内臓知覚過敏	36
2.	正常ラットおよび SART ラットの内臓痛における DNIC 反応	36
3.	SART ラット遠位結腸における RMCP-II mRNA の発現	37
4.	SART ラットにおける内臓知覚過敏に対する薬理的検討	38
5.	他の IBS モデルにおける alosetron および T-3047928 の薬効評価	39
第4節 考察		42
第5節 小括		46
総括		47
引用文献		50
謝辞		57

略語表

CFS	Conditioning Fear Stress (恐怖条件付けストレス)
CRD	Colorectal Distension (結腸直腸伸展)
CRF	Corticotropin Releasing Factor (副腎皮質刺激ホルモン放出因子)
DNIC	Diffuse Noxious Inhibitory Controls (広範囲侵害抑制性調節機構)
FM	Fibromyalgia (線維筋痛症)
HPA	Hypothalamic-pituitary-adrenal (視床下部－下垂体－副腎)
IBS	Irritable Bowel Syndrome (過敏性腸症候群)
i.c.v.	Intracerebroventricular (脳室内)
i.p.	Intraperitoneal (腹腔内)
i.pl.	Intraplantar (足蹠内)
i.t.	Intrathecal (脊髄内)
LC	Locus Ceruleus (青斑核)
PAG	Periaqueductal Gray (中脳水道周囲灰白質)
RS	Restraint Stress (拘束ストレス)
RVM	Rostral Ventromedial Medulla (吻側延髄腹内側部)
SART	Specific Alteration of Rhythm in Temperature Stress (反復寒冷ストレス)
SNRI	Serotonin Noradrenaline Reuptake Inhibitor (セロトニン・ノルアドレナリン再取り込み阻害薬)
VMR	Visceromotor Response (内臓運動応答)

序論

ストレスは種々の疾患の原因となる重要な因子であり、代表的な疾患として線維筋痛症 (Fibromyalgia, FM) および過敏性腸症候群 (Irritable Bowel Syndrome, IBS) が知られている。これら両疾患は、確認できる組織障害の程度に対して、症状や障害の程度が大きいという特徴を有する機能性身体症候群に分類される [1]。その他の機能性身体症候群には、機能性胃腸症、慢性疲労症候群、顎関節症等などが含まれている。各疾患は相互に大きく重複し、また不安や抑うつなどの神経症状が多数の患者において認められる。また、各疾患には共通する症状が多く、診断基準も類似している。薬物治療としては、抗不安薬や抗うつ薬、抗痙攣薬が奏功することが多く、カウンセリングや認知行動療法など心理療法も実施される。FM や IBS のように、すでに疾患として概念が確立しているものもあるが、いまだ症候概念があいまいなものも存在する。

FM は 3 カ月以上の長期にわたって全身の広い範囲に痛み症状が現れ、疲労感、不眠、頭痛やうつ症状など多彩な症状を伴う。有病率は一般人口の約 2-4% であり、男女比はおおよそ 1:7-8 と女性に多いことが報告されている [2]。FM は命にかかわる病気ではないが、現在のところ線維筋痛症を完治させる治療法がないため、日常生活への影響が大きく、社会生活が著しく困難となることが大きな問題となっている。家族内で複数人が FM に罹患することは珍しくないが、糖尿病や高血圧などのような遺伝性要因の関与は小さいとされている。遺伝的素因より、むしろ、発病には環境要因が重要と言われている [3]。FM の発症原因は、現状では解明されていないが、FM の痛みは、痛みのある部位に原因があるのではなく、痛みを脳に伝える神経や内因性の疼痛システムに問題があると考えられている。すなわち、痛み刺激がないもしくは痛みを誘発しない程度の弱い刺激に対しても、痛みの神経が興奮する。さらに、痛み刺激が脳に伝わると、健常人では、脳から痛み刺激を抑制する反応が起こるが、FM では、痛みに対する抑制がかからないため、強い痛みを感じてしまう。FM の検査については、医療機関で一般的に実施できる血液・尿検査、レントゲン撮影、CT や MRI、エコー検査などの画像検査、脳波などを施行しても、FM に特徴的な結果は得られないことが多く、FM と診断することは難しい。このように、一般的検査で FM 特有の異常が発見できないことから、診断には、症状の内容と経過、診察によって、診断基準・分類基準を用いて診断される。米国リウマチ学会 1990 年分類基準は、全身的な慢性疼痛に加え、身体部位 18 カ所の圧痛点のうち 11 カ所以上に圧痛を認めることで FM を定義している (Fig. 1)。しかしながら、米国リウマチ学会 2010 年診断基準では、この圧痛点を利用せず、痛みと身体症状、神経・精神症状の組み合わせで線維筋痛症を診断する (Fig. 2)。この 2 つの基準が広く国際的に用いられているが、実際には、より適切に線維筋痛症の診断を行うために、両者を用い

ることが多い。現時点では、FM の根本治療はないが、疾患の中心症状である広範囲な痛みを和らげ、日常生活に影響のない程度にまでコントロールすることが重要である。FM に対する FDA 承認薬は duloxetine、milnacipran、pregabalin の 3 剤であり、本邦では duloxetine、pregabalin が保険適応となっている。なお、duloxetine および milnacipran はともにセロトニン・ノルアドレナリン再取り込み阻害薬であり、pregabalin はカルシウムチャネル $\alpha 2\delta$ サブユニットに対するリガンドである。

1. 広範囲にわたる疼痛の病歴	
定義	広範囲とは右・左半身、上・下半身、体軸部（頸椎、前胸部、胸椎、腰椎）
2. 指を用いた触診により、18箇所の圧痛点のうち11箇所以上に疼痛を認める	
定義	両側後頭部・頸椎下方部・僧帽筋上縁部・棘上筋・第2肋骨・肘外側上顆・臀部・大転子部・膝関節部
指を用いた触診は4kgの圧力で実施（術者の爪が白くなる程度） 圧痛点の判定；疼痛の自覚ではなく、患者自身の疼痛表現（ことば、態度）	
判定	広範囲な疼痛が3カ月以上持続し、上記の両基準を満たす場合 第二の疾患が存在してもよい

Fig. 1 米国リウマチ学会 1990 年分類基準

WPI; 19箇所の過去1週間の疼痛範囲数			SS症候				
顎	右	左	問題なし	軽度	中程度	重度	
肩	右	左	疲労感	0	1	2	3
上腕	右	左	起床時不快感	0	1	2	3
前腕	右	左	認知症状	0	1	2	3
胸部			合計； 点				
腹部			SS一般的な身体症候				
大腿	右	左	0；なし	1；軽度	2；中程度	3；重度	
下腿	右	左	筋肉痛	過敏性腸症候群	疲労感・疲れ	思考・記憶障害	能力低下
頸部			腹痛・腹部痙攣	しびれ・刺痛	めまい	睡眠障害	うつ
背部			上部腹痛	嘔気	神経質	胸痛	視力障害
臀部	右	左	下痢	ドライマウス	かゆみ	喘息	レイノー症状
WPI	合計； 点		耳鳴り	嘔吐	胸やけ	口腔内潰瘍	味覚障害
以下の3項目を満たすものを線維筋痛症と診断する			ドライアイ	息切れ	食欲低下	発疹	光線過敏
WPI 7以上 + SS 5以上または WPI 3-6 + SS 9以上			あざが出来やすい	抜け毛	頻尿	排尿痛	膀胱痙攣
少なくとも3カ月症候が続く			合計； 症候 点 + 身体症候 点 = 点				
他の疼痛を示す疾患ではない							

WPI；widespread pain index（疼痛拡大指数）
SS；symptom severity（疾患重症度）

Fig. 2 米国リウマチ学会 2010 年診断基準

IBS は機能性胃腸症の代表的な疾患のひとつであり、一般人口の 10-20 %が罹患していると言われている [4, 5]。IBS も命に関わる病気ではないが、お腹の痛み、便秘・下痢、不安などの症状のために日常生活に支障をきたすことがある。IBS の発症原因は完全には解明されていないが、ストレスによって精神的な不安状態になると、腸の収縮運動が激しくなり、また、痛みを感じやすい知覚過敏状態になる。この内臓痛を伴った状態が IBS の特徴である。実際に、大腸にバルーンを入れて膨らませる結腸直腸伸展刺激を与えると、健常人は強く刺激しないと腹痛を感じないのに対し、IBS 患者では弱い刺激でも内臓痛が誘発され、いわゆる内臓知覚過敏状態になっている。内臓痛は、消化管などから発生する腹痛のことであり、漠然とした間欠的な鈍い痛みが特徴で、局在もはっきりしない。心窩部から下腹部にかけて、あるいは腹部全体に痛みを感じる。内臓痛を生じる刺激は体性痛とは異なり、管腔臓器は熱刺激には反応せず、切られても痛みを感じない。一方、腸管平滑筋の過伸展や痙攣性収縮によって痛みが誘発される。IBS は、機能性消化管障害の国際的な組織である Rome 委員会により 2016 年に制定された Rome IV 基準に基づいて診断され (表 1)、症状を説明し得る器質的な異常は認められないが、痛みを伴う下痢、便秘もしくは両方を主症状とし、しばしばうつや不安などの精神疾患を伴う場合がある。また、便の形状とその頻度から便秘型、下痢型、混合型、分類不能型に分類される (表 2)。IBS の主な FDA 承認薬は、便秘型 IBS に対しては、tegaserod (5-HT₄ 受容体刺激薬)、tenapanor (Na⁺/H⁺ 交換輸送体阻害剤)、lubiprostone (ClC-2 チャンネル活性化剤)、linaclotide、plecanatide (共に、グアニル酸シクラーゼ C 受容体作動薬)、下痢型 IBS に対しては、alosetron (5-HT₃ 受容体拮抗薬)、eluxadoline (μ/κ オピオイド受容体作動薬および δ オピオイド受容体拮抗薬)、rifaximin (経口抗生物質) が挙げられる。

表 1 IBS の Rome IV 診断基準

最近3ヶ月間、月に4日以上腹痛が繰り返し起こり、次の項目の2つ以上があること

1. 排便と症状が関連する
2. 排便頻度の変化を伴う
3. 便性状の変化を伴う

期間としては6ヶ月以上前から症状があり、最近3ヶ月間は上記基準をみたすこと

表 2 IBS の分類 (Rome IV 基準)

1. 便秘型IBS (IBS-C)	硬便または兎糞状便が25%以上あり、軟便（泥状便）または水様便が25%未満のもの
2. 下痢型IBS (IBS-D)	軟便（泥状便）または水様便が25%以上あり、硬便または兎糞状便が25%未満のもの
3. 混合型IBS (IBS-M)	硬便または兎糞状便が25%以上あり、軟便（泥状便）または水様便も25%以上のもの
4. 分類不能型IBS	便性状異常の基準がIBS-C, D, Mのいずれも満たさないもの

FM および IBS は高頻度で併発していることが知られており、論文によって診断基準等の条件が異なるため割合に幅はあるが、FM 患者のうち 28-59%が IBS を発症し、IBS 患者の 32-77%が FM を発症すると報告されている [6]。しかし、それらの関連性については完全には理解されていない。これまでに、FM および IBS における共通の病態として、下行性疼痛抑制系の機能異常が報告されている [7, 8, 9, 10, 11]。Fig. 3 に示すように、通常、末梢部位で痛みが発生すると、痛みのシグナルが神経を通じて脊髄から脳へと伝えられ、脳において痛みを認識する。このように痛みを上行性に伝える経路がある一方で、痛みを抑制する機構として知られているのが下行性疼痛抑制系である (Fig. 3)。これは、脳から脊髄後角に inputs する下行性の神経が担っており、オピオイドやセロトニン、ノルアドレナリンによって賦活化される経路であることが分かっている [12, 13]。下行性疼痛抑制系の疼痛抑制機構は、中脳中心灰白質 (Periaqueductal Gray, PAG) を起点とし、吻側延髄腹側部 (Rostral Ventromedial Medulla, RVM) に走行する神経と青斑核 (Locus Ceruleus, LC) に分けることができる。RVM は主にセロトニン神経を含有し、脊髄後角にて痛みを抑制する。LC はノルアドレナリン神経を含有し、同様に脊髄後角に神経線維を伸ばし痛みを抑制する。また、RVM を構成する細胞には、発痛作用に関与する On cell と鎮痛作用に関与する Off cell が存在する。On cell は侵害受容反射（逃避反射）を起こす直前に、発火を引き起こし、疼痛の伝達を担う。一方、Off cell は通常 GABA ニューロンにより抑制を受けているが、オピオイドが GABA ニューロンを抑制すると、脱抑制により Off cell の興奮性が上昇し、下行性疼痛抑制系が活性化される。通常、脳脊髄内では痛みを伝達する神経と抑制する神経のバランスがとれており、抑制が優位となっている。しかし、ストレスや種々の障害等でこのバランスが崩れ痛みを伝達する神経が優位になると痛みを発症する。さらにこの状態が長引くことが、慢性疼痛の原因となる。なお、疼痛伝達機構における脊髄レベルでの関連受容体については、ノルアドレナリン α_2 受容体

およびセロトニン受容体 (5-HT₁₋₇) がよく知られている。α₂ 受容体はノルアドレナリンが結合することで、痛みに対して抑制的に働くが、5-HT₁₋₇ は各サブタイプによって、痛み抑制性か興奮性かが異なる。例えば、5-HT_{1A}、5-HT_{1B}、5-HT_{1D}、5-HT_{5A}、5-HT₇ は痛みに対して抑制的に作用し、5-HT_{2B} および 5-HT₃ は興奮性に作用すると報告されている [14]。なお、下行性疼痛抑制系に異常が認められる疾患としては、FM や IBS 以外にも、腰痛患者や糖尿病性神経因性疼痛などが知られている [15]。

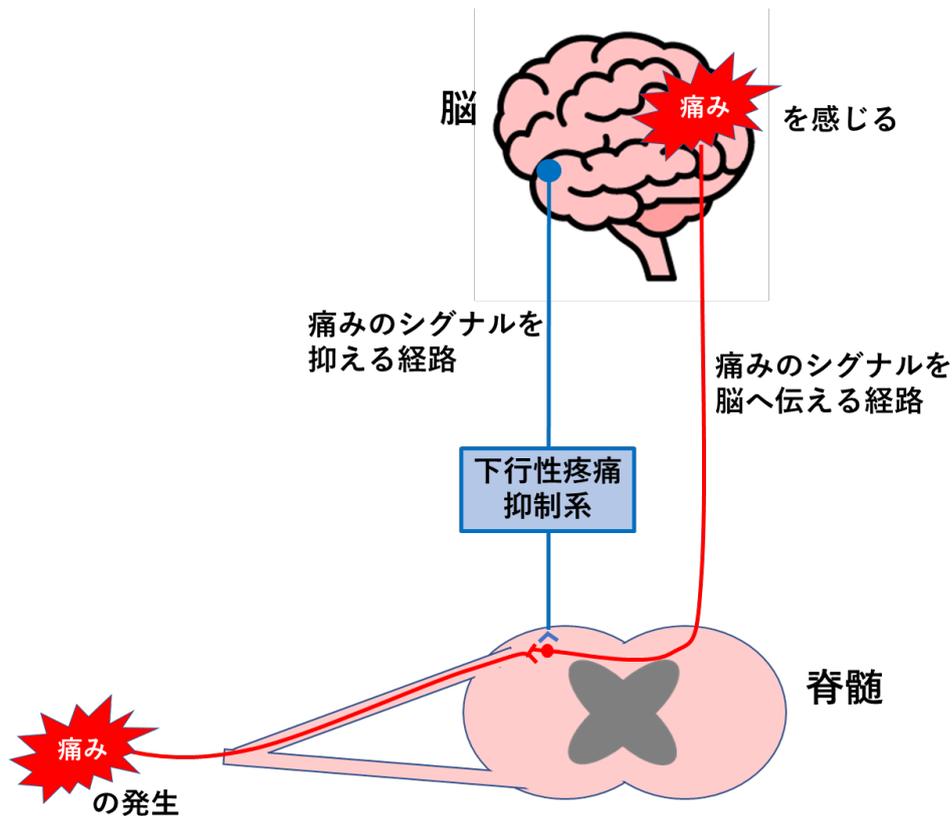


Fig. 3 下行性疼痛抑制系の概念図

下行性疼痛抑制系を検出する方法として広範囲侵害抑制調節機構 (Diffuse Noxious Inhibitory Controls, DNIC) が知られている。DNIC 反応は、いわゆる「痛みが痛みを抑制する」現象のことを言う。すなわち、ある部位に与えられた侵害性の入力 (テスト刺激) が、他の部位に与えられた侵害刺激 (条件刺激) によって抑制される現象であり、この疼痛抑制機序には下行性疼痛抑制系の賦活化が関与しているものと考えられている [16, 17]。例えば、脚もしくは腹部に痛みがあるときに手の甲を抓るなどの異所の痛み刺激を加えることで、主訴の脚もしくは腹部の痛みが軽減される現象が代表的な DNIC 反応であり、下行性疼痛抑制系の賦活化によるものである。本現象は 1979 年にフランスの Le Bars らによって初めて報告された [18, 19]。その後数々の研究が行われ、DNIC 反応は動物およびヒトどちらにおいても生

じることが報告された [20]。興味深いことに、FM 患者および IBS 患者では、このような DNIC 反応が正常に機能していないことが報告されている [7, 8, 9, 10, 11]。実際、異所での冷刺激や圧刺激により親指の爪における疼痛が健常人では抑制され DNIC 反応が認められるが、FM 患者では、親指の爪における疼痛は抑制されない [21]。また、条件刺激として右手を冷水に浸すと、テスト刺激である左手の熱刺激に対する閾値が、健常人およびうつ病患者では上昇し、DNIC 反応が認められるが、FM 患者では、そのような閾値の上昇は認められず、DNIC 反応が機能していない、すなわち、下行性疼痛抑制系に異常があると報告されている [11]。IBS 患者では、便秘型、下痢型どちらにおいても、手における異所性の冷刺激によりバルーンを用いた腸管拡張刺激に対する腹痛スコアの低下が認められないことや、足における冷刺激により掌における高温刺激に対する痛みが緩和されないことなどが報告されている [22, 23]。動物実験においては、DNIC 反応を誘発させる条件刺激に、カプサイシン、ホルマリン、カラゲニン等の薬剤処置による侵害刺激を用いた報告があり [13, 24]、いずれも、明確な疼痛閾値の上昇、すなわち DNIC 反応の誘発が認められる。

FM の病態解明のため、基礎研究においては、これまでにいくつかの動物モデルが考案されてきた。酸性食塩水を筋肉内に注射するモデル [25] や横隔膜下迷走神経を切断するモデル [26]、reserpine 投与により脊髄レベルで神経モノアミン類を減少させるモデルなどが知られている [27]。しかし、上述のように FM はストレスとの関連性が高いため、ストレスに起因した動物モデルがより有用であると考えられる。ストレス誘発 FM モデルのうち、反復寒冷 (Specific Alteration of Rhythm in Temperature, SART) ストレスは、頻繁に温度環境を急激に変化させることにより精神的および身体的ストレスを負荷させるモデルである。SART ストレスを与えた動物では、温刺激および圧刺激に対する持続的な痛覚過敏を発症し、FM の疼痛症状と類似していることが証明されている [28, 29]。実際に Ueda らは反復寒冷ストレス負荷マウスを FM の動物モデルとして提案している [28, 29]。しかし、臨床で認められるような下行性疼痛抑制系の検討は、これまでに SART モデルでは報告が無い。また、FM と IBS が高頻度で併発していることから、SART モデルにおいても IBS 様の内臓痛が認められる可能性があるが、SART モデルにおける IBS 症状に関する検討の報告も無い。なお、FM と IBS は部位の差異はあるが、どちらも慢性的な痛みを主症状とする疾患である。

末梢の神経線維は、髄鞘の有無、直径、伝導速度などにより A α 、A β 、A δ 、B、C 線維に分類される。一般に、直径が太く有髄である方が、伝導速度は早い。これらのなかで、部位のはっきりする鋭く早い痛みは、有髄で伝導速度が比較的早い A δ 線維が担い、部位のはっきりしない鈍く遅い痛みは無髄で細く、伝導速度が遅い C 線維が担っている。体性痛については、鋭い痛みの一次痛には A δ 線維が、鈍い痛みの二次痛には C 線維が主に関わっている。

内臓痛も A δ 線維、C 線維といった末梢神経で脊髄に伝えられるが、体性組織よりも線維の数が少なく、C 線維の割合が多いという特徴を持っている。

本研究の第 1 章では、SART ラットの体性痛を評価するために、von Frey テストおよび各知覚線維の疼痛評価を分けて行なうことが可能な Neurometer を用いた。von Frey テストは、von Frey Filament を用いて後肢足蹠へ触刺激を与え、その時の逃避反応や足振り動作などを指標に疼痛関連反応を評価できる試験系である。Neurometer は、3 つの異なる周波数 (5 Hz、250 Hz、2000 Hz) による経皮的電気刺激により、それぞれ無髄 C 線維、有髄 A δ 線維、有髄 A β 線維を活性化させることができる。この刺激方法を用い、それぞれの線維について知覚可能な最小強度の各電流値を評価することが出来る。これらの疼痛試験系を用いて SART ラットの DNIC 反応を評価することで、下降性疼痛抑制系の機能を検討した。さらに、SART ラットの痛覚過敏に対する薬理的評価を代表的な鎮痛薬を用いて行なった。

第 2 章では、内臓痛の観点から SART ラットの特徴づけを行なった。内臓痛は結腸直腸伸展刺激 (colorectal distension, CRD) により誘起し、その内臓痛の反応閾値を指標に DNIC 反応の評価を実施した。また、本来 IBS は器質的な病変が認められないのが特徴であるが、IBS 患者の生検結果からは腸管局所における肥満細胞やある種のサイトカインの増加などの微小炎症の存在が示唆されている [30, 31, 32]。肥満細胞は腸管炎症が起こると粘膜下へ動員され活性化される。その際、粘膜へ圧刺激が負荷されると、肥満細胞は脱顆粒し肥満細胞由来のヒスタミン、セロトニン、プロテアーゼなどのメディエーターを放出し、それらが粘膜下知覚神経の興奮を促し、痛覚過敏が生じることが報告されている [33]。そこで、SART ラットの腸管局所での変化について検討するために、肥満細胞脱顆粒の特異的なマーカーである *RMCP-II* の mRNA 発現量も検討した。さらに、SART ラットの内臓痛に対し、中枢性に作用する種々の薬剤の効果を検討した。これらの体性痛および内臓痛の評価を行なうことで、SART ラットが FM および IBS 病態モデルとして有用性であるかを検証した。

第 1 章

SART ストレス負荷ラットを用いた体性痛における下行性疼痛抑制系の機能解析

第1節 緒言

FM は慢性的かつ広範囲にわたる筋骨格系の疼痛、睡眠障害および疲労感などの症状を呈する疾患である。本疾患は器質的な病変を伴わず、また女性での発症頻度が高いことが知られている [2]。診断は、症状の内容と経過、診察によって、診断基準・分類基準を用いて診断される。米国リウマチ学会 1990 年分類基準では、全身的な慢性疼痛に加え、身体の部位 18 カ所の圧痛点のうち 11 カ所以上に圧痛を認めることで FM と診断される。一方、米国リウマチ学会 2010 年診断基準は、この圧痛点を利用せず、痛みと身体症状、神経・精神症状の組み合わせで FM を診断する。この 2 つの基準が広く国際的に用いられているが、実際には、より適切に FM の診断を行うために、両者を用いることが多い。FM の病因は不明であるが、肉体的、精神的ストレスや事故、手術などが引き金となって発症すると考えられている [3]。

FM の病態については完全には解明されていないが、視床下部・下垂体・副腎 (Hypothalamic-Pituitary-Adrenal, HPA) 系などの内分泌系の異常、髄液中の神経伝達物質の異常、さらに外傷、手術、ストレスによる知覚神経の異常などが考えられている。特に、下行性疼痛抑制系の機能異常が病因・病態に関与していることが指摘されている [9, 10]。また、DNIC 反応は、下行性疼痛抑制系を介することが知られており [16, 17]、臨床研究において、FM 患者では DNIC 反応が減弱していることが報告されている [10, 11]。これらの結果は、FM 患者において下行性疼痛抑制系が正常に機能していないことを示唆すると共に、DNIC 反応を指標とすることで、間接的に下行性疼痛抑制系の評価が可能であることが推察される。

FM の病態解明のため、これまでにいくつかの動物モデルが考案されてきた。酸性食塩水を筋肉内に注射するモデル [25] や横隔膜下迷走神経を切断するモデル [26]、reserpine 投与により神経モノアミン類を減少させるモデルなどが知られている [27]。酸性食塩水筋注モデルは酸性の生理食塩水を筋注することで、末梢の酸感受性イオンチャンネル 3 を介して中枢感作を惹起し、結果的に痛みが慢性化すると考えられている。横隔膜下迷走神経切断モデルは、自律神経バランスの不均衡が一次求心性知覚神経の機能障害を引き起こす可能性があり、内臓求心性知覚神経を強く感作して内臓痛を誘発すると考えられている。これら外科的・物理的誘発疼痛モデルに加え、FM における重要な因子であるストレスを負荷することで疼痛を惹起させるモデルのひとつに SART モデルがある。急激に温度環境を変化させることで反復寒冷ストレスを与える SART モデルは、熱刺激や機械刺激に対する持続的な痛覚過敏が惹起されることが知られ、FM モデルとして報告されている [28, 29]。その痛覚過敏の原因のひとつにモノアミン類の減少による内因性鎮痛機構の異常が関与していることが推察されている [29, 34, 35, 36]。例えば、SART ストレスマウスでは、脊髄レベルでのセロトニン代謝活性が

低下している [29]。また、臨床においても FM 患者では、脊髄内のセロトニン、ノルアドレナリン量の低下が知られている [37]。また、脊髄内モノアミン類を *reserpine* 投与によって低下させる FM 様疼痛モデルも報告されている [27]。しかし、SART モデルにおける持続的疼痛と DNIC 反応の関係性については不明である。

本章では、DNIC 反応を指標とした試験系を用いて SART ラットの体性痛における病態解析を行なった。なお、痛みを伝達する知覚神経線維は非侵害性の有髄 A β 線維と侵害性の有髄 A δ および無髄 C 線維に分類されるため、疼痛試験に繁用されている von Frey テストに加え、各知覚神経線維の疼痛評価を分けて行なうことが可能な *Neurometer* を用いてより詳細な検討を行なった [38, 39]。さらに、SART ラットの痛覚過敏に対する薬理的評価を代表的な鎮痛薬を用いて行なった。

第2節 実験材料および方法

1. 実験動物

雄性 SD 系ラット (日本クレア) を 3 もしくは 5 週齢で入荷後、12 時間の明暗サイクル (明期 07:30-19:30)、定温定湿 (温度 24 ± 1 °C、湿度 $55 \pm 5\%$) のもと金属ケージにて 5 匹ずつ群飼育し、1 週間飼育環境に馴化させ試験に供した。飼育期間中、動物は自由摂食および自由飲水とした。なお、動物実験は社内動物実験倫理委員会規定に従って実施した。

2. 使用薬物

Pregabalin (TAK-M-179)、naproxen (WAKO 147-07201) および duloxetine (Luna Chemicals) は 0.5% methylcellulose 400 (WAKO 133-14255) に懸濁し、10-30 mg/kg の用量で経口投与した。Capsaicin (WAKO 030-11353) は ethanol (WAKO 057000456) に溶解後、等量の Tween 80 (WAKO 164-21775) を添加し、50 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ のストックを作製した。Capsaicin ストック溶液は使用時に生理食塩液 (大塚製薬 024-6L2) にて 2.5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ に希釈し、50 μL をラット左前肢足蹠に皮下投与した。Naloxone (SIGMA N7758) は生理食塩液に溶解後 3 mg/kg の用量で腹腔内投与もしくは 10 $\mu\text{g}/\text{rat}$ の用量で脳室内投与し、yohimbine (SIGMA Y3125) および WAY-100635 (SIGMA W108-5MG) は生理食塩液に溶解し、それぞれ 30 $\mu\text{g}/\text{rat}$ および 3 $\mu\text{g}/\text{rat}$ の用量で脊髄腔内投与した。Morphine (武田薬品工業 H003) は生理食塩液に溶解し、100 $\mu\text{g}/\text{site}$ あるいは 10 $\mu\text{g}/\text{rat}$ の用量でそれぞれ右後肢足蹠あるいは脳室内に投与した。

3. 機械および電気刺激に対する疼痛反応閾値測定

機械刺激に対する疼痛反応は electronic von Frey (IITC 社 ALMEMO 2390-5) を用いて評価した (Fig. 4)。ラットを観察ケージの環境に 20-30 分馴化させた後、electronic von Frey 本体に装着した von Frey filament (26 g 用) をラット右後肢足底に垂直にゆっくり押し当てた。ラットが機械刺激に対し回避反応を示した値 (g) を 2 回測定し、その平均値を反応閾値とした。ただし、2 回の値が 8 g 以上離れた場合は更にもう 1 回測定し、計 3 回の平均値を反応閾値とした。なお、SART ストレス負荷前の反応閾値が 12 g 以下であった個体は、非ストレス下でも痛覚過敏状態であると判断し試験から除外した。薬効評価の際には SART ストレス負荷 5 日後もしくは 7 日後において、薬物投与前の反応閾値をもとに群分けを行い、pregabalin、naproxen あるいは duloxetine の経口投与 2 あるいは 3 時間後に反応閾値を測定した。

各知覚線維選択的な反応閾値の測定は Neurometer (ニューロトロン社 CPT/C) を用いて行なった (Fig. 5)。まず、測定中の動物を安定化させるためラットの全身をタオルで軽く包んだ。

次に、ハンダで作製した直径 5 mm 程度の電極に電導ジェル (GTGL-10D/3) を塗布し、ラットの右後肢足甲および足底に粘着ソフトテープ (SFTP-100) を用いて取り付けました。知覚神経線維 ($A\beta$ 、 $A\delta$ および C 線維) の刺激にはそれぞれ 2000 Hz、250 Hz および 5 Hz の正弦波電流を用い、 $A\beta$ 線維刺激は 5 秒間隔で 5 μA ずつ、 $A\delta$ および C 線維刺激は 5 秒間隔で 2 μA ずつ電流を上昇させた。各周波数の電気刺激に対し、ラット右後肢足の屈曲反応が認められた電流値 (μA) を反応閾値とし、3 回の平均値を求めた。

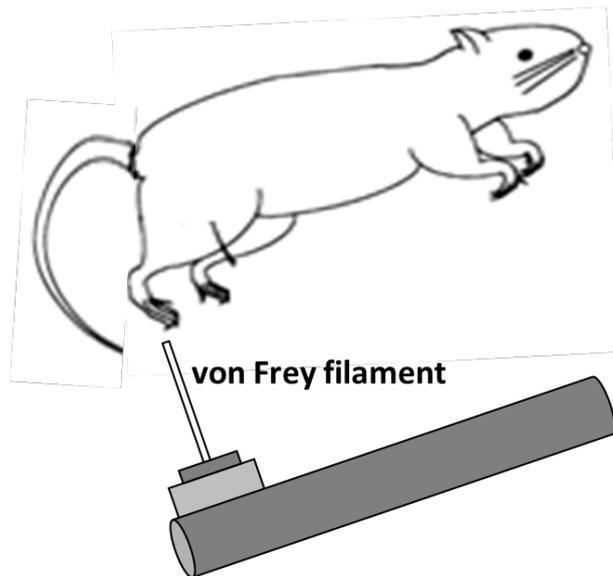


Fig. 4 von Frey テストの概要図

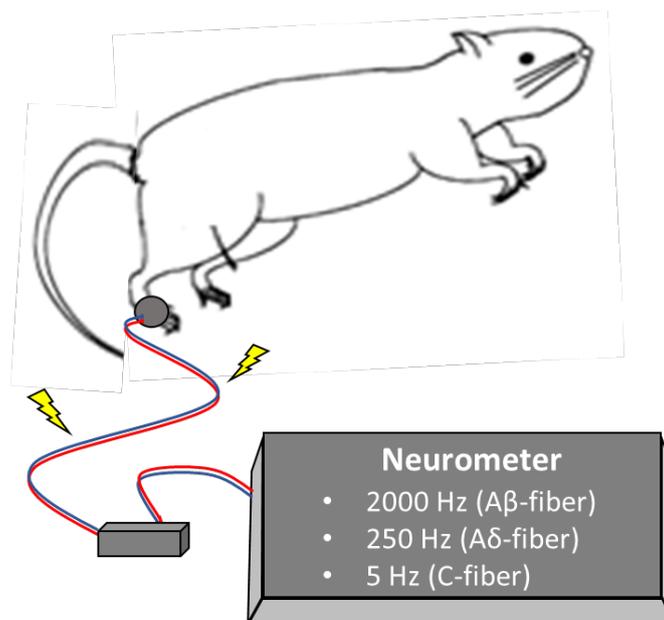


Fig. 5 Neurometer テストの概要図

4. DNIC 反応の評価

DNIC 反応の条件刺激には、既報を参考に capsaicin を用いた [24]。イソフルラン麻酔下において、条件刺激として capsaicin を 125 $\mu\text{g}/50\mu\text{L}/\text{site}$ の用量でラット左前肢足に皮下投与し、30、60、90 および 120 分後に von Frey filament、もしくは 90 分後に Neurometer を用いて疼痛反応閾値の測定を行なった。また一部の実験では、DNIC 反応における下行性疼痛抑制系の関与を検討するため、各種拮抗薬による DNIC 反応に対する影響を評価した。 μ -オピオイド受容体拮抗薬 naloxone は capsaicin 処置の直前または 15 分前にそれぞれ腹腔内 (3 mg/kg) または脳室内 (10 $\mu\text{g}/\text{rat}$) に投与した。 α_2 受容体拮抗薬 yohimbine (30 $\mu\text{g}/\text{rat}$) あるいは 5-HT_{1A} 受容体拮抗薬 WAY-100635 (3 $\mu\text{g}/\text{rat}$) は capsaicin 処置の 15 分前に脊髄内投与した。なお、いずれの薬物も過去の報告を参考に、単独投与では疼痛閾値に影響しない用量を用いた [13, 40]。

5. SART ストレス負荷

金属ケージを 2 つの区画に区切り、各区画 4-5 匹ずつとなるように 4 週齢の雄性 SD 系ラット (日本クレア) を群飼育した。ストレス負荷初日は、16:30 からラットを低温環境 (0 °C, SANYO インキュベーターMIR-554) に入れ、一晩放置した。2 日目から 4 日目は、9:30-16:30 の間、飼育ケージを 1 時間ごとに低温環境 (0 °C) と室温環境 (24 °C) とを移動させ、16:30-09:00 の間は低温環境下にて飼育した (Fig. 6)。5 日目は 9:30 に低温環境から室温環境に移動させ、ストレス負荷を終了させた。なお SART ストレス負荷中、ラットは自由摂食、自由飲水とし、低温による凍傷を防ぐ目的で金属ケージの底にプラスチックボードを敷いた。また、SART ストレス負荷終了後は室温環境下で飼育し、ストレス負荷終了直後から 14 日後の期間内で各種疼痛試験に用いた。

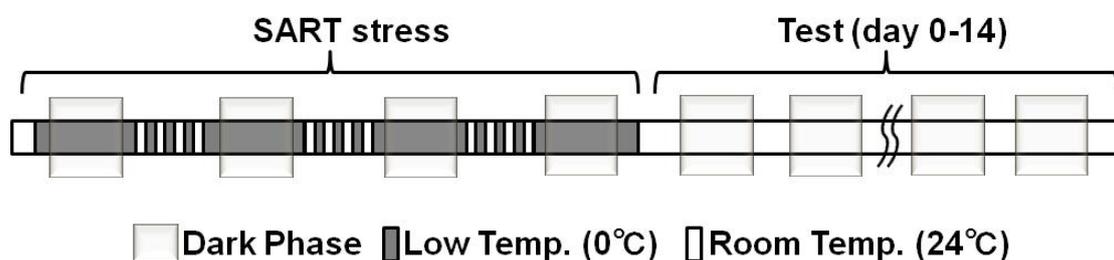


Fig. 6

Experimental design of SART stress.

Four-week-old rats were exposed to 0 and 24 °C in alternate 1 hour period during 9:30-16:30 and kept at 0 °C during 16:30-9:30 for 4 days. After the stress session, rats were maintained at 24 °C and used for pain tests.

6. 脳室内カニューレ留置

ペントバルビタール (50mg/kg, i.p.) 麻酔下にて、ラットを脳定位固定装置 (KOPF) に固定後、正中線沿いに頭皮を切開した。Bregma (矢状縫合と冠状縫合の交点) より側方へ 1.5 mm、後方へ 0.8 mm の位置にマーキングし、その位置の頭蓋骨にドリルで穴を開けた。更に、カニューレを強固に固定するためのアンカーねじ用の穴を投与用の穴の付近に 3箇所開け、脳を傷付けないようにそこへアンカーねじを埋め込んだ。投与用の穴にガイドカニューレを頭蓋表面から 4.5 mm 腹側へ下げて埋め込み、歯科用セメント (クイックレジン) にてガイドカニューレおよびアンカーねじを固定した。歯科用セメントの乾燥を待って、ガイドカニューレ (23G 5.2 エイコム) にダミーカニューレ (23G 5.2 エイコム) およびキャップナット (CA-1) を装着した。感染予防の目的で切開部にタリビット点眼液を数的滴下し、皮膚を縫合した。術後のラットは単飼育し、定期的に体重の測定および一般状態の観察を行い、異常の認められた個体は安楽死させた。術後 10-14 日の回復期間をおいて試験に供した。脳室内投与はマイクロシリンジおよびマイクロインジェクションカニューレを用いて総量 5 uL を 30 秒間かけて投与し、投与液の逆流を防ぐため投与終了 30 秒後にマイクロインジェクションカニューレを抜いた。

7. 統計学的解析

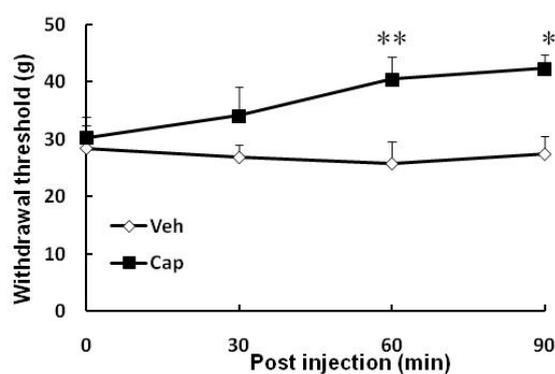
全てのデータは平均値±標準誤差で示した。統計学的有意差の検定には PCP 統計解析システムの paired t-test、Student's t-test または Williams-test を用い、 $P < 0.05$ (t-test) または $P < 0.025$ (William's-test) の場合に有意差があると判断した。

第3節 結果

1. 正常ラットにおける capsaicin 誘発 DNIC 反応の検出

初めに、正常ラットを用いて DNIC 反応の検出系について検討した。von Frey filament を用いた試験では、capsaicin 投与群は投与 30 分後から反応閾値が上昇し、60 および 90 分後ではその上昇は有意なものであった。一方、溶媒投与群では反応閾値の上昇は全く認められなかった (Fig. 7A)。Capsaicin 投与 90 分後に Neurometer を用いて知覚線維選択的な電気刺激に対する反応閾値を測定したところ、A β 、A δ および C 線維すべてにおいて有意な反応閾値の上昇が認められた (Fig. 7B)。これらのことから、条件刺激として左前肢足への capsaicin 皮下投与、テスト刺激として右後肢足への von Frey filament あるいは Neurometer による刺激を用いることにより反応閾値の上昇すなわち DNIC 反応が観察されることを確認した。

A



B

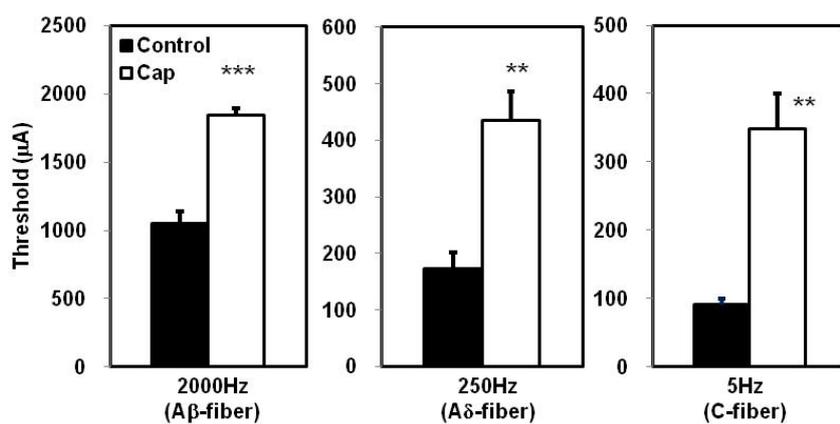


Fig. 7

Detection of capsaicin-induced DNIC by using von Frey filament and Neurometer.

Capsaicin (Cap, 125 $\mu\text{g}/\text{rat}$) or vehicle (Veh) was injected into the intraplantar region of the forepaw. A. Withdrawal thresholds were measured by the von Frey filament at baseline and 30, 60, and 90 min after vehicle or capsaicin injection. B. Withdraw thresholds were also measured by Neurometer 90 min after capsaicin or vehicle injection. Data are presented as mean \pm S.E.M. (n=6). *: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$, ***: $P < 0.001$ vs. vehicle group (Student's t-test).

Itomi et al., *European Journal Pharmacology*. 2016, 784, 61-68.

2. DNIC 反応における下行性疼痛抑制系の関与

次に、今回認められた capsaicin 誘発 DNIC 反応と下行性疼痛抑制系の関連性について、各種受容体拮抗薬を用い、von Frey filament 試験において解析を行なった。DNIC は全身性のオピオイド受容体を一部介した反応であるため、まず、 μ -オピオイド受容体拮抗薬 naloxone 腹腔内投与による影響を検討した。naloxone の腹腔内投与は、capsaicin 誘発 DNIC 反応を完全に抑制し、その抑制効果は少なくとも 90 分間持続した (Fig. 8A)。次に、オピオイドは脳内の PAG や RVM を介して下行性疼痛抑制系を賦活化することから、DNIC 反応に対する naloxone 脳室内投与の影響についても検討したところ、DNIC 反応は同様に完全に抑制された (Fig. 8B)。さらに、下行性疼痛抑制系は、脊髄レベルにおいて $\alpha 2$ 受容体および 5-HT_{1A} 受容体を介していることから、各拮抗薬による脊髄内投与の影響を検討した。 $\alpha 2$ 受容体拮抗薬 yohimbine の脊髄内投与は、capsaicin 投与 30 分後において DNIC 反応を有意に抑制し、 5-HT_{1A} 受容体拮抗薬 WAY-100635 の脊髄内投与は少なくとも 90 分間は DNIC 反応を完全に抑制した (Fig. 8C, D)。

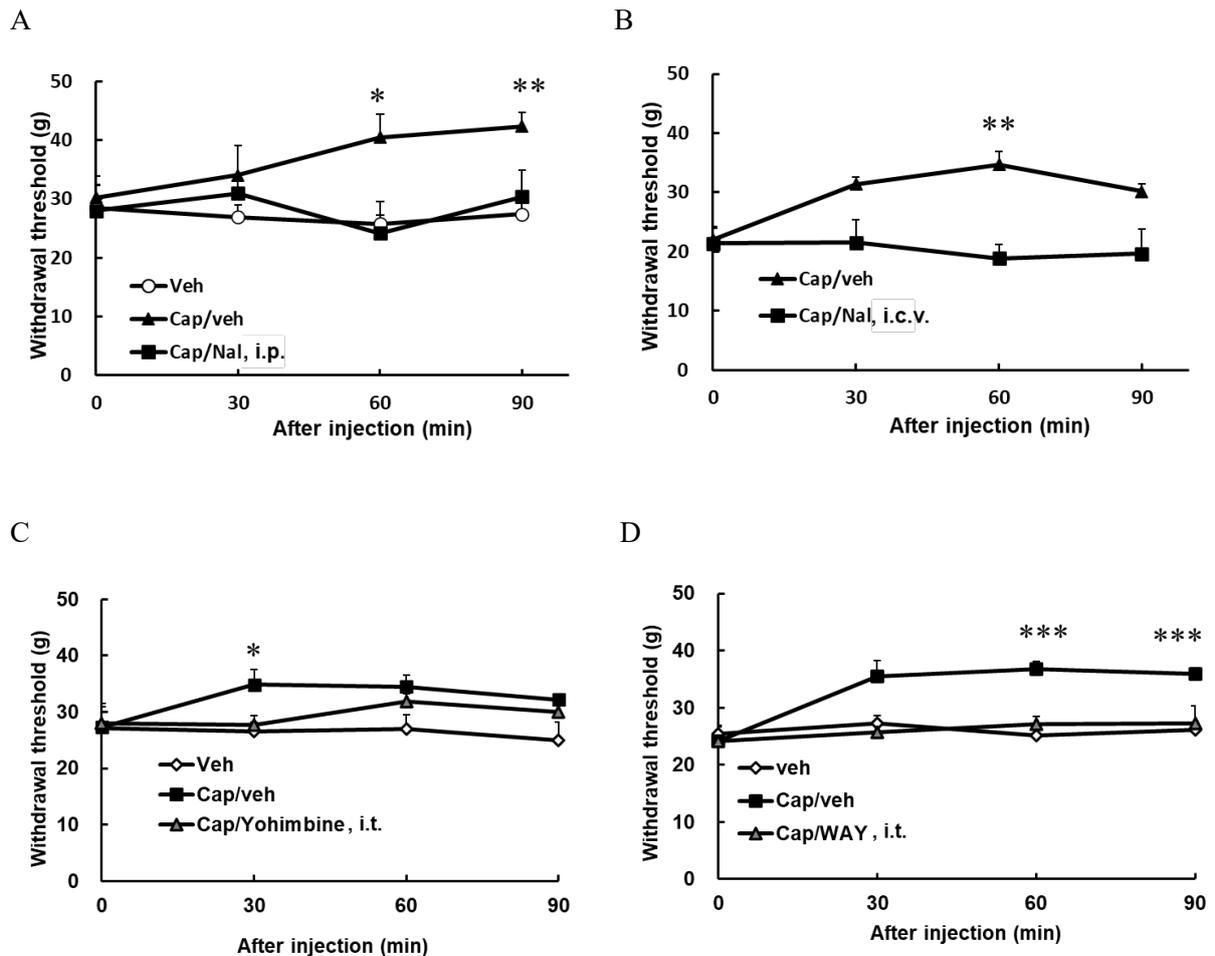


Fig. 8
Effects of naloxone (A, B), yohimbine (C), and WAY-100635 (D) on capsaicin-induced DNIC in control rats.

Naloxone (Nal, i.p.) was administered just before capsaicin (Cap) injection, and naloxone (i.c.v.), yohimbine (i.t.), and WAY-100635 (WAY, i.t.) were injected 15 min before capsaicin injection. Withdrawal thresholds were determined by the von Frey filament tests at the designated times. Data are presented as mean \pm S.E.M. (n=4-6). *: $P < 0.05$, ***: $P < 0.001$ vs. vehicle group (Student's t-test). #: $P < 0.01$ vs. Cap/Nal, group (Student's t-test). i.p.; intraperitoneally, i.t.; intrathecally, i.c.v.; intracerebroventricularly.

Itomi et al., *European Journal Pharmacology*. 2016, 784, 61-68.

3. SART ラットにおける痛覚閾値の変化

4 週齢のラットに SART ストレスを負荷したところ、ストレス負荷中は体重増加抑制が認められたが、ストレス負荷終了後は正常群と同様に体重増加した (data not shown)。von Frey テストを用いた疼痛反応閾値の経日的な検討結果から、SART ラットではストレス負荷によ

り顕著な反応閾値の低下、すなわち痛覚過敏が認められ、その痛覚過敏はストレス負荷終了後少なくとも 12 日間は持続した (Fig. 9)。

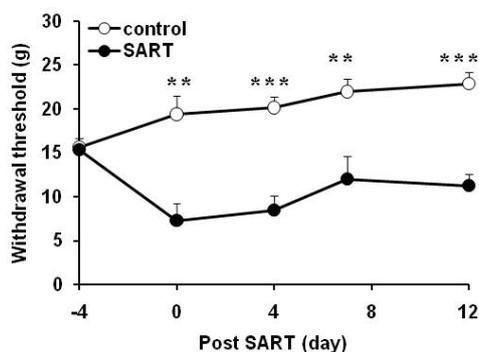


Fig. 9

Changes in the withdrawal threshold in SART rats.

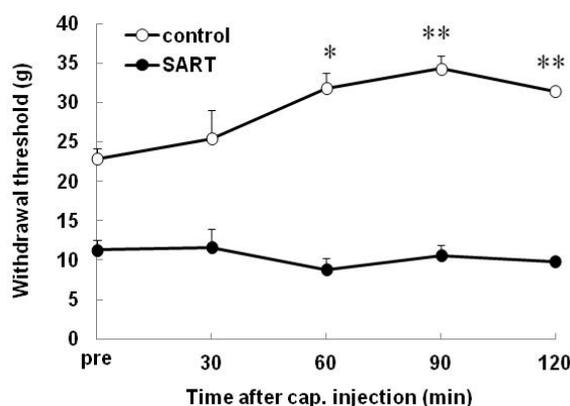
Withdrawal thresholds were measured at designated days in control and SART rats by von Frey test. Data were presented as mean \pm S.E.M. (n=5-6). **: P<0.01, ***: P<0.001 vs. control (Student's t-test).

Itomi et al., *European Journal Pharmacology*. 2016, 784, 61-68.

4. SART ラットにおける DNIC 反応の検討

痛覚過敏の持続している SART ストレス負荷終了 12 日後に、DNIC 反応を正常ラットと比較検討した。von Frey テストにおいて、正常ラットでは Fig. 7 と同様に機械的刺激に対し、capsaicin による持続的な反応閾値の上昇が認められたが、SART ラットでは反応閾値の上昇は全く認められなかった (Fig. 10A)。このことから、正常ラットでは機能している DNIC 反応が SART ラットでは破綻していることが明らかとなった。さらに Neurometer を用い、ストレス負荷終了 12 日後に SART ラットにおける各種知覚神経繊維の DNIC 反応を検討した。その結果、capsaicin 投与 120 分後において、A β 線維刺激に対する反応閾値の上昇は認められたが、A δ および C 線維刺激に対する反応閾値は capsaicin 投与前と変化は認められなかった (Fig. 10B)。

A



B

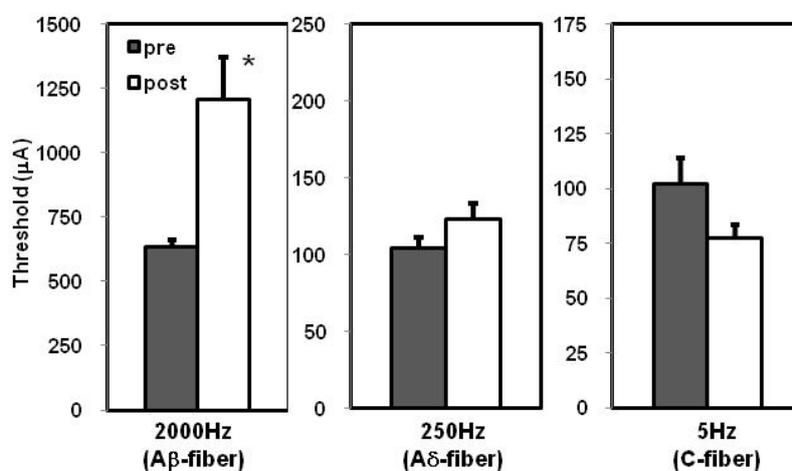


Fig. 10

Deficit of capsaicin-induced DNIC in SART rats.

Rats received an intraplantar injection of capsaicin to the left forepaw 12 days after completion of SART stress. Withdrawal thresholds were measured by the von Frey tests at the designated times after capsaicin injection (A). Withdrawal thresholds to fiber-specific electrical stimulation were also measured by the Neurometer 120 min after capsaicin injection (B). Pre and post indicate before and after capsaicin injection, respectively (B). Data are presented as mean \pm S.E.M. (n=5-6). *: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$ vs. pre-injection value (Student's t-test).

Itomi et al., *European Journal Pharmacology*. 2016, 784, 61-68.

5. SART ラットの痛覚過敏に対する鎮痛薬の効果

次に、SART ストレス誘発痛覚過敏に対する各種鎮痛薬の効果を von Frey テストにより検討した。試験には FM 治療薬として FDA から認可されているカルシウムチャンネル $\alpha 2\delta$ サブユ

ニットに対するリガンドの pregabalin およびセロトニン・ノルアドレナリン再取り込み阻害薬 (Serotonin noradrenaline reuptake inhibitor, SNRI) の duloxetine に加えて、非ステロイド性抗炎症薬 naproxen を用いた。これら鎮痛薬の効果は痛覚過敏の持続している SART ストレス終了 5 日後あるいは 7 日後に評価した。Pregabalin (30 mg/kg, p.o.) は SART ストレス誘発痛覚過敏に対し有意な改善作用を示し、改善後の反応閾値は正常群とほぼ同程度であった (Fig. 11A)。また、duloxetine (10, 30 mg/kg, p.o.) は用量依存的に痛覚過敏を改善し、30 mg/kg では有意な作用が認められた (Fig. 11B)。一方、naproxen (30 mg/kg, p.o.) は SART ストレス誘発痛覚過敏に対し鎮痛作用を全く示さなかった (Fig. 11A)。

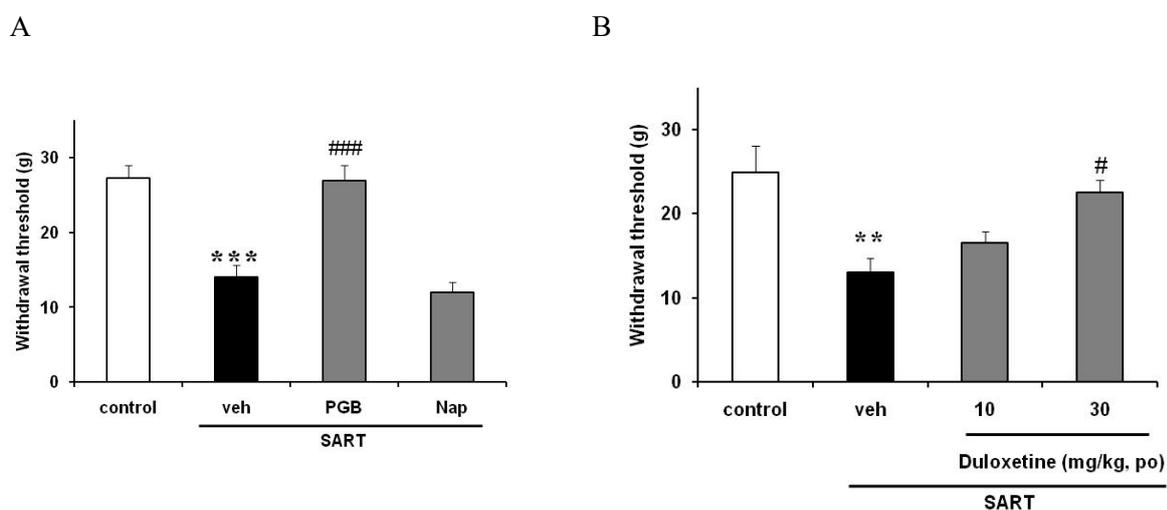


Fig. 11

Pharmacological profiles in SART rats.

Pregabalin (PGB, 30 mg/kg, p.o.), naproxen (Nap, 30 mg/kg, p.o.) or vehicle (veh) was administered five days after the SART stress protocol (A) and duloxetine (10 or 30 mg/kg, p.o.) seven days after the SART stress protocol (B). Pain tests were conducted using the von Frey filaments 2 h (PGB and Nap) or 3 h (Duloxetine) after drug administrations. Data are presented as mean \pm S.E.M. (n=4-6). **: P<0.01, ***: P<0.001 vs. control (Student's t-test, A and B). #: P<0.025 vs. vehicle-treated SART-stressed rats (Williams test, B). ####: P<0.001 vs. vehicle-treated SART-stressed rats (Student's t-test, A).

Itomi et al., *European Journal Pharmacology*. 2016, 784, 61-68.

6. SART ラットにおける morphine の鎮痛効果

SART ラットにおけるオピオイドを介した鎮痛機構を検討するため、 μ オピオイド受容体作動薬である morphine による鎮痛効果を評価した。SART 誘発痛覚過敏が持続しているストレス負荷 11 日後および 14 日後に、morphine をそれぞれ後肢足蹠皮下 (100 μ g/site, i.pl.) およ

び脳室内に (10 $\mu\text{g}/\text{rat}$, i.c.v.) 投与し、30 分後に反応閾値を測定した。その結果、morphine 足蹠皮下投与による反応閾値の上昇は正常ラットと同程度であったが、脳室内投与による上昇は正常ラットに比べ顕著に減弱していた (Fig. 12A, B)。

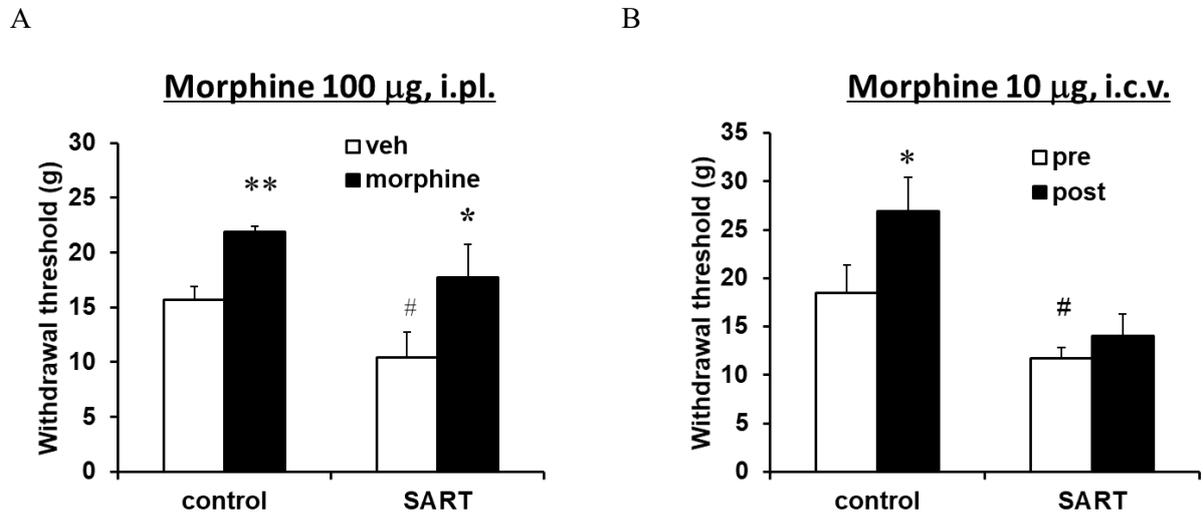


Fig. 12

Effect of morphine on mechanical hyperalgesia in SART rats.

Rats were received intraplantar (100 μg , i.pl., A) or intracerebroventricular (10 μg , i.c.v., B) injection of morphine 11 or 14 days after the SART stress protocol, respectively. Withdrawal thresholds were measured by the von Frey test 30 min after vehicle (veh) or morphine injection. Pre and post indicate before and after morphine injection, respectively (B). Data are presented as mean \pm S.E.M. (A; n=4-5, B; n=9-10). *: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$ vs. vehicle (Student's t-test, A) or pre-morphine value (Student's t-test, B). #: $P < 0.05$ vs. control rats (Student's t-test, B).

Itomi et al., *European Journal Pharmacology*. 2016, 784, 61-68.

第4節 考察

本章では、まず正常ラットにおいて DNIC 反応が下行性疼痛抑制系を介した現象であることを薬理学的手法を用いて確認した後、反復寒冷ストレスモデルである SART ラットにおいて DNIC 反応の破綻、すなわち下行性疼痛抑制系の異常について検討した。なお、より詳細に疼痛機序を解析するため、von Frey テストに加えて、各知覚神経線維 (非侵害性有髄 A β 線維、侵害性有髄 A δ および侵害性無髄 C 線維) を選択的に刺激することができる Neurometer を用いて疼痛を評価した。

下行性疼痛抑制系を介した DNIC 反応は、IBS や FM 患者では減弱し、そのことが慢性的な内臓痛や体性痛などの症状を引き起こしている可能性が考えられている [7, 8, 10, 11, 23]。また、FM 患者では脳内オピオイド受容体の結合活性が減弱していることや [41]、脳脊髄液中のセロトニンやノルアドレナリンレベルが低下していること [37] が報告されており、これらの変化が FM 患者における下行性疼痛抑制系の異常に寄与しているものと考えられる。

動物実験における DNIC 反応の評価方法はいくつか報告されているが [13, 42, 43, 44]、本研究では capsaicin により DNIC 反応を誘発する試験系を用いた [24]。ラットの左前肢足に capsaicin を投与することで、von Frey filament および Neurometer 誘発の刺激に対する反応閾値の上昇が認められ、本実験系において DNIC 反応を検出できることを確認した (Fig. 7)。基本的に DNIC 反応は痛み刺激によって誘発されるものであるが、Neurometer を用いた DNIC 反応の検討では、痛みではなく触刺激を伝達する A β 線維の刺激時も DNIC 反応が観察された。これは A β 線維を刺激するために用いた 2000 Hz の電気刺激が、痛みに似た不快な感覚も誘発していた可能性が推察される。また Neurometer による反応閾値の測定時にはラットをタオルで包み補正しているため、常に触刺激、すなわち A β 線維刺激が入力されている可能性があることなどから、A β 線維における結果の解釈には注意が必要である。

また、capsaicin 誘発 DNIC 反応が naloxone の腹腔内投与により抑制されたことは、DNIC 反応に内因性オピオイドが関与しているという報告と一致する (Fig. 8A) [12, 13, 42, 45, 46]。次に、capsaicin 誘発 DNIC 反応が下行性疼痛抑制系を介した現象であることを確認するために薬理的解析を行なった。下行性疼痛抑制系には PAG や RVM、脊髄におけるオピオイドやノルアドレナリン、セロトニンの関与が知られていることから [47, 48, 49]、DNIC 反応におけるそれら内因性鎮痛物質に対する受容体拮抗薬の影響を検討した。その結果、von Frey テストにおいて capsaicin 誘発 DNIC 反応はオピオイド受容体拮抗薬 naloxone の脳室内投与、 α_2 受容体拮抗薬 yohimbine あるいは 5-HT_{1A} 受容体拮抗薬 WAY-100635 の脊髄内投与により抑制された。これらの結果は、DNIC 反応には下行性疼痛抑制系の賦活化が関与していることを示唆している (Fig. 8B, C, D)。

また、脊髄レベルではノルアドレナリンおよびセロトニンが下行性疼痛抑制系に関与しているが、今回の DNIC 反応における各種拮抗薬を用いた検討では、DNIC 反応は $\alpha 2$ 受容体拮抗薬 yohimbine に比べて 5-HT_{1A} 受容体拮抗薬 WAY-100635 の脊髄内投与の方が顕著に DNIC 反応を抑制した。このことから、本試験における DNIC 反応の条件では、5-HT_{1A} の寄与がより大きいと考えられる。

SART ラットにおける capsaicin 誘発 DNIC 反応の評価を実施する前に、SART ラットの疼痛反応を検討した。その結果、SART ストレスを負荷することで機械刺激に対する持続的な痛覚過敏が惹起されることが明らかとなった (Fig. 9)。続いて、SART ラットにおいて capsaicin 誘発 DNIC 反応を検討したところ、von Frey テストでは DNIC 反応はほぼ完全に消失していた (Fig. 10A)。これらの結果より、SART ラットでは FM 患者と同様に、下行性疼痛抑制系の機能異常が生じているものと推察される。今回の検討では SART ラットの脳脊髄液中のモノアミン類の濃度は測定していないが、それらの濃度が低下することで下行性疼痛抑制系の異常が誘発された可能性も考えられる。また、興味深いことに、Neurometer を用いた検討では DNIC 反応の破綻は侵害性線維 A δ および C 線維のみで認められ、非侵害性線維の A β 線維では DNIC 反応が維持されていた (Fig. 10B)。A β 線維を介した反応が SART ラットにおいて低下していなかったことから、通常では痛みを感じない刺激によって痛みを感じてしまうアロディニア (異痛症) は発症していないと解釈できるかもしれない。実際に、von Frey テストではフィラメントが足に触れるだけで逃避反応を示す様なアロディニア様の反応は観察されなかった。なお、SART ラットにおける DNIC 反応は A β 線維刺激時でも認められ、von Frey テストの結果と一致しなかったことから、von Frey filament による機械的刺激には A β 線維の関与は少ないものと考えられる。A β 線維における DNIC 反応が SART ラットでも維持されていた理由は現段階では不明であり、今後より詳細な検討が必要である。上述のように、本章における A β 線維の結果の解釈には注意が必要であるが、少なくとも侵害刺激を与えた際に DNIC 反応が減弱することは、FM 患者における知見と一致している。

SART ラットにおいて認められた痛覚過敏に対して薬理的検討を行なったところ、pregabalin および duloxetine は鎮痛効果を示したが、naproxen は示さなかった (Fig. 11)。今回使用した pregabalin および duloxetine は FDA より FM 治療薬として承認され臨床利用されていることから [50, 51, 52, 53, 54, 55]、SART ラットは FM の病態を反映したモデルであると言える。また非ステロイド性抗炎症薬である naproxen が全く鎮痛効果を示さなかったことは、SART ラットにおいて炎症関連メディエーターであるプロスタグランジン類の関与が低いことを示唆している。実際、FM 患者は症状を説明し得る血液検査の異常や炎症がない場合が多く、FM 患者における疼痛に対し naproxen は有効ではないことが報告されている [56, 57]。

SART ラットにおける下行性疼痛抑制系の異常を詳細に検討するため、外因性オピオイドによる鎮痛効果について検討した。その結果、モルヒネ後肢足蹠皮下投与による鎮痛効果は、正常および SART ラットにおいて同程度認められた (Fig. 12)。これらのことから、SART ラットでは末梢組織での炎症等の変化はなく、また、末梢性にモルヒネを処置した場合には、正常ラットと同様に鎮痛効果が得られたと考えられる。一方で、モルヒネ脳室内投与による鎮痛効果は SART ラットにおいて顕著に減弱していた (Fig. 12)。これらの結果は、SART ラットでは末梢ではなく中枢性のオピオイド受容体を介した鎮痛機構に異常があることを示唆している。また、FM 患者においてモルヒネによる鎮痛効果が得られにくいことや [58]、脳内オピオイド受容体の発現量低下もしくは内在化によって受容体結合能が低下していること [41] と矛盾しない。このように、SART ラットにおいて中枢性オピオイド受容体を介した鎮痛効果の減弱が DNIC 反応の破綻、すなわち下行性疼痛抑制系の異常を引き起こしていることが推察された。上記のように、今回の検討では、SART におけるモルヒネによる鎮痛効果は、脳室内投与では減弱していたが、足蹠皮下投与では、正常ラットと同程度認められた。一方、臨床においては、モルヒネの鎮痛効果は全身投与でも得られにくいことが報告されていることを考えると、SART ラットにおいてモルヒネ足蹠皮下投与で鎮痛効果が低減していなかったことは、必ずしも臨床像と一致する結果ではない。FM 患者では、脳内オピオイドの受容体結合活性の低下や、その下流で下行性疼痛抑制系に関わる脊髄内モノアミン量が低下しているが、そのことは、おそらく SART ラットでも同様である可能性がある。今回の検討では、脊髄内モノアミン量の測定は行っていないが、同様の反復寒冷ストレスモデルにおいて、脊髄内セロトニン代謝活性に異常があり、セロトニン量の低下を示す報告もある [29]。さらに、SART ラットにおける疼痛反応が SNRI である duloxetine で改善した 1 つのメカニズムとして、低下していた脊髄内ノルアドレナリンもしくはセロトニン量が duloxetine により増加したことで下行性疼痛抑制系が賦活化されたことが考えられる。いずれにしても、SART では少なくとも、中枢性のオピオイド受容体を介した鎮痛機構に異常があり、このことは、FM 患者における臨床像と同様である。ただし、SART ラットにおける末梢性のモルヒネの作用は、臨床とは異なるため、今後 SART ラットを用いたオピオイド作用薬の評価をする際には注意が必要である。

今回の検討では、SART ラットにおける DNIC 反応の破綻を捉えるに留まったが、今後の課題としては、SART ラットにおける DNIC 反応の改善を検討するような試験が必要である。例えば、5HT₃ 拮抗薬のアロセトロンもしくはオンダンセトロンや選択的ノルアドレナリン再取り込み阻害剤のレボキセチンを用いて、内因性鎮痛機構を調節することで SART ラットにおける DNIC 反応の消失が回復するかを検討することが、非常に重要であると考えられる。

以上、本章では、正常ラットにおいて capsaicin により DNIC 反応が誘発され、それは下行性疼痛抑制系を介した現象であることを確認した。また、SART ラットは持続的な痛覚過敏を示し、その原因として DNIC 反応の消失、すなわち下行性疼痛抑制系の機能異常が関与していることが考えられた。さらに、SART ラットは FM 患者と類似した薬剤反応性を示した。これらの結果から、SART ラットは FM 患者における疼痛の特徴を有したモデルであり、FM の病態解明および鎮痛薬の評価に有用であると考えられる。

第5節 小括

本章では、ストレス誘発の動物モデルである SART ラットの FM モデルとしての有用性を検討するため、体性痛における下行性疼痛抑制系および薬剤反応性の評価を実施し、次の知見を得た。

1. 反復寒冷ストレスを負荷した SART ラットは持続的な痛覚過敏状態を示した。
2. 正常ラットで認められた capsaicin 誘発 DNIC 反応は、SART ラットでは消失しており、SART ラットにおける下行性疼痛抑制系の異常が示唆された。
3. SART ラットの痛覚過敏に対する鎮痛薬の反応性は、FM 患者のものと類似していた。
4. 以上のことから、SART ラットは FM 病態を反映したモデルであり、FM における慢性疼痛の病態解明に有用なモデルであると考えられる。

第2章

SART ストレス負荷ラットを用いた内臓痛における下行性疼痛抑制系の機能解析

第1節 緒言

機能性胃腸症の代表的な疾患の一つである過敏性腸症候群 (Irritable Bowel Syndrome, IBS) は、有病率が一般人口の 10-20 %であり、また消化器科を受診する患者のうち 25-50 %が罹患していると言われている [4, 5]。IBS は命に関わる病気ではないが、お腹の痛み、便秘・下痢、不安などの症状のために日常生活に支障をきたすことがある。IBS の発症原因は完全には解明されていないが、ストレスによって精神的な不安状態になると、腸の収縮運動が激しくなり、また、痛みを感じやすい知覚過敏状態になる。実際、大腸にバルーンを入れて膨らませる結腸直腸伸展刺激を与えると、IBS 患者では弱い刺激でも腹痛が誘発され、いわゆる腸管知覚過敏状態になっている。腸管知覚過敏のため内臓痛を伴う便性状の変化を有するのが IBS 特徴である。内臓痛は、消化管などから発生する腹痛のことであり、漠然とした間欠的な鈍い痛みが特徴で、局在もはっきりしない。IBS は 2016 年に策定された Rome IV 基準に基づいて診断され、症状を説明し得る器質的な異常は認められないが、痛みを伴う下痢、便秘もしくは両方を主症状とし、しばしば鬱や不安などの精神疾患を伴う場合がある。また、第1章の FM と同様に、IBS 症状の発症および増悪には心理的ストレスが深く関与していることが知られており、両疾患は高い頻度で併発する。IBS 患者においては、FM 患者と同じく下行性疼痛抑制系の機能異常が認められ、このことが IBS における慢性的な内臓痛の原因のひとつとなっている可能性がある [7, 8, 23]。例えば、健常人では腸管拡張刺激に対する内臓痛スコアは異所性の冷刺激により低下するが、IBS 患者ではそのような内臓痛スコアの低下は認められない [14]。同様に、IBS 患者では異所性の冷刺激を与えると、高温刺激に対する反応閾値の上昇が認められないことが報告されている [23]。

第1章において、FM の動物モデルとして考えられている SART ラットが、FM 患者と同様に体性痛における DNIC 反応の破綻、すなわち下行性疼痛抑制系に異常があることを見出した。しかし、これまでに IBS の動物モデルを用いて内臓痛における下行性疼痛抑制系の機能を検討した報告は無い。下行性疼痛抑制系の機能異常を伴う IBS モデルを新たに確立することは、IBS における内臓痛の病態解明および新規 IBS 治療薬の開発のために重要である。上述のように、SART ラットは FM モデルとしての特徴を有することから、IBS 様の内臓痛および下行性疼痛抑制系の異常が SART ラットでも認められれば、本モデルは FM および IBS 両疾患を併発した動物モデルとしても有用であることが期待できる。

そこで本章では、FM モデルである SART ラットを用いて、内臓知覚過敏の評価および内臓痛における下行性疼痛抑制系の評価を実施した。また、IBS は器質的な病変が認められないのが特徴であるが、IBS 患者の生検結果からは腸管局所における肥満細胞やある種のサイトカインの増加などの微小炎症の存在が示唆されている [30, 31, 32]。そこで、SART ラット

の腸管局所での変化についても検討するために、肥満細胞脱顆粒の特異的なマーカーである RMCP-II の発現量も検討した。さらに、SART ラットの内臓痛に対する各種薬剤の薬効評価を実施することで、SART ラットの IBS モデルとしての特徴付けを試みた。本章で使用した 5-HT₃ 受容体拮抗薬 alosetron、セロトニン・ノルアドレナリン再取り込み阻害薬 duloxetine および Corticotropin releasing factor (CRF) 1 受容体拮抗薬 T-3047928 は、いずれも標的タンパク質が脳・脊髄にも発現していることから、中枢性に内臓痛抑制効果が期待される薬剤である。なお、アロセトロンは FDA から承認された下痢型 IBS 治療薬であるが、重篤な便秘や虚血性大腸炎などの有害事象を引き起こしたため、その使用は制限されている。そのため、アンメットメディカルニーズはまだ高いと言える。また、CRF1 受容体拮抗薬については、これまで非常に多くの非臨床・臨床研究が行われ、CRF1 を介した生体反応が IBS 病態に寄与していることが証明されているが、臨床試験において成功した CRF1 受容体拮抗薬はないのが現状である [59]。その原因としては、化合物の好ましくない体内動態、高いタンパク結合率、低い拮抗活性、副作用などが考えられる。

第 2 章では、SART ラットにおける内臓痛の評価および上記薬剤の内臓痛に対する効果を検討することによって、SART ラットの IBS モデルとしての有用性を検証した。

第2節 実験材料および方法

1. 実験動物

雄性 SD 系ラット (日本クレア) を 3 週齢もしくは 5 週齢 で入荷後、12 時間の明暗サイクル (明期 07:30-19:30)、定温定湿 (温度 24 ± 1 °C、湿度 55 ± 5 %) のもと金属ケージにて 5 匹ずつ群飼育し、1 週間飼育環境に馴化させ試験に供した。飼育期間中、動物は自由摂食および自由飲水とした。なお、動物実験は社内動物実験倫理委員会規定に従って実施した。

2. 使用薬物

Alosetron Hydrochloride (Bosche Scientific A11036)、duloxetine (Luna Chemicals) および T-3047928 (武田薬品工業) は 0.5 % methylcellulose 400 (WAKO 133-14255) に懸濁し、5 ml/kg の容量で経口投与した。Capsaicin (WAKO 030-11353) は ethanol (WAKO 057000456) に溶解後等容量の Tween 80 (WAKO 164-21775) を添加し、50 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ のストック溶液を作製した。capsaicin ストック溶液は使用時に生理食塩液 (大塚製薬 024-6L2) にて 2.5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ に希釈し、イソフルラン麻酔下に 150 $\mu\text{g}/60\mu\text{L}$ の用量でラット左前肢足蹠に皮下投与した。

3. SART ストレス負荷

金属ケージを 2 つの区画に区切り、各区画 4-5 匹ずつとなるように 4 週齢の雄性 SD 系ラット (日本クレア) を群飼育した。ストレス負荷初日は、16:30 からラットを低温環境 (0 °C, SANYO インキュベーターMIR-554) に入れ、一晩放置した。2 日目から 4 日目は、9:30-16:30 の間、飼育ケージを 1 時間ごとに低温環境 (0 °C) と室温環境 (24 °C) とを移動させ、16:30-09:00 の間は低温環境下にて飼育した (Fig. 6)。5 日目は 9:30 に低温環境から室温環境に移動させ、ストレス負荷を終了させた。なお SART ストレス負荷中、ラットは自由摂食、自由飲水とし、低温による凍傷を防ぐ目的で金属ケージの底にプラスチックボードを敷いた。また、SART ストレス負荷終了後は室温環境下で飼育し、ストレス負荷終了直後から 14 日後の期間内で各種疼痛試験に用いた。

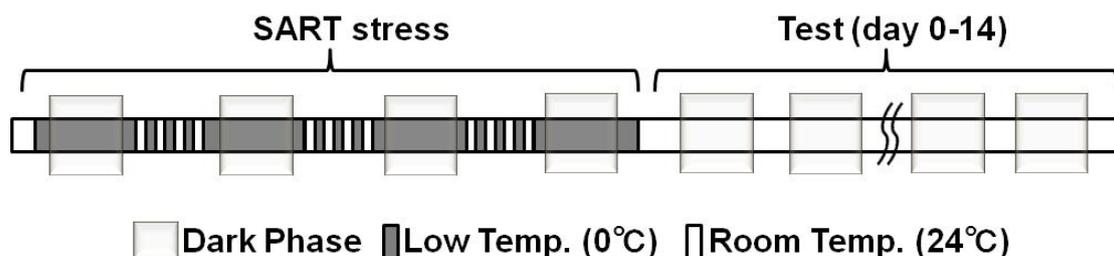


Fig. 6

Experimental design of SART stress.

Four-week-old rats were exposed to 0 and 24 °C in alternate 1 hour period during 9:30-16:30 and kept at 0 °C during 16:30-9:30 for 4 days. After the stress session, rats were maintained at 24 °C and used for pain tests.

4. Visceromotor response (VMR) の測定

ポリエチレンチューブ (HIBIKI, size:6) およびラテックスコンドームで作製した直径 3 cm のバルーンに潤滑剤 (K-Y Lubricant jelly, J&J) を塗布し、バルーンの先端が肛門より口側 5 cm の位置にくるように挿入した。腸管拡張 (colorectal distension, CRD) 刺激を与える前に、ラットは観察ケージ内の環境に 30 分程度馴化させたが、その際チューブがラットに噛まれないように金属製スプリングにより保護した。Barostat (biotec 社) を用いてバルーン内圧を 30 秒間隔で 5 mmHg ずつ上昇させることで腸管に圧負荷を与えた。その際、CRD による内臓痛関連行動 (体をよじる、背を弓なりにする、腹部を床に押付けるなど) が 3 段階の圧で連続して観察されたところで終了し、内臓痛関連行動が初めて観察された圧を閾値 (mmHg) とした。なお、腸管拡張刺激は 2 回行い 2 回の平均値をそのラットの内臓痛閾値とした。

薬効評価については、alosepron はストレス負荷終了 5 日後 (day 5) に、duloxetine は day 11 に、T-3047928 は day 5 に評価を行なった。測定日に、薬物投与前の内臓痛閾値を測定し、その値をもとに各群の平均値および分散が均等になるように群分けを行なった。薬物投与後の内臓知覚過敏の測定は、既報を参考に [60, 61, 62]、alosepron は 1 時間、duloxetine は 3 時間、T-3047928 は 2 時間後に行なった。

5. DNIC 反応の評価

内臓痛における DNIC 反応の評価は以下に示す方法により行なった (Fig. 13)。上記の要領で求めた内臓痛閾値よりも 5 mmHg 高い圧を 3 回与え、そのうち 2 回以上痛み関連行動が観察されることを確認し、その圧を pre 値とした。痛み関連行動が 1 回以下の場合はさらに 5 mmHg 高い圧を加え、同様の試験を行なった。Pre 値を求めた後、イソフルラン麻酔下にお

いて、capsaicin を 150 μ g/60 μ L/site の用量でラット左前肢足蹠に皮下投与した。その 60 分後に pre 値と同じ圧を 3 回加え、2 回以上痛み関連行動が観察された場合はその圧を post 値とした。痛み関連行動が 1 回以下の場合はさらに 5 mmHg 高い圧を加え、2 回以上痛み関連行動が観察されるまで圧を 5 mmHg ずつ上昇させた。

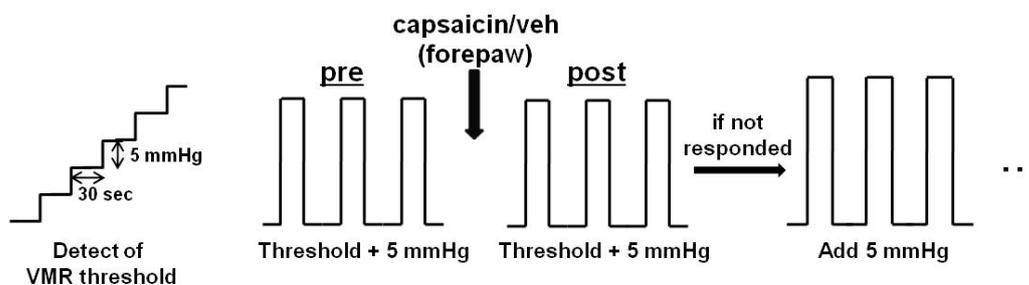


Fig. 13

Method for DNIC detection on visceral pain in rats.

VMR threshold to colorectal distention (CRD) was determined by stepwise increases in colorectal balloon pressure (5 mmHg increments every 30 sec). To determine pre DNIC values, rats were subjected to three times CRDs of 5 mmHg higher than VMR threshold. If rats were not responded 2 or more, CRD with additional 5 mmHg was given until VMR was elicited reliably. One hour after injection of vehicle or capsaicin, rats were subjected to the same CRD pressure as the pre DNIC value. If that pressure elicited a VMR twice or more in three sessions, it was defined as the post value. If not, the CRD pressure was raised by another 5 mmHg until the rat responded reliably.

6. RMCP-II mRNA の発現解析

SART ストレス負荷終了 13 日後のラットの遠位結腸を摘出し、粘膜と筋層に分離した。氷冷した ISOGEN (ニッポンジーン) 中に摘出した組織をジルコニアボール (アズワン, YTZ-5, 5 mm) と共に振動させることで粉碎した。ISOGEN のプロトコールに従い、懸濁液より全 RNA を抽出し全 RNA 量を定量後、200 μ g/mL に希釈した。希釈した全 RNA より Superscript III First-Strand cDNA Synthetic Kit (Invitrogen) を用いて cDNA を合成した。cDNA を Distilled Water (DNase, RNase free, Invitrogen) にて 10 倍希釈し、2 μ L をリアルタイム定量 PCR に使用した。cDNA (2 μ L)、Master Mix (7.5 μ L, Applied Biosystems; TaqMan® Universal Master Mix II) および RMCP-II (0.75 μ L, Applied Biosystems; Rn00756479_g1) または GAPDH (0.45 μ L, Applied Biosystems; TaqMan® Rodent GAPDH Control Reagents) を混合し、Distilled Water により全量 15 μ L とした。反応条件は denaturation (95°C, 5 秒間)、annealing (60°C, 1 分間) に設定し、

7900HT Fast Realtime PCR system にて増幅した。RMCP-II のサイクル数を GAPDH のサイクル数にて補正し、GAPDH 発現量に対する RMCP-II 発現量の比を算出した。

7. 恐怖条件付けストレス (Conditioning fear stress, CFS)

ラットは入荷直後からケージあたり 4 匹でペーパーチップの床敷き飼いとすした。また動物のエンリッチメントを目的としてプラスチック製トンネル (K3245 or K3326-EC, Bioserv) をケージ内に設置した。床敷きは週 3 回交換し、交換時に動物に触れる以外は特別なハンドリングは実施しなかつた。

試験の 1 日目、ラットを観察ボックス (illumination: 180 lux, white noise: 50 dB, cage type: square) に入れ、合図 (cue) および電気ショック (0.16mA, 3sec, Image FZ4:小原医科産業) を与えた。電気ショックと cue の関係および電気ショックの負荷プロトコールを図式化して Fig. 14 に示した。Cue には長さ 6 秒の音を用い、電気ショックは cue の後半の 3 秒間に負荷した。なお、この電流の負荷によりラットは軽く足踏みするが、痛みによる啼鳴などは観察されなかつた。この cue および電気ショックのセットを 1 分間隔で 15 回負荷することで恐怖条件付けを行なつた。非ストレスラットには、観察ボックス内で 15 分間の cue のみ与えた。

2 日目は、Fig. 15 に示すように、前日とは異なる条件の観察ボックスにラットを入れ (illumination: 100 lux, white noise: 60 dB, cage type: triangle)、電気ショックを負荷せず、cue のみを与えることによって、15 分間恐怖ストレスを負荷した。装置を連続して別の個体に使用する場合は、観察ボックス内側および電気ショックのグリッドやプレートは、個体ごとに水洗し 10%エタノール溶液にて拭き取つた。排便数を安定させるため、二日目の排便数測定は 14 時までには終了するよう検討を行なつた。

排便実験時は、観察ボックスに動物を入れて cue が開始するまで 2 分間待ち、この間の排便を除去した後、15 分間の cue を動物に与えた。この 15 分間の cue による恐怖ストレスによって誘発される排便を回収し、排便数を測定した。

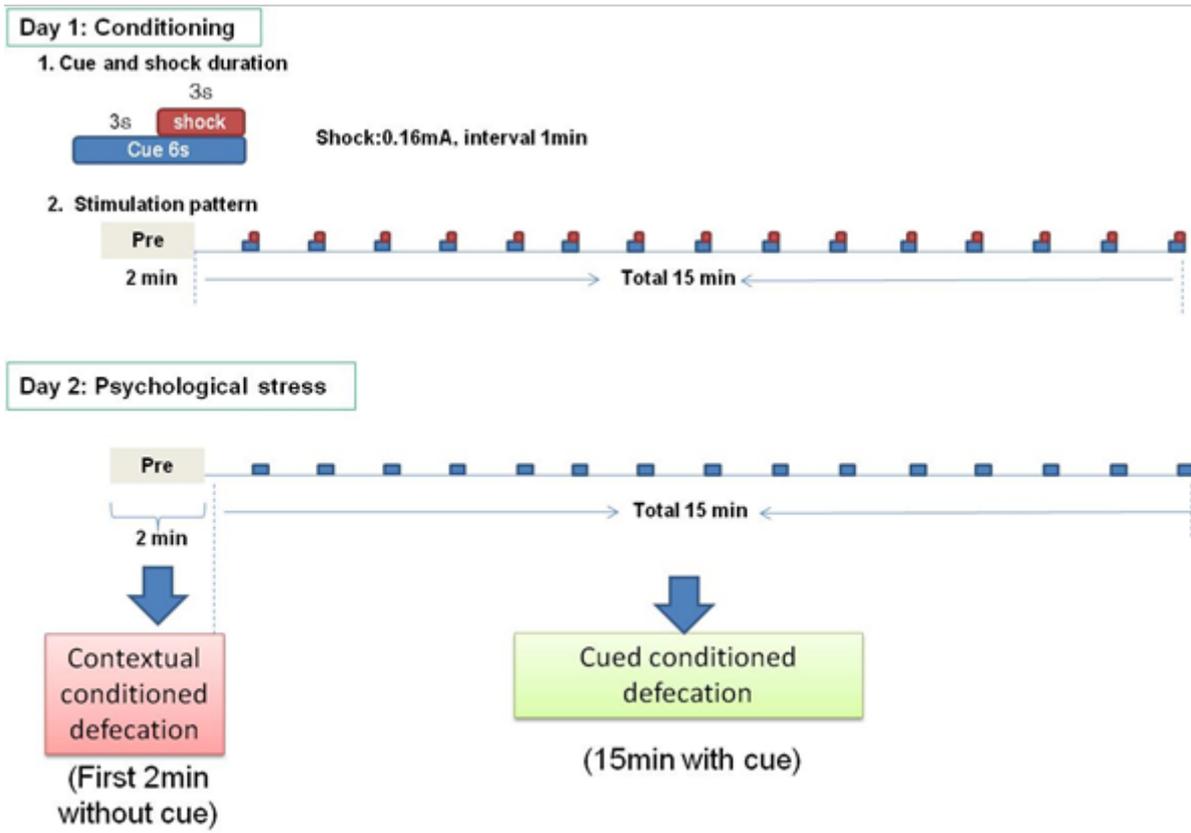


Fig. 14

Conditioning pattern and overall schedule in this study.

On the first day, electric foot shock (0.16 mA, 3s) was applied with short (6s) cue (sound) 15 times with 1 min interval. On the next day, animals were put in the same observation box with different shape of cage, illumination, noise level (Details were shown in Table 1). The cue with same interval of day1 was applied without electric shock as a psychological stress. After animals were transferred in observation box, the fecal pellets excreted for 2 min without cue were collected as “contextual conditioned defecation”. And the fecal pellet outputs with scheduled cue for 15 min were counted as “cued conditioned defecation”.

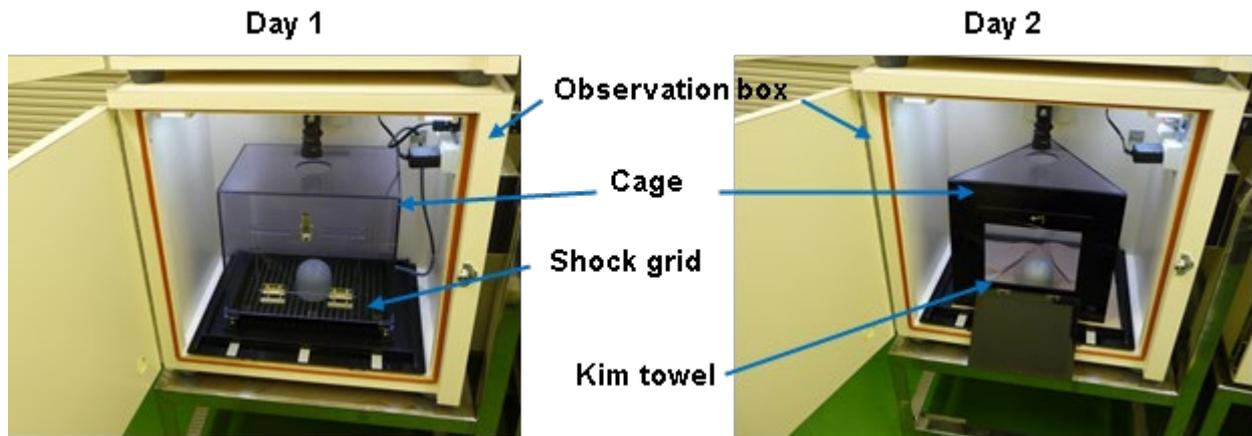


Fig. 15

Representative environmental factors which were different on day 1 and 2.

On day 1, a square cage with steel grid on black floor was placed in a observation box with 180 lux illumination and 50 db white noise. On day 2, a triangle cage with brown Kim towel floor was placed in a observation box with 100 lux illumination and 60 db white noise.

8. 拘束ストレス (Restraint stress, RS)

実験には雄性 SD ラット(体重 250-370g、床敷き飼育、日本チャールス・リバー株式会社)を用いた。実験当日、動物を行動実験室に搬出し、1 時間以上の馴化の後、試験を開始した。プラスチック製の拘束ケージでラットを 1 時間拘束することにより拘束ストレスを負荷した。拘束ストレス負荷後、ラットに被検薬を経口投与し、腸管拡張用バルーン (バルーン長 4 cm、先端が肛門から 5-6 cm) を挿入し、観察ケージに移動させた。Alosetron は 0.5%メチルセルロースを用いて懸濁し、経口投与した。T-3047928 も同じく 0.5%メチルセルロースを用いて懸濁し、経口投与した。薬物投与から 1 時間後、barostat によりバルーンを伸展させることで CRD 刺激を与え、内臓痛関連行動を観察した。刺激圧は 0 mmHg から 30 秒毎に 5 mmHg ずつ漸増させ、明確な疼痛反応を惹起する刺激圧を疼痛閾値とし、2 回の施行の平均値を算出した。

9. 統計学的解析

全てのデータは平均値±標準誤差で示した。統計学的有意差の検定には PCP 統計解析システムの paired t-test、Student's t-test または Williams-test を使い、 $P < 0.05$ (t-test) または $P < 0.025$ (William's-test) の場合に有意差があると判断した。

第3節 結果

1. SART ラットにおける内臓知覚過敏

4週齢のSDラットに4日間のSARTストレスを負荷したところ、体重増加の抑制が認められたが、体重減少は認められなかった。また、ストレス負荷終了後は正常ラットと同様の体重増加を示した (data not shown)。SARTストレス負荷終了日において、CRDに対する明らかな過敏反応すなわち内臓知覚過敏が認められ、その状態は1週間持続した (Fig. 16)。また、別実験においてSARTストレス負荷終了17日後も内臓知覚過敏が持続していることを確認した (Fig. 17)。

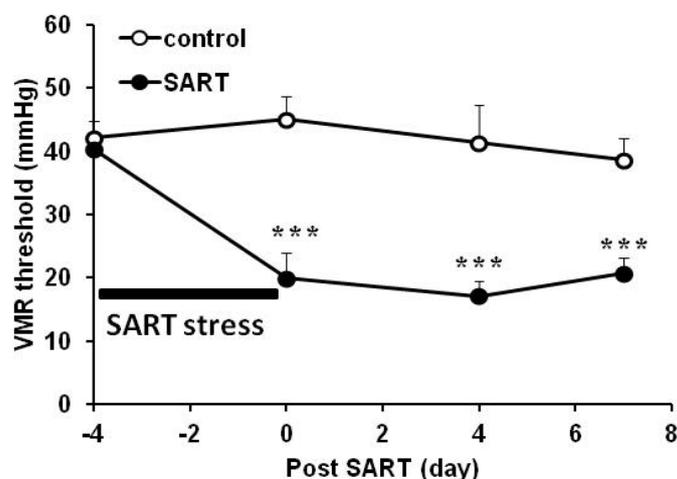


Fig. 16

The time course of change in VMR thresholds in control and SART rats.

The animals were either kept in normal housing at 24 °C or exposed to SART stress and the thresholds of VMR to CRD were determined on the designated days. Data are presented as mean \pm SE (n = 7–14). ***P < 0.001 vs. pre value (paired t-test).

Itomi et al., *Journal of Pharmacological Science*. 2015, 129, 26-30.

2. 正常ラットおよびSARTラットの内臓痛におけるDNIC反応

正常ラットを用いて、capsaicin処置による内臓痛におけるDNIC反応について検討した。Capsaicin 150 μ g/siteを左前肢足へ投与したところ、CRD誘発の内臓痛に対する有意な閾値の上昇が観察されたが、溶媒投与群では、その閾値の上昇は認められなかった (Fig. 17)。

次に、SARTラットでの内臓痛におけるDNIC反応を検討するため、内臓知覚過敏状態が持続しているSARTストレス負荷終了17日後に、上記のDNIC反応を誘発する条件にてCRDに対する閾値を測定した。その結果、正常ラットの結果とは異なり、SARTラットではcapsaicin処置による閾値上昇は観察されず、DNIC反応は認められなかった (Fig. 17)。

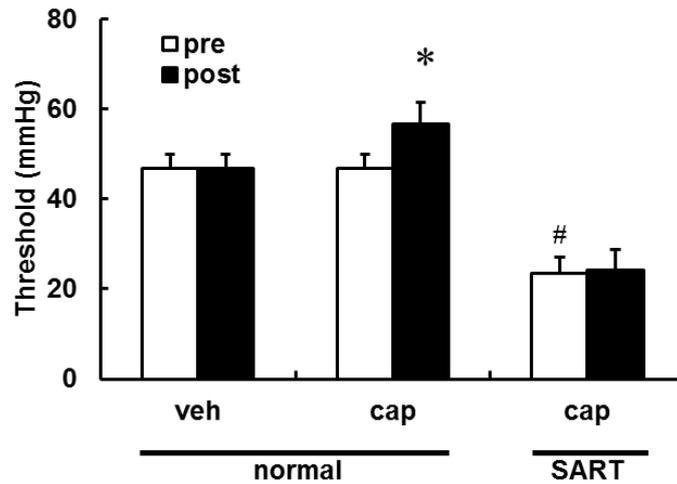


Fig. 17

Capsaicin-induced DNIC on visceral pain in normal and SART rats.

Pre values of VMR threshold were determined before the injection of vehicle or capsaicin in both normal and SART rats 17 days after SART stress protocol. One hour after the injection, post VMR threshold values to CRD were determined. Data are presented as mean \pm S.E.M. (n = 6). *P < 0.05 vs. pre value in normal (paired-t test), #P < 0.05 vs. pre value in normal (Student's t-test).

Itomi et al., *Journal of Pharmacological Science*. 2015, 129, 26-30.

3. SART ラット遠位結腸における RMCP-II mRNA の発現

SART ラットにおける腸管肥満細胞の活性化について検討するため、SART ストレス負荷終了 13 日後のラットより遠位結腸を摘出し、粘膜層および筋層における RMCP-II mRNA の発現を検討した。その結果、粘膜層および筋層のいずれにおいても、SART および正常ラットの RMCP-II mRNA 発現量の間には有意な差は認められなかった (Fig. 18)。

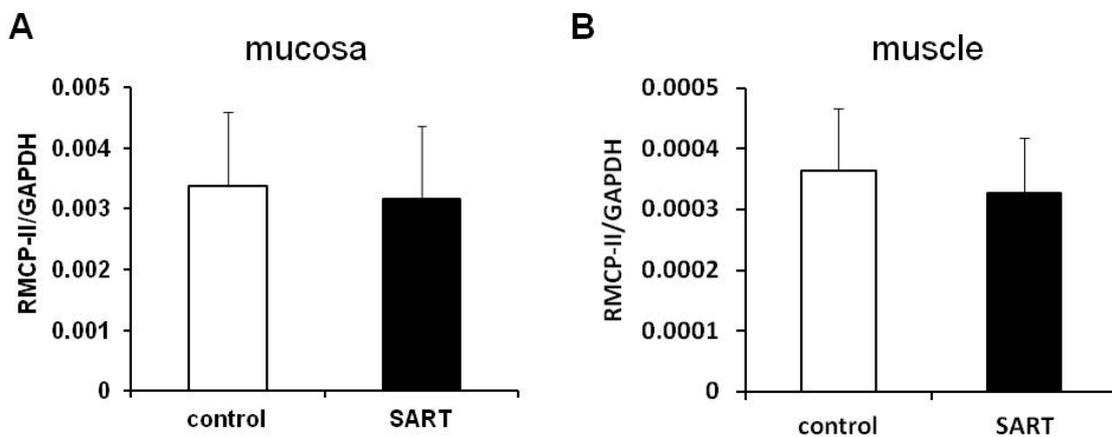


Fig. 18

Expression levels of RMCP-II mRNA in distal colon of control and SART rats.

Mucosa (A) and muscle (B) were obtained from the distal colon of control and SART rats 13 days after SART stress protocol. Expression level of RMCP-II mRNA was analyzed by RT-PCR. Data are presented as mean \pm S.E.M. (n = 5).

Itomi et al., *Journal of Pharmacological Science*. 2015, 129, 26-30.

4. SART ラットにおける内臓知覚過敏に対する薬理的検討

SART ラットの内臓知覚過敏に対する alosetron、duloxetine および T-3047928 の効果を内臓知覚過敏が十分に持続しているストレス負荷終了 5-11 日後に検討した。Alosetron (3 および 10 mg/kg, p.o.) は内臓知覚過敏に対し用量依存的かつ有意な改善作用を示した。また、正常群の反応閾値を 100%、SART ラットの溶媒投与群の反応閾値を 0%として、薬物処置群の改善率を算出した。Alosetron (3 および 10 mg/kg, p.o.) の改善率はそれぞれ 30.4%および 60.9%であった (Fig. 19A)。また、duloxetine (10 および 30 mg/kg, p.o.) も同様に内臓知覚過敏に対して用量依存的な改善作用を示し、改善率はそれぞれ 28.0%および 64.0%であった (Fig. 19B)。さらに、CRF1 受容体拮抗薬 T-3047928 (3 および 10 mg/kg, p.o.) も用量依存的な内臓痛改善効果を示し、改善率はそれぞれ 31.5%および 90.6%であった (Fig. 19C)。本検討で用いた薬剤の中では、CRF1 受容体拮抗薬の改善効果が最も顕著であった。

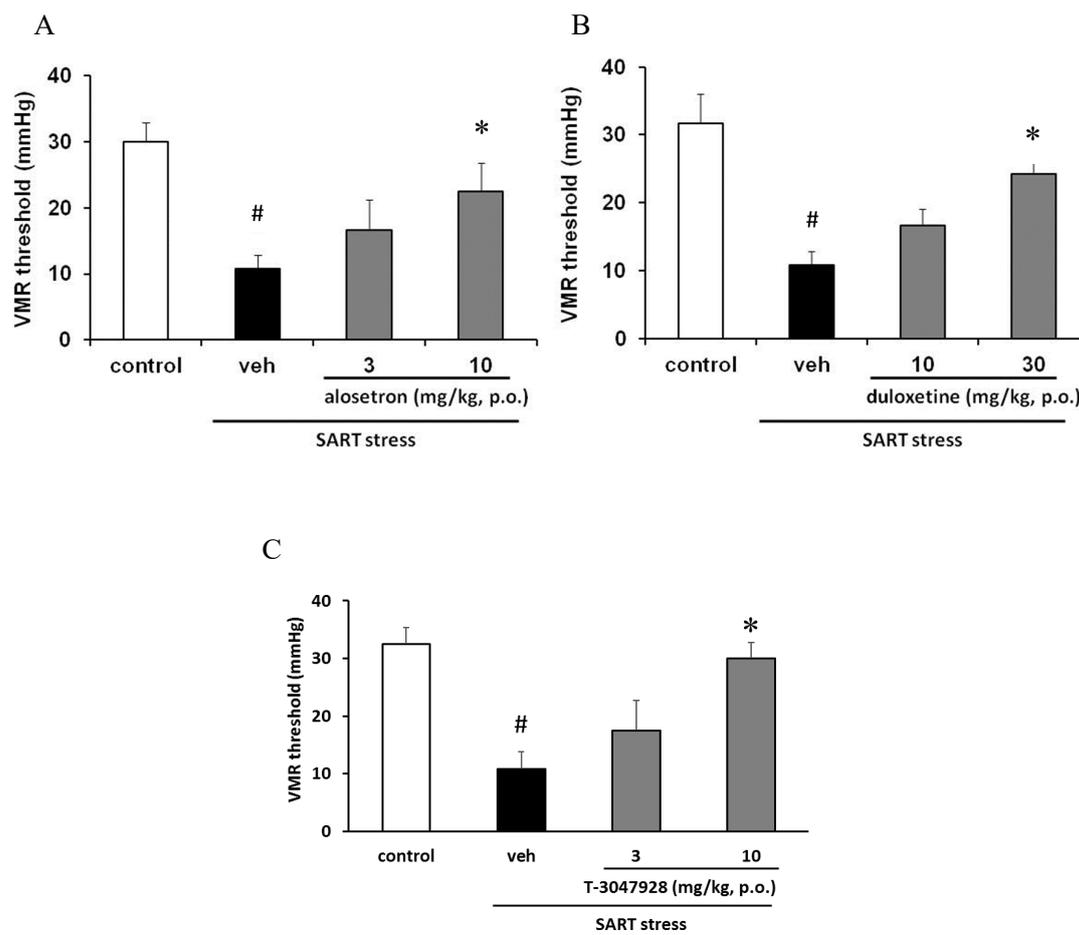


Fig. 19

Effects of alosetron, duloxetine and T-3047928 on SART stress-induced visceral hypersensitivity.

VMR thresholds were measured one hour after oral alosetron (A), three hours after oral duloxetine (B) or two hours after oral T-3047928 (C) administration in SART rats five (A, C) or 11 (B) days after SART stress protocol, respectively. Data are presented as mean \pm S.E.M. (n=6). #: p<0.05 vs. control, (Student's t-test) *: p<0.05 vs. veh (Williams test).

Itomi et al., *Journal of Pharmacological Science*. 2015, 129, 26-30.

Itomi et al., *Neurogastroenterology and Motility*. 2020, 32, e13795.

5. 他の IBS モデルにおける alosetron および T-3047928 の薬効評価

SART ラットが IBS モデルとして有用であることをより確実なものにするために、alosecron と T-3047928 については既に確立されている IBS モデルにおいても、薬効を示すかを検討した。つまり、既存の IBS モデルで効く薬剤が、SART ラットでも同様に効果を示せば、SART ラットも IBS 動物モデルとして有用であることが、より確かなものとなると考え

た。これまでに、ストレス誘発 IBS モデルとして様々な動物モデルが報告されているが、それらの中で恐怖条件付けストレス (CFS) 誘発排便モデルおよび拘束ストレス (RS) 誘発内臓痛モデルを用いて、alosecron および T-3047928 の効果を検討した。

CFSモデルにおいて、15分間の恐怖条件付けストレス負荷された群では、非ストレス負荷群に比べて、排便数の有意な増加が認められた。この排便数の増加は、alosecron または T-3047928 いずれの投与によっても、用量依存性的かつ有意に抑制され、排便数は非ストレス群と同等レベルにまで減少した (Fig. 20A, B)。

RS モデルでは、1 時間の拘束ストレスにより、CRD 誘発内臓痛に対する反応閾値が有意に低下し、内臓知覚過敏が観察された。この内臓知覚過敏もまた alosecron および T-3047928 の投与により用量依存性的かつ有意に抑制された (Fig. 21A, B)。なお、T-3047928 の RS 誘発内臓痛知覚過敏に対する改善効果は CFS 誘発排便の場合と同用量で認められたが、alosecron については CFS 誘発排便の場合よりも 10 倍高い用量でのみ改善効果が観察された。

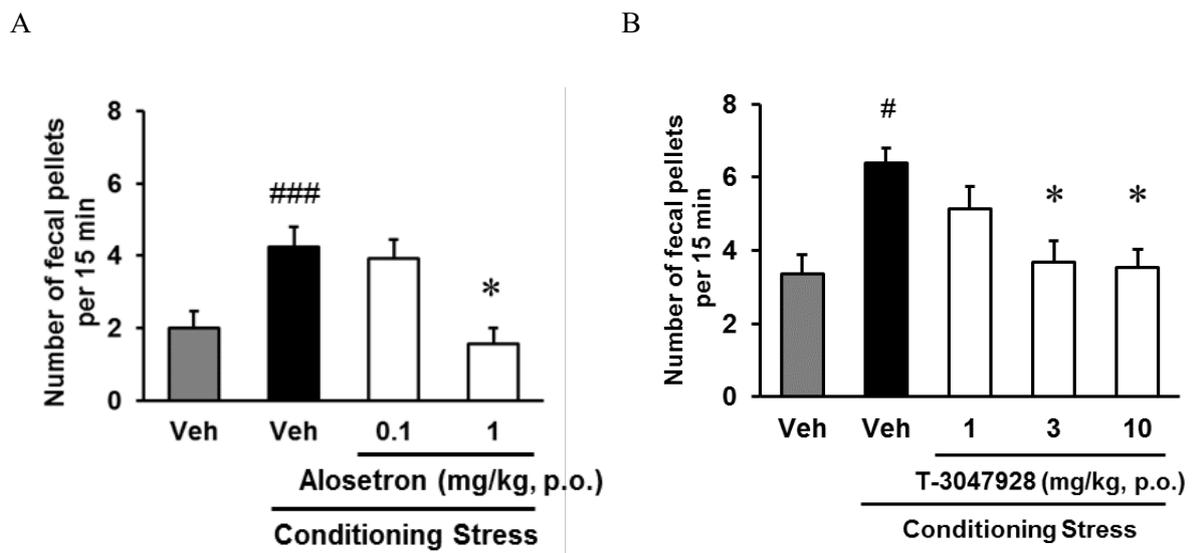


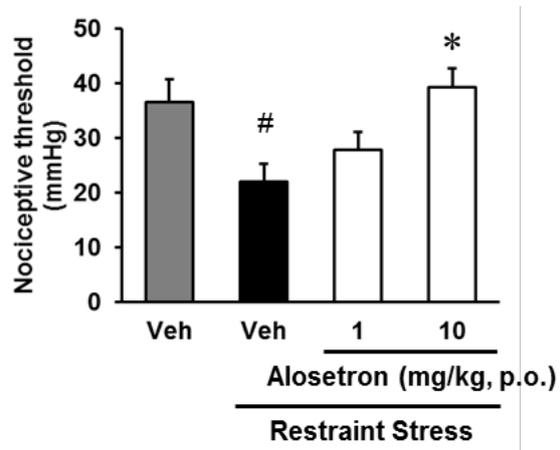
Fig. 20

Effects of alosetron and T-3047928 in conditioning fear stress-induced defecation models.

The number of fecal pellets expelled during the conditioning fear stress for 15 min was counted. Drugs were orally administered 120 min before the stress application (A; alosetron, B; T-3047928). Data are presented as mean \pm S.E.M. (n=12-16). # P<0.01, ###; P<0.0001 vs. vehicle-treated non-stress group (Student's t-test). *P<0.025 vs. vehicle-treated CFS group (William's test).

Itomi et al., *Neurogastroenterology and Motility*. 2020, 32, e13795.

A



B

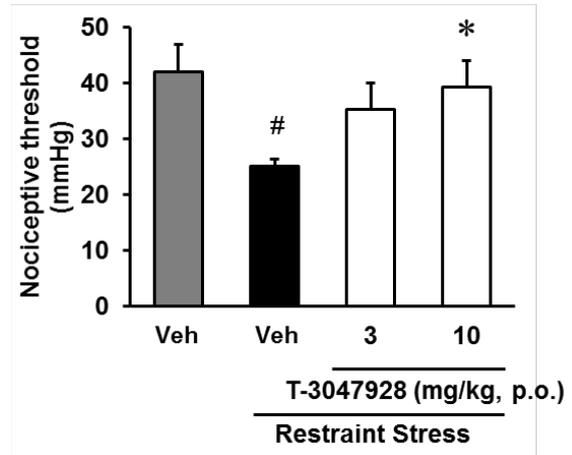


Fig. 21

Effects of alosetron and T-3047928 in restraint stress-induced visceral hypersensitivity models.

The VMR threshold to CRD was determined 1 hour after restraint stress. Drugs were orally administered 1 hour before the CRD (A; alosetron, B; T-3047928). Data are presented as mean \pm S.E.M. (n=6-8). #; $P < 0.05$ vs. vehicle-treated non-stress group (Student's t-test). *; $P < 0.025$ vs. vehicle-treated RS group (William's test).

Itomi et al., *Neurogastroenterology and Motility*. 2020, 32, e13795.

第4節 考察

本研究において、SART ラットは持続的な内臓知覚過敏を呈し、内臓痛における capsaicin 誘発 DNIC 反応が破綻していることが明らかとなった。また、SART ラットの内臓知覚過敏に対して alosetron、duloxetine および T-3047928 は有意な改善作用を示し、臨床もしくは他の IBS 動物モデルと類似した薬剤反応性が観察された。これらの結果より、SART ラットは IBS 病態を反映した有用な動物モデルであると考えられる。

IBS はストレスとの関連性が高い疾患であることから、ストレス誘発の IBS モデルを構築することは IBS の病態解明に欠くことはできない。IBS と同様にストレスとの関連性が高く、また IBS との併発率も高い疾患として FM が知られており、両疾患に共通する病態として下行性疼痛抑制系の異常が報告されている [22, 23, 63]。第1章では、著者らは FM モデルとして知られている SART ラットが、FM 患者と同様の体性痛に対する下行性疼痛抑制系の異常および臨床と類似した薬剤反応性を有することを見出し、SART ラットが FM 病態を反映した動物モデルであることを示した。そこで第2章では、SART ラットが IBS 病態を反映した動物モデルとしても有用であるかについて、内臓痛の観点から検討した。

SART ラットはストレス負荷終了時から持続的かつ顕著な内臓痛閾値の低下を示し、慢性的な内臓知覚過敏状態を呈した (Fig. 16)。そこで SART ラットにおける内臓知覚過敏の特徴を捉えるため、DNIC 反応の有無、腸管 RMCP-II の発現量および薬剤の反応性を検討した。

これまでに、動物モデルを用いた内臓痛における DNIC 反応についての報告は無かったため、まず正常ラットを用いて DNIC 反応が検出できる条件を検討した。第1章の体性痛で DNIC 反応が認められた capsaicin 125 µg/site の左前肢足処置を異所性の条件刺激として用いたが、CRD 誘発内臓痛に対する閾値の上昇は認められなかった (data not shown)。そこで、capsaicin の用量を 150 µg/site に増大させたところ、内臓痛閾値の有意な上昇が観察された (Fig. 17)。この結果は、DNIC 反応の誘発が刺激の種類、強度、部位などに影響されるという報告と一致するものであった [13]。すなわち、capsaicin を用いて内臓痛の DNIC 反応を観察するには、体性痛の場合と比較してより強い条件性刺激が必要であることが判明した。この原因は不明であるが、体性痛と内臓痛とでは刺激の部位 (後肢足か大腸)、種類 (機械刺激もしくは電気刺激か腸管伸展刺激)、伝達神経 (主に Aδ 線維か主に C 線維) などの違いがあるため、様々な要因が考えられる。今回、内臓痛においても DNIC 反応は認められたが、体性痛の DNIC に比べると閾値の上昇は小さかった。条件刺激である capsaicin の用量をさらに増大させることもできたかもしれないが、高用量投与による心血管系への副作用を懸念して、実施しなかった。また、capsaicin 以外の条件刺激として動物実験で報告されているものにホ

ルマリンやカラゲニンもあり [13]、capsaicin に比べて、内臓痛閾値の上昇がより明確に認められるか、興味深いところである。

今回の capsaicin 誘発 DNIC 反応の条件を用いて、SART ラットの内臓痛における DNIC 反応を検討したところ、SART ラットでは CRD に対する内臓痛閾値の上昇は認められず、DNIC 反応は観察されなかった (Fig. 17)。DNIC 反応は下行性疼痛抑制系を介した現象であると考えられていることから、今回の結果より SART ラットでは体性痛だけではなく内臓痛においても下行性疼痛抑制系に異常があることが示唆された。近年 DNIC 反応や機能的核磁気共鳴画像法 (fMRI) を用いた研究により、IBS を含む機能性胃腸障害では下行性疼痛抑制系に異常を来していることが報告されている [34, 65, 66]。実際、DNIC 反応の条件刺激として片足を冷水に浸し、テスト刺激として腸管拡張刺激を与えると、健常人では内臓痛のスコアが低下するのに対し、IBS 患者では内臓痛スコアの低下、すなわち DNIC 反応は認められないことが報告されている [22]。IBS の動物モデルにおいて DNIC 反応を検討した報告はこれまでになく、本章の研究で得られた知見は、新しい側面から IBS の動物モデルを評価したという点で意義深いものである。

本来、IBS は通常の臨床検査では症状を説明し得る器質的な病変が認められないのが特徴であるが、IBS 患者の生検結果からは腸管局所における肥満細胞やある種のサイトカインの増加などの微小炎症の存在、さらには腸内細菌叢の変化が示唆されている [30, 31, 32, 67]。腸内細菌については、感染性腸炎後に IBS が発症することや、IBS 患者の腸内細菌組成が健常人と異なることが報告されている [67, 68]。ストレスは腸内細菌組成を変容させ、粘膜透過性亢進と内臓知覚過敏を招くことが知られている [68, 69, 70]。また、経口抗生物質の rifaximin には IBS 症状の改善効果があることが証明され、IBS 治療薬として承認されている [71]。肥満細胞については、IBS 患者における内臓痛には肥満細胞の活性化が関与していることが報告されている [30, 72]。肥満細胞は腸管炎症が起こると粘膜下へ動員され活性化される。その際、粘膜へ圧刺激が負荷されると、肥満細胞は脱顆粒し肥満細胞由来のヒスタミン、セロトニン、プロテアーゼなどのメディエーターを放出し、それらが粘膜下知覚神経の興奮を促し、痛覚過敏が生じる [33]。そこで、本研究では、下行性疼痛抑制系の異常のような中枢性の変化だけではなく、末梢での変化についても検討するため、SART ラットの遠位結腸における肥満細胞脱顆粒の特異的なマーカー RMCP-II mRNA の発現量を測定した。しかし、正常および SART ラットにおける RMCP-II mRNA の発現量には明確な差は認められなかった (Fig. 18)。一方、他のストレス負荷 IBS モデルである water avoidance stress モデルやトリニトロベンゼンスルホン酸の近位腸内投与による内臓痛モデルでは、腸管肥満細胞数や RMCP-II 発現量が増加し、それらが内臓痛の原因となっていることが報告されている [73,

74]。これらことから、腸管局所での肥満細胞の変化はモデルにより異なっているものと推察される。本章の研究では、SART ラットでは腸管肥満細胞の活性化が認められなかったことから、腸管局所よりもむしろ下行性疼痛抑制系の異常などの中枢性の機能変化が内臓知覚過敏に寄与している可能性が推察される。また、今回は末梢の変化として腸管肥満細胞に着目したが、IBS に関する末梢変化の評価項目には、腸管膜透過性、組織学的解析なども挙げられるため、今後の研究課題としたい。

次に、SART ラットの内臓知覚過敏を薬理的に検討することで、IBS 患者と SART ラットにおける薬剤反応の類似性を検討した (Fig. 19)。薬理的検討としては、IBS 治療薬である 5-HT₃ 受容体拮抗薬 alosetron、セロトニン・ノルアドレナリン再取り込み阻害薬 duloxetine および CRF1 受容体拮抗薬 T-3047928 を用いた。Alosetron は SART ラットの内臓知覚過敏に対して有意な改善効果を示し、臨床結果を反映した成績が得られた。5-HT₃ は脊髄レベルにおいて疼痛に対し興奮性に作用すると報告されていることから [75]、alosetron による内臓痛抑制効果は脊髄 5-HT₃ への拮抗作用によるものと考えられる。また、duloxetine も同様に SART ラットの内臓知覚過敏を有意に改善した。内臓痛に対する duloxetine の効果を検討した臨床試験や動物実験に関する報告は多くはないが、IBS 患者を対象にした臨床試験の報告から、duloxetine が IBS における内臓痛を改善することが示されている [76, 77, 78]。Duloxetine の SART 誘発内臓知覚過敏に対する改善効果は、下行性疼痛抑制系の異常を伴った脊髄内セロトニンもしくはノルアドレナリン量の低下を正常化させるとによるものと推察される。さらに、T-3047928 も SART ラットの内臓知覚過敏に対し改善効果を示した。CRF1 受容体拮抗薬の IBS 患者に対する臨床的効果はこれまでのところ限定的であるが、IBS 病態における CRF の寄与は前臨床および臨床において数多く報告されており、特に前臨床においては、CRF1 拮抗薬が種々の IBS モデルに有効であることが良く知られている [65, 66, 79]。これらのことより、SART ラットの内臓痛に対する alosetron、duloxetine および T-3047928 の反応性は、IBS 患者もしくは IBS の動物モデルと類似していると考えられた。

さらに、alosetron および T-3047928 に関しては、IBS モデルとして既に確立されている CFS や RS モデルにおいてもそれぞれ排便や内臓痛に対する明確な薬効を示した (Fig. 20, 21)。したがって、既存の IBS モデルで効く薬剤が、SART ラットでも同様に効果を示したことにより、SART ラットも IBS 動物モデルとして有用であることが、より確かなものになったと考えられる。このことから、SART ラットは既存の IBS モデルと同様に、新規 IBS 治療薬の薬効評価系として有用性が高いと考えられる。また、今回明らかとなったように、SART ラットは下行性疼痛抑制系の異常を特徴とする初めての IBS モデルであるため、中枢性の痛み機構、

特に下行性疼痛抑制系を調節することで内臓痛改善作用を発揮するような IBS 治療薬の評価に非常に有益であると考えられる。

今回使用した薬剤はいずれも中枢レベルで内臓痛に対する抑制効果を発揮すると考えられることから、SART モデルにおける内臓知覚過敏の発症には、中枢の変化が関与していることが示唆された。実際、alosetron の CFS 誘発排便に対する有効用量は 1 mg/kg であったが、SART モデルにおける内臓痛に対しては 1 mg/kg では改善効果はなく、10 mg/kg が必要であった。これらの結果は、alosetron が内臓痛を抑制するためには、末梢での腸管運動を抑制するだけでは不十分であり、より高用量を処置し脊髄レベルで作用させる必要があることを示唆している。そのため、alosetron の内臓痛に対する効果は、腸管運動抑制によるものではなく、中枢性の作用によるものと考えられる。Duloxetine は脊髄レベルでセロトニンおよびノルアドレナリン濃度を上昇させることで、下行性疼痛抑制系を賦活化し内臓痛に対する抑制効果を発揮したと考えられる。CRF1 受容体拮抗薬 T-3047928 は中枢移行性があることが報告されているため [62]、SART ラットにおいても中枢レベルで薬効を発揮していることが十分に想定される。また、CRF1 受容体拮抗薬は脳内の扁桃体中心核に作用して内臓痛抑制効果を発揮することが考えられている [80]。一方、動物モデルを用いた報告では、他の CRF1 受容体拮抗薬は中枢および末梢の両方に作用することで内臓痛を抑制することが示されているため [79, 81, 82, 83]、T-3047928 についても末梢で薬効を発揮した可能性は完全には否定できない。ただし、CRF は肥満細胞の脱顆粒に関与しているが [84, 85, 86, 87]、SART ラットの腸管では肥満細胞の活性化マーカーの発現量に変化は無かったため、今回の SART ラットでは末梢の CRF シグナルの関与は大きくないと推察される。

以上、本章の研究結果より、SART ラットは持続的な内臓知覚過敏を示し、内臓痛における下行性疼痛抑制系の異常や薬剤反応性などの臨床の知見と類似した特徴を有することが明らかとなった。ゆえに、SART ラットは IBS 病態を反映した有用な動物モデルであると考えられる。SART ラットは、DNIC 反応を指標にした下行性疼痛抑制系の異常を特徴とするこれまでにない IBS モデルであるため、今後は下行性疼痛抑制系の調節をターゲットとした IBS 治療薬の評価に利用されることが期待できる。

第5節 小括

本章では、FMモデルとして報告されている SART ラットの IBS モデルとしての有用性を検討するため、内臓痛の観点から下行性疼痛抑制系および薬剤反応性の評価を実施し、以下の知見を得た。

1. SART ラットは CRD に対し持続的な内臓知覚過敏を示した。
2. 内臓痛における DNIC 反応は、SART ラットでは消失しており、SART ラットにおける下行性疼痛抑制系の異常が示唆された。
3. SART ラットの内臓知覚過敏に対する薬剤反応性は、IBS 患者のものと類似していた。
4. SART ラットの内臓知覚過敏には、主に中枢性の変化が寄与しているものと推察された。
5. 以上より、SART ラットは IBS の病態を反映した動物モデルであり、IBS における内臓痛の病態解明および新規治療薬の開発に有用なモデルであると考えられる。

総括

本研究では、DNIC 反応を用いて SART ラットにおける下行性疼痛抑制系の機能変化を体性痛および内臓痛の観点から検討した。さらに、体性痛および内臓痛を薬理的に解析することで、本モデルの FM および IBS 病態モデルとしての有用性について検証した。

第 1 章では、正常ラットにおいて、機械的刺激および知覚線維選択的電気刺激に対する疼痛閾値が capsaicin 処置により上昇すること、すなわち DNIC 反応が誘起されることを認めた。また、種々の拮抗薬を用いた検討により、この DNIC 反応は μ オピオイド、 $\alpha 2$ および 5-HT_{1A} 受容体が関与したものであったことから、下行性疼痛抑制系を反映した現象であることが示された。SART ラットを用いた検討では、ストレス負荷後から持続的な痛覚過敏が観察され、DNIC 反応の消失も認められた。これらの結果から、SART ラットでは下行性疼痛抑制系の異常が慢性的な体性痛の原因となっていることが考えられた。Neurometer を用いた疼痛試験では、SART ラットにおける DNIC 反応の消失は、侵害受容線維である A δ および C 線維において認められたが、非侵害性の A β 線維では認められなかった。A β 線維を介した反応が SART ラットにおいて低下していなかったことから、アロディニアは発症していないと解釈できるかもしれない。実際に、von Frey テストではフィラメントが足に触れるだけで逃避反応を示す様なアロディニア様の反応は観察されなかった。A β 線維における DNIC 反応が SART ラットでも維持されていた理由は現段階では不明であり、今後より詳細な検討が必要である。また、SART ラットにおける痛覚過敏は、FM 治療薬として FDA から承認されている pregabalin および duloxetine により有意に改善したが、naproxen は何ら抑制効果を示さなかった。これらの結果は、FM の疼痛における臨床像と同様であり、さらに naproxen が SART ラットにおいて鎮痛効果を示さなかったことは、SART ラットでは FM 患者と同様に炎症が起こっていないことを示唆するものである。

以上の結果より、DNIC 反応の消失、すなわち下行性疼痛抑制系の異常および臨床と類似した薬物応答性が認められたことより、SART ラットは FM 患者の病態を反映し、鎮痛薬の評価に適した有用な慢性疼痛モデルであると考えられる。

第 2 章では、初めに SART ラットが持続的な内臓知覚過敏を呈することを明らかにした。異所性侵害刺激の capsaicin 前肢足処置は、正常ラットでは CRD 刺激による内臓痛閾値を上昇させたが、SART ラットでは痛覚閾値の上昇は認められなかった。このことから、SART ラットでは内臓痛においても下行性疼痛抑制系に異常を来していることが示唆された。また、遠位結腸における肥満細胞の活性化マーカー RMCP-II mRNA の発現量は、SART および正常

ラットで差が認められなかったことから、SART ラットにおける内臓知覚過敏については、末梢での変化の寄与は小さいと考えられた。一方、中枢性作用を有する alosetron、duloxetine および T-3047928 は SART ラットにおける内臓知覚過敏を有意に改善した。ゆえに、SART モデルにおける内臓知覚過敏の発症には、中枢性の変化がより大きく関与しているものと示唆された。また、Alosetron および T-3047928 は、SART 誘発内臓痛のみならず、既に IBS 治療薬の評価系として報告されている CFS 誘発排便および RS 誘発内臓知覚過敏に対しても明らかな抑制効果を示した。すなわち、SART ラットにおいて効果を示した薬剤が、既存の IBS モデルでも同様に効果を示したことから、SART ラットも IBS 治療薬の評価に有用なモデルであると言える。

以上より、SART ラットは内臓痛における下行性疼痛抑制系の異常を特徴とする新たな IBS の病態モデルであり、IBS 関連性の内臓痛治療薬の評価に有用であると考えられる。

第 1 章の SART ラットにおける体性痛の検討では、その疼痛測定系の特性から、機械的刺激以外にも Neurometer を用いて知覚線維選択的に電氣的刺激を与えることが可能であり、より詳細な DNIC 反応の解析をすることができた。一方、内臓痛を評価した第 2 章では、Neurometer を用いた検討は困難であったため、内臓痛を誘発させる刺激としては CRD のみに留まり、体性痛と比較して詳細な検討を行うことができなかった。ただし、腸管から脊髄へ向かう内臓痛の伝達にも、体性痛と同様に A δ および C 線維が介在していること、また SART ラットにおいて体性痛および内臓痛どちらにおいても同様に DNIC 反応の異常が認められたことを考慮すると、SART ラットの内臓痛における下行性疼痛抑制系の異常は、体性痛のものと類似していると推察される。

FM および IBS に対して臨床で処方されている薬剤を考えた場合、FM については pregabalin のような神経障害性疼痛薬、duloxetine のような抗うつ薬やオピオイド系薬剤が使用され、IBS については、alosetron や tegaserod のような消化管運動改善薬、escitalopram や duloxetine のような抗うつ薬等が主に使用されている。FM と IBS ではそれぞれ身体症状が異なるため、たとえ疼痛機序が類似していても、上記のように、抗うつ薬以外は異なる薬剤が処方されている。しかし、duloxetine などの抗うつ薬はストレスを軽減し、かつ下行性疼痛抑制系も賦活化できるため、FM および IBS の病態を考慮すると、抗うつ薬がいずれの疾患に対しても処方されていることは合目的である。このような両疾患共通の病態を標的とした新規薬剤の開発は特に FM と IBS を併発した患者において有益であると考えられ、その検討において、SART ラットが非常に有用であると考えられる。また、IBS 患者の中には、ロペラミド等の消化管運動抑制薬で下痢を抑制することで二次的に腹痛を軽減させられる場合もある。ただし、本研究で内臓痛抑制効果を示した alosetron は強力な消化管運動抑制作用を有

しているが、内臓痛抑制作用を発揮には、より高用量を必要としたことから (Fig. 19, 20, 21)、SART ラットでは内臓痛を抑制するには消化管運動抑制作用のみでは不十分であると考えられる。また、alosetron は正常動物の排便に対し低用量から抑制作用を示すことも知られており [88]、実際、臨床でも重度の便秘が副作用として報告されている。一方、内臓痛抑制作用を示した CRF1 受容体拮抗薬 T-3047928 は、同用量でストレスモデルにおける排便数上昇および内臓知覚過敏を抑制したが (Fig. 19, 20, 21)、正常排便に対しては高用量でも影響を与えない [88]。他の CRF1 受容体拮抗薬も同様に正常な消化管運動には影響を与えないことが報告されている [89, 90, 91]。これらのことから、CRF1 受容体拮抗薬は同用量で便異常と内臓痛を改善することができ、便秘のリスクの低い IBS 治療薬として魅力的であると考えられる。

以上、第 1 章および第 2 章で得られた結果より、SART ラットにおいて、体性痛および内臓痛に対して下行性疼痛抑制系の異常が認められることを DNIC 反応の評価を用いて確認した。また、SART ラットにおける体性痛および内臓痛の痛覚過敏には、脳・脊髄レベルでの内因性鎮痛機構である下行性疼痛抑制系の機能異常が関与していることを明らかにした。さらに、SART ラットは FM および IBS の臨床を反映した薬剤反応性を示すことから、本モデルは両疾患における体性痛および内臓痛の病態解析ならびに新規治療薬の薬効評価に有用な動物モデルであると考えられる。

引用文献

1. Barsky AJ, Borus JF. Functional somatic syndromes. *Ann Intern Med.* **1999.** 130: 910-921.
2. Carmen M Galvez-Sánchez, Stefan Duschek, and Gustavo A Reyes del Paso. Psychological impact of fibromyalgia: current perspectives. *Psychol Res Behav Manag.* **2019.** 12: 117–127.
3. Bellato E, Marini E, Castoldi F, Barbasetti N, Mattei L, Bonasia DE, Blonna D. Fibromyalgia syndrome: etiology, pathogenesis, diagnosis, and treatment. *Pain Res Treat.* **2012.** 2012: 426130.
4. Astegiano M, Pellicano R, Sguazzini C, Berrutti M, Simondi D, Reggiani S, Rizzetto M. 2008 Clinical approach to irritable bowel syndrome. *Minerva Gastroenterol Dietol.* **2008.** 54: 251-257.
5. Funakami Y, Itoh E, Hata T, Wada T, Ichida S. Specific alternation of rhythm in temperature (SART) stress-induced irritable bowel syndrome-like changes in mice and effects of drugs. *Biol Pharm Bull.* **2010.** 33: 1545-1549.
6. Endrich S, Hawrelak JA, Myers SP, Harnett JE. *Therapeutic Advances Gastroenterology.* **2020.** 13: 1-17.
7. Song GH, Venkatraman V, Ho KY, Chee MW, Yeoh KG, Wilder-Smith CH. Cortical effects of anticipation and endogenous modulation of visceral pain assessed by functional brain MRI in irritable bowel syndrome patients and healthy controls. *Pain.* **2006.** 126: 79-90.
8. Wilder-Smith CH, Robert-Yap J. Abnormal endogenous pain modulation and somatic and visceral hypersensitivity in female patients with irritable bowel syndrome. *World J Gastroenterol.***2007.** 13: 3699-3704.
9. Wood PB, Holman AJ, Jones KD. Novel pharmacotherapy for fibromyalgia. *Expert Opin Investig Drugs.* **2007.** 16: 829-841.
10. Julien N, Goffaux P, Arsenaault P, Marchand S. Widespread pain in fibromyalgia is related to a deficit of endogenous pain inhibition. *Pain.* **2005.** 114: 295-302.
11. Normand E, Potvin S, Gaumont I, Cloutier G, Corbin JF, Marchand S. Pain inhibition is deficient in chronic widespread pain but normal in major depressive disorder. *J Clin Psychiatry.* **2011.** 72: 219-224.
12. Le Bars D, Chitour D, Kraus E, Dickenson AH, Besson JM. Effect of naloxone upon diffuse noxious inhibitory controls (DNIC) in the rat. *Brain Res.* **1981.** 204: 387-402.
13. Wen YR, Wang CC, Yeh GC, Hsu SF, Huang YJ, Li YL, Sun WZ. DNIC-mediated analgesia produced by a supramaximal electrical or a high-dose formalin conditioning stimulus: roles of opioid and alpha2-adrenergic receptors. *J Biomed Sci.* **2010.** 17: 19.
14. Tao ZY, Wang PX, Wei SQ, Traub RJ, Li JF, Cao DY. The Role of Descending Pain Modulation in Chronic Primary Pain: Potential Application of Drugs Targeting Serotonergic System. *Neural Plast.* **2019.** 2019: 1389296.

15. Niesters M, Proto PL, Aarts L, Sarton EY, Drewes AM, Dahan A. Tapentadol potentiates descending pain inhibition in chronic pain patients with diabetic polyneuropathy. *British Journal of Anesthesia* **2014**. 113: 148-156.
16. Le Bars D. The whole body receptive field of dorsal horn multireceptive neurones. *Brain Res Brain Res Rev.* **2002**. 40: 29-44.
17. van Wijk G, Veldhuijzen DS. Perspective on diffuse noxious inhibitory controls as a model of endogenous pain modulation in clinical pain syndromes. *J Pain.* **2010**. 11: 408-419.
18. Le Bars D, Dickinson AH, Besson JM. Diffuse noxious inhibitory controls (DNIC). I. Effects on dorsal horn convergent neuron in rats. *Pain* 1979. 6: 283-304.
19. Le Bars D, Dickinson AH, Besson JM. Diffuse noxious inhibitory controls (DNIC). II. Lack of effect on non-convergent neurons supraspinal involvement and theoretical implications. *Pain* 1979. 6: 305-327.
20. Le Bars D. The whole body receptive field of dorsal horn multireceptive neurons. *Brain Rec Rev.* **2002**. 40: 29-44.
21. Schoen CJ, Ablin JN, Ichesco E, Bhavsar RJ, Kochlefl L, Harris RE, Clauw DJ, Gracely RH, Harte SE. A novel paradigm to evaluate conditioned pain modulation in fibromyalgia. *J Pain Res.* **2016**. 9: 711-719.
22. Wilder-Smith CH, Schindler D, Lovblad K, Redmond SM, Nirikko A. Brain functional magnetic resonance imaging of rectal pain and activation of endogenous inhibitory mechanisms in irritable bowel syndrome patient subgroups and healthy controls. *Gut.* **2004**. 53: 1595-1601.
23. King CD Wong F, Currie T, Mauderli AP, Fillingim RB, Riley JL 3rd. Deficiency in endogenous modulation of prolonged heat pain in patients with Irritable Bowel Syndrome and Temporomandibular Disorder. *Pain.* **2009**. 143: 172-178.
24. Ferrari LF, Gear RW, Levine JD. Attenuation of activity in an endogenous analgesia circuit by ongoing pain in the rat. *J Neurosci.* **2010**. 30: 13699-13706.
25. Sluka KA, Kalra A, Moore SA. Unilateral intramuscular injections of acidic saline produce a bilateral, long-lasting hyperalgesia. *Muscle Nerve.* **2001**. 24: 37-46.
26. Khasar SG, Miao FJ, Jänig W, Levine JD. Vagotomy-induced enhancement of mechanical hyperalgesia in the rat is sympathoadrenal-mediated. *J Neurosci.* **1998**. 18: 3043-3049.
27. Nagakura Y, Oe T, Aoki T, Matsuoka N. Biogenic amine depletion causes chronic muscular pain and tactile allodynia accompanied by depression: A putative animal model of fibromyalgia. *Pain.* **2009**. 146: 26-33.
28. Nishiyori M, Uchida H, Nagai J, Araki K, Mukae T, Kishioka S, Ueda H. Permanent relief from intermittent cold stress-induced fibromyalgia-like abnormal pain by repeated intrathecal administration of antidepressants. *Mol Pain.* **2011**. 7: 69.

29. Nishiyori M, Nagai J, Nakazawa T, Ueda H. Absence of morphine analgesia and its underlying descending serotonergic activation in an experimental mouse model of fibromyalgia. *Neurosci Lett.* **2010.** 472: 184-187.
30. Klooker TK, Braak B, Koopman KE, Welting O, Wouters MM, van der Heide S, Schemann M, Bischoff SC, van den Wijngaard RM, Boeckxstaens GE. The mast cell stabiliser ketotifen decreases visceral hypersensitivity and improves intestinal symptoms in patients with irritable bowel syndrome. *Gut.* **2010.** 59: 1213-1221.
31. Ford AC, Talley NJ. Mucosal inflammation as a potential etiological factor in irritable bowel syndrome: a systematic review. *J Gastroenterol.* **2011.** 46: 421-431.
32. Goral V, Kucukoner M, Buyukbayram H. Mast cells count and serum cytokine levels in patients with irritable bowel syndrome. *Hepatogastroenterology.* **2010.** 57: 751-754.
33. Barbara G, Wang B, Stanghellini V, Bunnett NW, Grundy D, Corinaldesi R. Mast cell-dependent excitation of visceral-nociceptive sensory neurons in irritable bowel syndrome. *Gastroenterology.* **2007.** 132: 26-37.
34. Ohara H, Kawamura M, Namimatsu A, Miura T, Yoneda R, Hata T. Mechanism of hyperalgesia in SART stressed (repeated cold stress) mice: antinociceptive effect of neurotropin. *Jpn J Pharmacol.* **1991.** 57: 243-250.
35. Nasu T, Taguchi T, Mizumura K. Persistent deep mechanical hyperalgesia induced by repeated cold stress in rats. *Eur J Pain.* **2010.** 14: 236-244.
36. Hata T, Itoh E, Kawabata A. Changes in CNS levels of serotonin and its metabolite in SART-stressed (repeatedly cold-stressed) rats. *Jpn J Pharmacol.* **1991.** 56: 101-104.
37. Russell IJ, Vaeroy H, Javors M, Nyberg F. Cerebrospinal fluid biogenic amine metabolites in fibromyalgia/fibrositis syndrome and rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* **1992.** 35: 550-556.
38. Ueda H, Matsumoto M. ニューロメーターを用いた新しい知覚線維選択的侵害受容評価法. *日本薬理学雑誌.* **2008.** 131: 367-371.
39. Koga K, Furue H, Rashid Md H, Takaki A, Katafuchi T, Yoshimura M. Selective activation of primary afferent fibers evaluated by sine-wave electrical stimulation. *Mol Pain.* **2005.** 1: 13.
40. Wei H, Viisanen H, Pertovaara A. Descending modulation of neuropathic hypersensitivity by dopamine D2 receptors in or adjacent to the hypothalamic A11 cell group. *Pharmacol Res.* **2009.** 59: 355-363.
41. Harris RE, Clauw DJ, Scott DJ, McLean SA, Gracely RH, Zubieta JK. Decreased central mu-opioid receptor availability in fibromyalgia. *J Neurosci.* **2007.** 27: 10000-10006.
42. Martin-Eauclaire MF, Abbas N, Sauze N, Mercier L, Berge-Lefranc JL, Condo J, Bougis PE, Guieu R. Involvement of endogenous opioid system in scorpion toxin-induced antinociception in mice. *Neurosci Lett.* **2010.** 482: 45-50.

43. Le Bars D, Chitour D, Clot AM. The encoding of thermal stimuli by diffuse noxious inhibitory controls (DNIC). *Brain Res.* **1981.** 230: 394-399.
44. Gear RW, Aley KO, Levine JD. Pain-induced analgesia mediated by mesolimbic reward circuits. *J Neurosci.* **1999.** 19: 7175-7181.
45. de Resende MA, Silva LF, Sato K, Arendt-Nielsen L, Sluka KA. Blockade of opioid receptors in the medullary reticularis nucleus dorsalis, but not the rostral ventromedial medulla, prevents analgesia produced by diffuse noxious inhibitory control in rats with muscle inflammation. *J Pain.* **2011.** 12: 687-697.
46. Willer JC, Le Bars D, De Broucker T. Diffuse noxious inhibitory controls in man: involvement of an opioidergic link. *Eur J Pharmacol.* **1990.** 182: 347-355.
47. Wei H, Viisanen H, Pertovaara A. Descending modulation of neuropathic hypersensitivity by dopamine D2 receptors in or adjacent to the hypothalamic A11 cell group. *Pharmacol Res.* **2009.** 59: 355-363.
48. Vanegas H, Vazquez E, Tortorici V. NSAIDs, Opioids, Cannabinoids and the Control of Pain by the Central Nervous System. *Pharmaceuticals.* **2010.** 3: 1335-1347.
49. Viisanen H, Pertovaara A. Roles of the rostroventromedial medulla and the spinal 5-HT1A receptor in descending antinociception induced by motor cortex stimulation in the neuropathic rat. *Neuroscience letters.* **2010.** 476: 133-137.
50. Stacey BR, Emir B, Petersel D, Murphy K. Pregabalin in Treatment-Refractory Fibromyalgia. *Open Rheumatol J.* **2010.** 4: 35-38.
51. Crofford LJ, Rowbotham MC, Mease PJ, Russell IJ, Dworkin RH, Corbin AE, Young JP Jr, LaMoreaux LK, Martin SA, Sharma U; Pregabalin 1008-105 Study Group. Pregabalin for the treatment of fibromyalgia syndrome: results of a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Arthritis Rheum.* **2005.** 52: 1264-1273.
52. Arnold LM, Russell IJ, Diri EW, Duan WR, Young JP Jr, Sharma U, Martin SA, Barrett JA, Haig G. A 14-week, randomized, double-blinded, placebo-controlled monotherapy trial of pregabalin in patients with fibromyalgia. *J Pain.* **2008.** 9: 792-805.
53. Crofford LJ, Mease PJ, Simpson SL, Young JP Jr, Martin SA, Haig GM, Sharma U. Fibromyalgia relapse evaluation and efficacy for durability of meaningful relief (FREEDOM): a 6-month, double-blind, placebo-controlled trial with pregabalin. *Pain.* **2008.** 136: 419-431.
54. Arnold LM, Lu Y, Crofford LJ, Wohlreich M, Detke MJ, Iyengar S, Goldstein DJ. A double-blind, multicenter trial comparing duloxetine with placebo in the treatment of fibromyalgia patients with or without major depressive disorder. *Arthritis Rheum.* **2004.** 50: 2974-2984.
55. Arnold LM, Rosen A, Pritchett YL, D'Souza DN, Goldstein DJ, Iyengar S, Wernicke JF. A randomized, double-blind, placebo-controlled trial of duloxetine in the treatment of women with fibromyalgia with or without major depressive disorder. *Pain.* **2005.** 119: 5-15.

56. Goldenberg DL, Felson DT, Dinerman H. A randomized, controlled trial of amitriptyline and naproxen in the treatment of patients with fibromyalgia. *Arthritis Rheum.* **1986.** 29: 1371-1377.
57. Goldenberg DL. Pharmacological treatment of fibromyalgia and other chronic musculoskeletal pain. *Best Pract Res Clin Rheumatol.* **2007.** 21: 499-511.
58. Sörensen J, Bengtsson A, Bäckman E, Henriksson KG, Bengtsson M. Pain analysis in patients with fibromyalgia. Effects of intravenous morphine, lidocaine, and ketamine. *Scand J Rheumatol.* **1995.** 24: 360-365.
59. Taché Y, Million M. Role of Corticotropin-releasing Factor Signaling in Stress-related Alterations of Colonic Motility and Hyperalgesia. *J Neurogastroenterol Motil.* **2015.** 21: 8-24.
60. Hirata T, Keto Y, Nakata M, Takeuchi A, Funatsu T, Akuzawa S, Sasamata M, Miyata K. Effects of serotonin 5-HT(3) receptor antagonists on CRF-induced abnormal colonic water transport and defecation in rats. *Eur J Pharmacol.* **2008.** 587: 281-284.
61. Iyengar S, Webster AA, Hemrick-Luecke SK, Xu JY, Simmons RM. Efficacy of duloxetine, a potent and balanced serotonin-norepinephrine reuptake inhibitor in persistent pain models in rats. *J Pharmacol Exp Ther.* **2004.** 311: 576-584.
62. Kojima T, Mochizuki M, Takai T, Hoashi Y, Morimoto S, Seto M, Nakamura M, Kobayashi K, Sako Y, Tanaka M, Kanzaki N, Kosugi Y, Yano T, Aso K. Discovery of 1,2,3,4-tetrahydropyrimido[1,2-a]benzimidazoles as novel class of corticotropin releasing factor 1 receptor antagonists. *Bioorganic & Medicinal Chemistry.* **2018.** 26: 2229-2250.
63. Heymen S, Maixner W, Whitehead WE, Klatzkin RR, Mechlin B, Light KC. Central processing of noxious somatic stimuli in patients with irritable bowel syndrome compared with healthy controls. *Clin J Pain.* **2010.** 26: 104-109.
64. Mayer EA, Naliboff BD, Craig AD. Neuroimaging of the brain-gut axis: from basic understanding to treatment of functional GI disorders. *Gastroenterology.* **2006.** 131: 1925-1942.
65. Trimble N, Johnson AC, Foster A, Greenwood-van Meerveld B. Corticotropin-releasing factor receptor 1-deficient mice show decreased anxiety and colonic sensitivity. *Neurogastroenterol Motil.* **2007.** 19: 754-760.
66. Million M, Zhao JF, Luckey A, Czimmer J, Maynard GD, Kehne J, Hoffman DC, Taché Y. The newly developed CRF1-receptor antagonists, NGD 98-2 and NGD 9002, suppress acute stress-induced stimulation of colonic motor function and visceral hypersensitivity in rats. *PLoS One.* **2013.** 8: e73749.
67. 福土審 過敏性腸症候群と腸内細菌叢 gut microbiota *腸内細菌学雑誌.* **2018.** 32: 1-6.
68. Mearin F, Perez-Oliveras M, Perello A, Vinyet J, Ibanez A, Coderch J, Perona M. Dyspepsia and irritable bowel syndrome after a Salmonella gastroenteritis outbreak: one-year follow-up cohort study. *Gastroenterology.* **2005.** 129: 98-104.

69. Ford AC, Spiegel BM, Talley NJ, Moayyedi P. Small intestinal bacterial overgrowth in irritable bowel syndrome: systematic review and meta-analysis. *Clin Gastroenterol Hepatol.* **2009.** 7: 1279-1286.
70. Vivinus-Nébot M, Frin-Mathy G, Bziouche H, Dainese R, Bernard G, Anty R, Filippi J, Saint-Paul MC, Tulic MK, Verhasselt V, Hébuterne X, Piche T. Functional bowel symptoms in quiescent inflammatory bowel diseases: role of epithelial barrier disruption and lowgrade inflammation. *Gut.* **2014.** 63: 744-752.
71. Pimentel M, Lembo A, Chey WD, Zakko S, Ringel Y, Yu J, Mareya SM, Shaw AL, Bortey E, Forbes WP; TARGET Study Group. Rifaximin therapy for patients with irritable bowel syndrome without constipation. *N Engl J Med.* **2011.** 364: 22-32.
72. Akbar A, Yiangou Y, Facer P, Walters JR, Anand P, Ghosh S. Increased capsaicin receptor TRPV1-expressing sensory fibres in irritable bowel syndrome and their correlation with abdominal pain. *Gut.* **2008.** 57: 923-929.
73. Bradesi S, Schwetz I, Ennes HS, Lamy CM, Ohning G, Fanselow M, Pothoulakis C, McRoberts JA, Mayer EA. Repeated exposure to water avoidance stress in rats: a new model for sustained visceral hyperalgesia. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* **2005.** 289: G42-53.
74. Ohashi K, Sato Y, Iwata H, Kawai M, Kurebayashi Y. Colonic mast cell infiltration in rats with TNBS-induced visceral hypersensitivity. *J Vet Med Sci.* **2007.** 69: 1223-1228.
75. Tao ZY, Wang PX, Wei SQ, Traub RJ, Li JF, Cao DY. The Role of Descending Pain Modulation in Chronic Primary Pain: Potential Application of Drugs Targeting Serotonergic System. *Neural Plast.* **2019.** 2019: 1389296.
76. Brennan BP, Fogarty KV, Roberts JL, Reynolds KA, Pope HG Jr, Hudson JI. Duloxetine in the treatment of irritable bowel syndrome: an open-label pilot study. *Hum Psychopharmacol.* **2009.** 24: 423-428.
77. Jones CK, Peters SC, Shannon HE. Efficacy of duloxetine, a potent and balanced serotonergic and noradrenergic reuptake inhibitor, in inflammatory and acute pain models in rodents. *J Pharmacol Exp Ther.* **2005.** 312: 726-732.
78. Jones CK, Peters SC, Shannon HE. Synergistic interactions between the dual serotonergic, noradrenergic reuptake inhibitor duloxetine and the non-steroidal anti-inflammatory drug ibuprofen in inflammatory pain in rodents. *Eur J Pain.* **2007.** 11: 208-215.
79. Taché Y, Million M. Role of Corticotropin-releasing Factor Signaling in Stress-related Alterations of Colonic Motility and Hyperalgesia. *J Neurogastroenterol Motil.* **2015.** 21: 8-24.
80. Taché Y. Corticotrophin-releasing factor 1 activation in the central amygdale and visceral hyperalgesia. *Neurogastroenterol Motil.* **2015.** 27: 1-6.
81. Stengel A, Taché Y. Corticotropin-releasing factor signaling and visceral response to stress. *Exp Biol Med (Maywood).* **2010.** 235: 1168-1178.

82. Kiank C, Taché Y, Larauche M. Stress-related modulation of inflammation in experimental models of bowel disease and post-infectious irritable bowel syndrome: role of corticotropin-releasing factor receptors. *Brain Behav Immun.* **2010.** 24: 41-48.
83. Larauche M, Kiank C, Taché Y. Corticotropin releasing factor signaling in colon and ileum: Regulation by stress and pathophysiological implications. *J Physiol Pharmacol.* **2009.** 60: 33-46.
84. Vanuytsel T, van Wanrooy S, Vanheel H, Vanormelingen C, Verschuere S, Houben E, Salim Rasool S, Tóth J, Holvoet L, Farré R, Van Oudenhove L, Boeckxstaens G, Verbeke K, Tack J. Psychological stress and corticotropin-releasing hormone increase intestinal permeability in humans by a mast cell-dependent mechanism. *Gut.* **2014.** 63: 1293-1299.
85. Santos J, Yates D, Guilarte M, Vicario M, Alonso C, Perdue MH. Stress neuropeptides evoke epithelial responses via mast cell activation in the rat colon. *Psychoneuroendocrinology.* **2008.** 33: 1248-1256.
86. Chato M, Li Y, Ma Z, Coote J, Du, Chen X. Involvement of Corticotropin-Releasing Factor and Receptors in Immune Cells in Irritable Bowel Syndrome. *Front Endocrinol (Lausanne).* **2018.** 9: 21.
87. Larauche M. Novel insights in the role of peripheral corticotropin-releasing factor and mast cells in stress-induced visceral hypersensitivity. *Neurogastroenterol Motil.* **2012.** 24: 201-205.
88. Itomi Y, Tanaka T, Matsushita K, Kawamura T, Kojima T, Aso K, Matsumoto-Okano S, Tsukimi Y. Pharmacological evaluation of a novel corticotropin-releasing factor 1 receptor antagonist T-3047928 in stress-induced animal models in a comparison with alosetron. *Neurogastroenterology and Motility.* **2020.** 32: e13795.
89. Million M, Grigoriadis DE, Sullivan S, Crowe PD, McRoberts JA, Zhou H, Saunders PR, Maillot C, Mayer EA, Taché Y. A novel water-soluble selective CRF1 receptor antagonist, NBI 35965, blunts stress-induced visceral hyperalgesia and colonic motor function in rats. *Brain Res.* **2003.** 985: 32-42.
90. Scallion B, Cai A, Solowski N, Rosenberg A, Song XY, Shealy D, Wagner C. Binding and functional comparisons of two types of tumor necrosis factor antagonists. *J Pharmacol Exp Ther.* **2002.** 301: 418-426.
91. Martínez V, Wang L, Rivier J, Grigoriadis D, Taché Y. Central CRF, urocortins and stress increase colonic transit via CRF1 receptors while activation of CRF2 receptors delays gastric transit in mice. *J Physiol.* **2004.** 556: 221-234.

謝辞

本論文の作成にあたり、終始ご懇篤なるご指導とご鞭撻を賜りました京都薬科大学 薬物治療学分野 加藤伸一 教授に深甚なる感謝の意を表します。

また、本論文の作成にあたり、ご助言ならびにご指導とご高閲を賜りました、京都薬科大学 臨床薬理学分野 中田徹男 教授ならびに統合薬科学系 高田和幸 教授に深甚なる感謝を致します。

さらに、本研究の遂行ならびに本論文の作成にあたり、ご指導とご高閲を賜りました、元武田薬品工業 消化器疾患ドラッグディスカバリーユニットディレクター 月見泰博 博士 (現あすか製薬) に深甚なる感謝を致します。

末筆ながら、実験の一部にご協力頂きました、河村透博士、田中崇裕博士、松下耕蔵氏、松本志保博士をはじめとした武田薬品工業の皆様に厚く御礼申し上げます。