

(19) 日本国特許庁(JP)

再公表特許(A1)

(11) 国際公開番号

W02013/022080

発行日 平成27年3月5日 (2015.3.5)

(43) 国際公開日 平成25年2月14日 (2013.2.14)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 27/00 (2006.01)	GO 1 N 27/00 Z	2 G 0 4 5
GO 1 N 33/50 (2006.01)	GO 1 N 33/50 Z	2 G 0 6 0
GO 1 N 33/15 (2006.01)	GO 1 N 33/15 Z	4 C 0 2 7
A 6 1 B 5/0488 (2006.01)	A 6 1 B 5/04 3 3 0	
A 6 1 D 7/00 (2006.01)	A 6 1 D 7/00 Z	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 11 頁)

出願番号 特願2013-528073 (P2013-528073)	(71) 出願人 305060567 国立大学法人富山大学 富山県富山市五福3190
(21) 国際出願番号 PCT/JP2012/070419	
(22) 国際出願日 平成24年8月10日 (2012.8.10)	
(31) 優先権主張番号 特願2011-175334 (P2011-175334)	(74) 代理人 100114074 弁理士 大谷 嘉一
(32) 優先日 平成23年8月10日 (2011.8.10)	
(33) 優先権主張国 日本国 (JP)	(72) 発明者 安東 嗣修 富山県富山市五福3190 国立大学法人 富山大学内
	(72) 発明者 倉石 泰 富山県富山市五福3190 国立大学法人 富山大学内
	Fターム(参考) 2G045 AA29 AA40 FB05 GC18 2G060 AA15 AE40 AF15 4C027 AA04

最終頁に続く

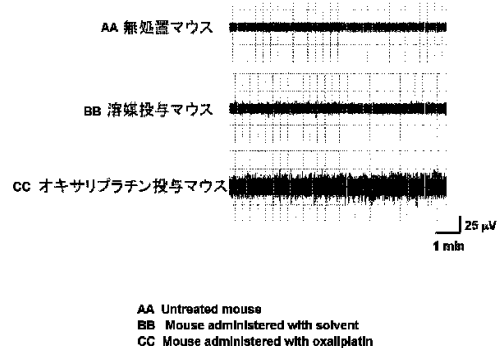
(54) 【発明の名称】 動物を用いた痺れ又は自発痛の評価方法

(57) 【要約】

【課題】従来、動物の行動実験で評価できなかった痺れ感や自発痛を電気生理学的に評価できる評価方法の提供を目的とする。

【解決手段】動物の末梢神経に発生する活動電位の発火パターンを用いて痺れ又は自発痛を評価した点に特徴がある。

【選択図】 図1



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

動物の末梢神経に発生する活動電位の発火パターンを用いた痺れ又は自発痛の評価方法。

【請求項 2】

末梢神経に双極電極を接触し、皮膚からの活動電位の発火パターンを増幅器を用いて増幅検出する請求項 1 記載の痺れ又は自発痛の評価方法。

【請求項 3】

前記発火パターンが自発発火パターンである請求項 1 又は 2 記載の痺れ又は自発痛の評価方法。

【請求項 4】

被試験薬物を動物に投与するステップと、投与された動物の末梢神経に双極電極を接触し、皮膚からの活動電位の発火パターンを増幅器を用いて増幅検出するステップと、検出された発火パターンを数値化するステップとを有し、得られた数値に基づいた痺れ又は自発痛を誘発する薬物のスクリーニング方法。

【請求項 5】

痺れ又は自発痛を誘発する薬物を動物に投与するステップと、被試験薬物を前記動物に投与するステップと、投与された動物の末梢神経に双極電極を接触し、皮膚からの活動電位の発火パターンを増幅器を用いて増幅検出するステップと、検出された発火パターンを数値化するステップとを有し、得られた数値に基づいた痺れ又は自発痛を抑制する薬物のスクリーニング方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は動物を用いた痺れ感覚や自発痛の評価方法に関する。

【背景技術】

【0002】

医薬品の服用により生じる副作用の 1 つに神経障害がある。

神経障害には中枢神経系、自律神経系、末梢神経系及び感覚器等の障害がある。

これらの神経障害を引き起こす恐れがある医薬品として高脂血症治療薬、抗悪性腫瘍薬（抗癌薬）、抗ウィルス薬及び抗結核薬等が知られている。

このうち、末梢神経障害は医薬品を使用してしばらく経過した後に手・足先の痺れ感、ほてり、痛み、感覚が鈍くなる等の感覚障害が起こり、次第に上方の腕や脚に広がる。

また、糖尿病など疾患においても末梢神経障害が誘発され、その症状の一つとして痺れ感がある。

多くは両方の足や手の感覚障害が起こるが、片方だけのこともある。

さらに筋肉に力が入らない、手や足が動きにくい等の運動障害に至る場合もある。

しかし、「痺れ」という感覚の行動学的表現が非常に難しく、「ジンジン」、「ビリビリ」、「チクチク」、「ざわざわ」等の表現をされていても患者の主観的な「痺れ」に対する訴えは患者間で感受性が異なり、たとえ同一人物においても精神的、身体的、環境的な背景により変動する問題がある。

ましてや動物の行動実験にて痺れ感や自発痛を客観的に評価することは困難であった。

【0003】

近年、優れた抗癌薬が次々と開発されているが、抗癌薬においても副作用として末梢神経障害が問題になっている。

抗癌薬にはタキサン系薬剤（パクリタキセル、ドセタキセル等）、ビンアルカロイド系薬剤（ピンクリスチン、ピンプラスチン、ビンデシン、ビノレルピン等）及び白金製剤（オキサリプラチン、カルボプラチン、シスプラチン、ネダプラチン等）等があるが、これらの抗癌薬による神経毒性の研究は進んでいないのが現状である。

特許文献 1 は、ラットを用いたフォン・フライ試験にてラットの回避反応の回数を測定

10

20

30

40

50

しているが、痺れ感や自発痛の評価に適用できるものではない。

特に痺れ感は動物の行動に出現しにくく、動物を用いた痺れ感に対する客観的評価方法がないことも「痺れ感」に対する有用な薬物の開発が進んでいない理由の1つと思われる。

【0004】

一方、ラットの座骨神経を露出させ、タングステン微小電極により交感神経信号を導出し、活動電位を測定する手法（マイクロニューログラム法）が知られている（非特許文献1）。

【0005】

【特許文献1】国際公開W02009/028605号公報

【非特許文献1】自律神経，43（6），445-452，2006

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

本発明は、従来、動物の行動実験で評価できなかった痺れ感や自発痛を電気生理学的に評価できる評価方法の提供を目的とする。

【課題を解決するための手段】

【0007】

本発明は、動物の末梢神経に発生する活動電位の発火パターンを用いて痺れ又は自発痛を評価した点に特徴がある。

すなわち、本発明は、健常な末梢神経の自発的神経活動と、痺れ又は自発痛で生じる自発的神経活動を電気信号をして取り出し、それらを数値化することで、痺れ又は自発痛を評価するものである。

具体的には、例えば、末梢神経に双極電極を接触し、皮膚からの活動電位の発火パターンを増幅器を用いて増幅検出する。

【0008】

ここで、活動電位の発火パターンを測定する神経線維としては動物の後肢を支配している神経が好ましく、伏在神経，総腓骨神経，脛骨神経，腓腹神経等が例として挙げられ、また、背中の皮膚神経枝を対象にしてもよい。

【0009】

検出した発火パターンに関して、閾値（健常でも認められる神経活動）以上の突出した神経活動（発火頻度）を痺れ又は自発痛の電気信号として評価する。

活動電位の発火パターンのうち、刺激を動物に与えていない自発発火パターンを痺れの評価に用いることもできる。

また、発火パターンを検出することで、被試験薬物を動物に投与するステップと、投与された動物の末梢神経に双極電極を接触し、皮膚からの活動電位の発火パターンを増幅器を用いて増幅検出するステップと、検出された発火パターンを数値化するステップとを有し、得られた数値に基づいた痺れ又は自発痛を誘発する薬物のスクリーニング方法が得られ、また、痺れ又は自発痛を誘発する薬物を動物に投与するステップと、被試験薬物を前記動物に投与するステップと、投与された動物の末梢神経に双極電極を接触し、皮膚からの活動電位の発火パターンを増幅器を用いて増幅検出するステップと、検出された発火パターンを数値化するステップとを有し、得られた数値に基づいた痺れ又は自発痛を抑制する薬物のスクリーニング方法が得られる。

【0010】

本発明に使用される動物は、ヒト以外で実験動物として使用される動物であれば、特に限定されないが、マウス、ラット、モルモット、ウサギ、イヌなどが挙げられる。好ましい動物として、マウス、ラットなどのげっ歯類が挙げられる。

本発明のスクリーニング方法で痺れまたは自発痛を評価できる薬物としては、例えば、微小管重合阻害薬（ピンカルカロイド系薬剤、ハリコンドリンB類縁体）、微小管脱重合阻害薬（タキサン系薬剤）、白金製剤、プロテアソーム阻害剤、抗結核薬、抗原虫薬、

10

20

30

40

50

逆転写酵素阻害薬、HMG-CoA還元酵素阻害薬、痛風治療薬、抗不整脈薬、インターフェロン製剤などが挙げられる。

本発明のスクリーニング方法で痺れまたは自発痛の抑制を評価できる薬物としては、例えば、循環改善薬、代謝改善薬、筋弛緩薬、血管拡張薬、非ステロイド薬、局所麻酔薬などが挙げられる。

【発明の効果】

【0011】

本発明は、A繊維の閾値以上の突出した発火頻度を電気信号としてとらえ、数値化して痺れ又は自発痛を評価するものである。

従って、末梢神経に発生する活動電位の発火パターンにて痺れ感等を評価することができ、薬物の痺れ又は自発痛を誘発するレベルや抑制するレベルを電気生理学的に数値化できる。

これにより、痺れ感等の発生機序の解明や新薬の開発に貢献できる。

【図面の簡単な説明】

【0012】

【図1】マウス伏在神経の自発発火パターンを示す。

【図2】投与後3日目のマウスを用いて各種機械的刺激とマウス伏在神経の発火頻度を比較したグラフを示す。

【図3】投与後3日目、10日目、32日目のマウスを用いて比較したデータを示す。

【図4】アセトンによる冷刺激とマウス伏在神経の発火頻度を比較したグラフを示す。

【発明を実施するための最良の形態】

【0013】

次に実験動物を用いた評価結果について説明する。

(実験動物)

実験には、雄性C57BL/6マウス(実験開始時6週齢)を用いた。

マウスを3群[無処置群、5%グルコース溶液(溶媒:腹腔内)投与群、オキサリプラチン(3mg/kg:腹腔内)投与群]に分けた。

(電気生理)

溶媒あるいはオキサリプラチン投与後3日目、10日目及び32日目に、マウスをペントバルビタール(80mg/kg:腹腔内注射)麻酔下、大腿部皮膚を切開し、伏在神経 s

aphenous nerve を露出した。双極L字型電極(銀線)を伏在神経に接触させ、神経の電位変化を測定し、その電位変化を増幅器[Dual-Channel Bioelectric Amplifier(MEG-2100):日本光電工業]を用いて増幅(約10,000倍)し、この増幅された電気信号(アナログ信号)をアナログ/デジタル変換装置(Powerlab2/26:ADINSTRUMENTS)を用いてデジタル信号に変換し、コンピュータのモニターで表記させた。

データの記録用チャートへの出力および発火頻度等の解析は、ソフトウェア[PowerLab Chart5(v5.1.1)]を用いて行なった。

伏在神経は、マウス後肢甲(親指側)を支配している神経であるため、親指と人差し指の間を中心に刺激した。

ただし、自発の発火活動を記録する場合は、刺激しなかった。

【0014】

図1に投与後3日目のマウスの伏在神経の自発発火パターンを示す。

これにより抗癌薬を投与したマウスは溶媒投与や無処置のものとは異なる自発発火パターンを示し、これが痺れ感に対応すると推定される。

【0015】

図2に投与後3日目のマウスを用いて各種機械的刺激を与えた後のマウスの伏在神経の発火頻度を比較したグラフを示す。

なお、図2のグラフ中、Spontaneousは刺激を与えない自発発火であり、双極電極に伏在神経を接触させ約5分後より10分間測定した。

10

20

30

40

50

v F F 0.69 mNは、強度0.69 mNのvon Frey filament (フォン・フライ線維：細いプラスチック線)を示し、v F F 9.8 mNは強度9.8 mNのフォン・フライ線維を示す。

また、Push with toothpickは楊枝による皮膚への圧迫刺激、Brushは絵筆による皮膚を撫でる刺激を示し、これらは10 secの刺激を2回繰り返した。

図3は、図2に示した投与後3日目と同様に投与後10日目及び32日目のマウスを用いて発火頻度を比較したデータを示す。

以上の結果から、機械的刺激に対する応答性がオキサリプラチンの投与により増大することが明らかになった。

【0016】

図4は、投与後3日目のマウスを用いてアセトン10 μlを10分間隔で2回マウス後肢足甲部に塗布し、冷刺激を与えた伏在神経の発火頻度の変化を示す。

これにより、オキサリプラチンを投与したマウスの冷刺激応答性が高いことが明らかになった。

【0017】

これらの実験結果から、抗癌薬の種類及び投与量を変化させて自発発火のパターンの変化を刺激誘発発火のパターンの変化と共に検出し、数値化することで痺れ感の程度を評価できる。

【産業上の利用可能性】

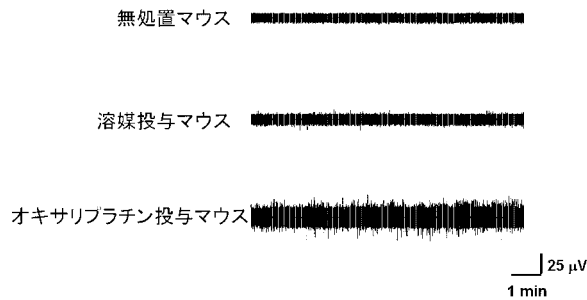
【0018】

本発明方法は、動物を用いて、痺れ又は自発痛を計測できることから、薬剤等によって誘発される又は抑制される痺れ又は自発痛の評価方法として有用である。

10

20

【図1】



【図3】

	Days after the injection		
	Day3	Day10	Day32
vehicle	0.29±0.06	0.37±0.11	0.19±0.04
oxaliplatin	1.21±0.29*	1.75±0.39*	0.72±0.18*

	Days after the injection		
	Day3	Day10	Day32
vehicle	0.64±0.14	1.59±0.61	0.54±0.18
oxaliplatin	3.43±0.67*	4.89±0.79*	2.21±0.61*

	Days after the injection		
	Day3	Day10	Day32
vehicle	7.66±2.08	3.44±0.90	3.02±0.68
oxaliplatin	26.60±5.16*	20.57±4.94*	9.58±3.09

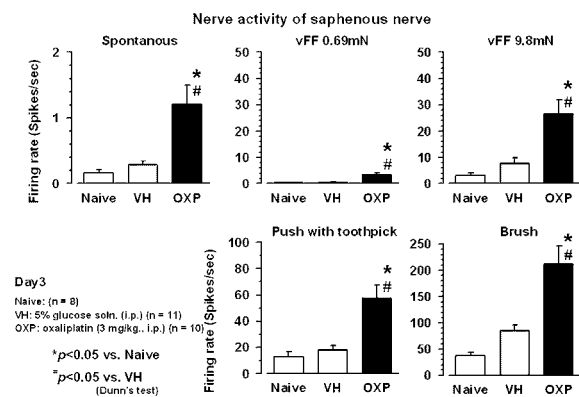
	Days after the injection		
	Day3	Day10	Day32
vehicle	18.15±3.14	8.69±3.33	5.63±1.94
oxaliplatin	57.15±9.94*	44.27±9.11*	12.12±4.28

	Days after the injection		
	Day3	Day10	Day32
vehicle	84.69±10.73	3.44±0.90	3.02±0.68
oxaliplatin	212.15±33.78*	20.57±4.94*	9.58±3.09

	Days after the injection		
	Day3	Day10	Day32
vehicle	4.20±1.04	2.53±0.66	2.45±0.72
oxaliplatin	12.79±2.02*	8.43±1.75*	3.35±1.24

N数	Days after the injection		
	Day3	Day10	Day32
vehicle	11	8	8
oxaliplatin	10	8	8

【図2】

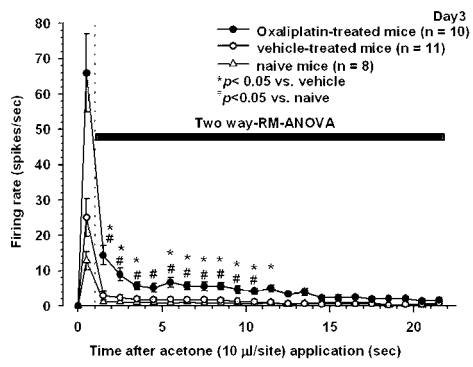


Day3
 Naive: (n = 8)
 VH: 5% glucose soln. (i.p.) (n = 11)
 OXP: oxaliplatin (3 mg/kg, i.p.) (n = 10)

*p<0.05 vs. Naive
 #p<0.05 vs. VH
 (Dunn's test)

【 図 4 】

Nerve activity (saphenous nerve) after an application of acetone



【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/JP2012/070419
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER G01N33/483(2006.01)i, G01N27/00(2006.01)i, G01N33/15(2006.01)i According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) G01N33/483, G01N27/00, G01N33/15 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2012 Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2012 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2012 Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamII)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X/Y	Satoshi IWASE et al., "Nerve action potentials in C and A.DELTA.-afferent fibers from skin nociceptors in humans", Rinsho Noha, 1998, vol.40, no.6, pages 354 to 360, entire text, particularly, page 357, 'IV. Kakushu Kankaku to C Kyushinsen'i Hassha Katsudo tonon Kankei' to page 360, 'Owarini'	1/2-5
Y	JP 2008-507368 A (Duska Scientific Co.), 13 March 2008 (13.03.2008), paragraph [0071] & US 2006/0029548 A1 & US 2010/0286274 A1 & EP 1773405 A & WO 2006/012639 A2 & CA 2573565 A & AU 2005266887 A	2-5
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 22 August, 2012 (22.08.12)		Date of mailing of the international search report 04 September, 2012 (04.09.12)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office		Authorized officer
Facsimile No.		Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2012/070419

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP 2009-226037 A (Terumo Corp.), 08 October 2009 (08.10.2009), paragraphs [0061] to [0068] (Family: none)	2-5
Y	JP 2009-226040 A (Terumo Corp.), 08 October 2009 (08.10.2009), paragraphs [0059] to [0067] (Family: none)	2-5

国際調査報告		国際出願番号 PCT/J P 2012/070419									
A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. G01N33/483(2006.01)i, G01N27/00(2006.01)i, G01N33/15(2006.01)i											
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. G01N33/483, G01N27/00, G01N33/15											
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの <table border="0"> <tr> <td>日本国実用新案公報</td> <td>1922-1996年</td> </tr> <tr> <td>日本国公開実用新案公報</td> <td>1971-2012年</td> </tr> <tr> <td>日本国実用新案登録公報</td> <td>1996-2012年</td> </tr> <tr> <td>日本国登録実用新案公報</td> <td>1994-2012年</td> </tr> </table>				日本国実用新案公報	1922-1996年	日本国公開実用新案公報	1971-2012年	日本国実用新案登録公報	1996-2012年	日本国登録実用新案公報	1994-2012年
日本国実用新案公報	1922-1996年										
日本国公開実用新案公報	1971-2012年										
日本国実用新案登録公報	1996-2012年										
日本国登録実用新案公報	1994-2012年										
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語) JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamII)											
C. 関連すると認められる文献											
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号									
X/Y	岩瀬敏他, 痛み刺激による C および Aδ 求心線維の活動電位, 臨床脳波, 1998, Vol. 40, No. 6, p354-360、全文特に p357 「IV. 各種感覚と C 求心線維発射活動との関係」 ~p360 「おわりに」 等参照	1/2-5									
Y	JP 2008-507368 A (デュスカ サイエントフィック カンパニー) 2008.03.13, 【0071】 等参照 & US 2006/0029548 A1 & US 2010/0286274 A1 & EP 1773405 A & WO 2006/012639 A2 & CA 2573565 A & AU 2005266887 A	2-5									
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。											
* 引用文献のカテゴリー		の日の後に公表された文献									
「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの		「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの									
「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの		「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの									
「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)		「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの									
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献		「&」同一パテントファミリー文献									
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願											
国際調査を完了した日 22.08.2012		国際調査報告の発送日 04.09.2012									
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		特許庁審査官 (権限のある職員) 加々美 一恵	2 J 9408								
		電話番号 03-3581-1101 内線 3252									

国際調査報告		国際出願番号 PCT/JP2012/070419
C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
Y	JP 2009-226037 A (テルモ株式会社) 2009.10.08, 【0061】～ 【0068】等参照 (ファミリーなし)	2-5
Y	JP 2009-226040 A (テルモ株式会社) 2009.10.08, 【0059】～ 【0067】 (ファミリーなし)	2-5

フロントページの続き

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN

(注) この公表は、国際事務局(WIPO)により国際公開された公報を基に作成したものである。なおこの公表に係る日本語特許出願(日本語実用新案登録出願)の国際公開の効果は、特許法第184条の10第1項(実用新案法第48条の13第2項)により生ずるものであり、本掲載とは関係ありません。