

疾患特異的行動異常の抽出と定量を基盤とした
末梢および中枢神経障害の解析

2016 年度

国立大学法人東京農工大学

生物システム応用科学府 共同先進健康科学専攻

松田 研史郎

主指導教員：田中 あかね 教授

目次

序論・・・	3-6 ページ
第1章 神経障害性疾患モデル動物の行動学的評価の検討	
【1】序論・・・	7-8 ページ
【2】神経障害性疼痛モデル動物の作出	
(1) 材料と方法・・・	9-11 ページ
(2) 結果・・・	12-17 ページ
(3) 考察・・・	187 ページ
【3】神経障害性疼痛モデル動物の行動学的評価	
(1) 材料と方法・・・	19-23 ページ
(2) 結果・・・	24-34 ページ
(3) 考察・・・	35-36 ページ
【4】小括・・・	37-38 ページ
第2章 アトピー性皮膚炎モデル動物を用いた搔痒の定量化	
【1】序論・・・	39-40 ページ
【2】搔痒の定量的評価の検討	
(1) 材料と方法・・・	41-42 ページ
(2) 結果・・・	43-44 ページ
(3) 考察・・・	45 ページ
【3】アトピー性皮膚炎の病勢に伴う搔痒行動の変化の検討	
(1) 材料と方法・・・	46-47 ページ

(2) 結果・・・	48-49 ページ
(3) 考察・・・	50 ページ
【4】小括・・・	51-52 ページ
第3章 アトピー性皮膚炎に続発するうつ様行動異常病態の解析	
【1】序論・・・	53-54 ページ
【2】皮膚炎病勢に伴ううつ様行動異常の定量化	
(1) 材料と方法・・・	55-57 ページ
(2) 結果・・・	58-62 ページ
(3) 考察・・・	63-64 ページ
【3】うつ様病態の発症機構の解析	
(1) 材料と方法・・・	65-67 ページ
(2) 結果・・・	68-72 ページ
(3) 考察・・・	73-74 ページ
【4】小括・・・	75-76 ページ
総括・・・	77-79 ページ
引用文献・・・	80-91 ページ
謝辞・・・	92 ページ

序論

疾患特異的行動異常とは、その名の通り特定の疾患によって誘発される行動学的な異常であり、主に神経・骨・筋障害性疾患の重症度が増悪化するに連れて顕在化し、患者の Quality of life (QOL)を低下させる主たる原因となり得る。また、病態の機序解析をする上で非常に重要な評価項目である。特に動物モデルを用いた行動学的解析は、橋渡し研究において重要な位置づけがされており、動物モデルを用いた解析結果をもって臨床応用への道が開かれる。そのため、動物モデルは各種疾患の意義や生理学的機能、特定遺伝子改変による分子機能の評価、薬物効果の検討などを目的として用いられることが多い^{1,2}。しかしながら、評価系の構築が十分になされていないため、行動学的異常を正確に特徴づけ、評価することが困難な疾患がある。そこで本研究では、行動学的評価方法の問題点が指摘されている神経障害性疼痛による疼痛様行動、アトピー皮膚炎による搔破行動の新規評価手法の検討を行った。さらに、アトピー皮膚炎動物モデルの解析過程で本動物モデルがうつ様症状を合併症として併発する事を見出し、行動学的異常の抽出と定量を基盤としたうつ様変化とアトピー性皮膚炎の関連性を解析した。

神経障害に起因する痛みや痒みとは本来、生体に対して危険を知らせるシグナルとして働いているが、過剰で持続的なそれらの知覚は精神的苦痛となり、さらに生理学的機能障害を惹起し、患者の QOL を著しく低下させる³。他方、中枢神経系の異常によって誘発されるうつ病などの精神障害は、意欲、興味などの精神活動の低下、活動量の低下、持続した食欲不振、不安状態などを伴い⁴、それらの症状は著しい行動学的な変化を惹起する²。動物を用いて行う末梢及び中枢神経系障害に対する行動学的試験は、ヒトがその疾患の重症度や薬物の効用

を知るために非常に重要である。

痛みは主に筋痛、関節痛、神経障害性疼痛、骨痛に分類されるが、中でも神経障害性疼痛は、ヘルペス感染⁵、糖尿病⁶、癌⁷、エイズ⁸、物理的障害（交通事故、手術）⁹など多種多様な原因による末梢及び中枢神経障害の結果引き起こされる難治性慢性疼痛疾患の1種で、前述の本来の疼痛意義を失っており痛覚過敏や異痛症（アロディニア）を主症状とする¹⁰。また既存の消炎鎮痛薬や麻薬性鎮痛薬に効果を示さず^{11,12}、根治的治療法が未だに存在しない。神経障害性疼痛は患者数 2,000 万人に登ると推定され¹³、主に痛みの知覚に対する行動学的指標は、von Frey 試験（1896 年 Maximilian von Frey が開発）¹⁴や Hot plate 試験（1944 年 Woolfe and MacDonald が開発、*Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 誌で初めて発表）¹⁵、ホルマリンテスト（1977 年 David Dubuisson, Stephen G. Dennis が開発、*Pain* 誌で初めて発表）¹⁶など、種々の刺激を動物に与え、逃避行動を行うまでの痛覚潜時や反応時の痛覚閾値が確立された評価系として用いられている。これら逃避行動に基づく痛みの重症度の解析手法は 2016 年現在もその重症度を知るための唯一の確立された方法として広く利用されている。しかしながら、ヒトの主観性が強く反映され、再現性に乏しく、また解析するにあたり多くの労力を必要とするという問題点があり、評価者により結果が大きく異なる場合も少なくなく、基準となる値も大きく異なる¹⁷。そのため、痛みの繊細な評価指標の確立が望まれているにも関わらず、十分な検討がなされていない。

アトピー性皮膚炎は増悪と寛解を繰り返す痒みのある湿疹を伴う慢性皮膚疾患で¹⁸、慢性的な痒みとそれによる搔破行動は病態の増悪化の根幹をなしている。また、アトピー性皮膚炎は断続的な搔破行動による一次求心性神経終末の障害と修復を繰り返し、表皮層に達する異常な一次求心性神経終末伸長を伴うこ

とから、古くから汎発性神経皮膚炎と同義とされている。アトピー性皮膚炎に代表される痒みは、1660年 Haffenreffer, S.の報告¹⁹によると、「皮膚や粘膜を搔破したくなるような不快な感覚」と定義されており、痒みに対する行動学的試験は動物を一定時間馴化させた後にビデオテープで記録し、搔破行動を行った回数を痒みの重症度として利用する方法が一般的な手段である²⁰。しかしながら、モデル動物における持続的で高速な搔破行動は、そのカウントが困難である。また、本手法も痛みの評価手法と同様に手技者への依存度が高く、また環境的要因に左右されやすいことから評価者によって結果が大きく異なり、基準値が不明瞭であるという欠点がある²⁰。痒いという知覚が搔破行動として出力されていることは、過去の報告^{21,22}から明らかであるが、客観的かつ再現性の高い定量化手法は未だ確立されていない。

アトピー性皮膚炎の患者は、しばしばうつ病を併発することが知られている²³。うつ病とは、抑うつ状態、意欲、興味などの精神活動の低下、持続した食欲不振、不安状態などを伴う精神障害の一種であり⁴、種々の疾患の合併症として生じることも知られており、重度に経過した場合自傷行動、自殺念慮を伴うことも珍しくない²⁴。近年、その患者数は増加の一途をたどり、有病者数は世界中で3.5億人に上る²⁵。また、原因が不明瞭であるために誤診も多く、誤った治療を受ける場合も少なくない。さらに、うつ病患者の未治療率は56.3%に上る²⁵。動物モデルにおけるうつ様症状の評価方法は、主に尾懸垂試験による学習性絶望評価²⁶、オープンフィールド試験による活動性・不安様行動の評価²⁷、スクロース嗜好性試験による嗜好性の評価²⁷など複数のテストバッテリーを組み合わせ多角的に解析することでうつ様症状として判断するのが一般的である^{26,27,28}。

以上のことから本研究では、モデル動物を用いて動的体重負荷の解析を基盤とした神経障害性疼痛による痛みの定量解析と、画像差分解析技術を基にした

アトピー性皮膚炎によって誘発される搔破行動の定量解析を行った。さらに、アトピー性皮膚炎モデル動物が皮膚炎の発症に伴い行動学的、病理組織学的うつ様症状を呈することを見出したことから、搔破行動の評価系の探索の後、うつ様行動異常の抽出と病理組織学的解析を基盤とした中枢神経障害について解析を行った。

第1章 神経障害性疾患モデル動物の行動学的評価の検討

【1】 序論

神経障害性疼痛は、中枢及び末梢神経系の異常から生じ²⁹、アロディニア及び痛覚過敏を伴う自発的灼熱痛を特徴とする慢性疼痛の一つである²⁹。ヘルペス感染⁵、糖尿病⁶、癌⁷などは、神経障害性疼痛を生じる疾患の例であり、さらに外科処置や交通事故などによる神経組織の物理的損傷によっても惹起される⁹。本疼痛は、NSAID（インドメタシンなど）や麻酔性鎮痛薬（モルヒネなど）など一般的に広く使用される鎮痛薬に対して高い抵抗性を示し、鎮痛効果は限局されている^{11,12}。近年、感覚神経に広く発現している電位依存性 Ca^{2+} 受容体の $\alpha 2-6$ ライガンド拮抗薬のプレガバリンが、神経樹状突起からのグルタミン酸の放出を抑制することにより神経障害性疼痛を緩和することが報告されている³⁰。

神経障害性疼痛の病態生理学的機能解析のため、過去にいくらかの動物モデルが作製されてきた³¹。Partial sciatic nerve ligation (PSL)、Spinal nerve ligation、Spared nerve injuryなどの外科的処置は、その代表的な手法で^{32,33}、障害の程度や発症するアロディニアの種類に差があるが、共通して神経障害性疼痛様の行動学的変化を示す³¹。その内、PSLモデルは慢性的に重度の神経障害性疼痛を呈するため³²、神経障害性疼痛の病態の進展や鎮痛成分の探索に広く用いられてきた³²。しかしながら、本モデルは作製過程の外科処置について詳細な手法が決められておらず、皮膚切開や筋切開に伴う疼痛が動的体重負荷の定量解析を困難にしている³²。

痛覚閾値の評価は、1970年代より痛みの重症度や鎮痛薬の効果を調査するために用いられてきた伝統的な手法で、今なお患者における痛みの評価はQuantitative sensory testingによる痛覚閾値の評価が重要な指標となっている

34。動物モデルの場合、足裏に対する機械的刺激や温熱的刺激を与え、逃避行動を行うまでの圧力や潜時が痛覚閾値として用いられている^{35,36}。本評価系による感覚神経機能異常の解明は、病態の一側面しか明確にしないため、神経障害性疼痛の原理を明らかにするには不十分である。さらに、その逃避反応は測定毎に異なり、結果が環境や手技者に依存するという短所がある^{36,37}。そのため、動的体重負荷の評価が新たな指標になると考えられてきた³⁸。事実、疼痛を呈する急性炎症モデル³⁹や関節炎モデル⁴⁰、間欠性跛行モデル⁴¹における動的体重負荷試験は、過去に多く実施され、確かな評価系として確立されている。他方で、外科的処置が必要な神経障害性疼痛モデルでは、その痛みの主因が神経障害であるか、外科処置であるか明確にできないために動的体重負荷は評価系として確立できていない (Table 1)⁴²。

近年、歩様異常自動定量化装置 GAIT システムが片側性障害モデルの歩様異常を詳細に解析できるシステムとして報告されている^{39,41,43}。本システムによって得られる Swing time ratio (STR) は、歩行機能を強く反映している。そこで本研究では、このシステムを神経障害性疼痛モデルに応用し、PSL モデルにおける神経障害の評価系として適応可能か解析した。

【2】神経障害性疼痛モデル動物の作出

(1) 材料と方法

① 使用動物

体重 403 g - 581 g の Wistar/ST 系雄性ラット 15 週齢以上 (SLC) を用いた。恒温 ($22 \pm 4^{\circ}\text{C}$)、恒湿 ($40 \pm 15\%$)、人工照明 (7:00 - 19:00) の一定環境下で飼育し、離乳後は固形飼料 (CRF-1) 及び水道水を自由に摂取させた。1 週間の馴化期間の後実験に供した。なお、本研究は東京農工大学動物実験委員会の承認の下で行った (承認番号 26-105)。

② 実験群

実験群は、右肢坐骨神経の結紮処置を行った PSL 手術群並びに結紮せず閉合した Sham 手術群を設け比較検討を行った。なお各群の個体数は、 $n = 3$ とした。

③ 神経障害性疼痛モデル (PSL モデル) ラットの作出

Seltzer らの開発した PSL method³² は、神経障害性疼痛モデルラットのグローバルスタンダードな作出手法として確立されていることから、本モデルを試験に使用した。

まず、2 - 3% イソフルラン混合 O_2 ガスの麻酔下で、Wistar/ST ラットの右後肢大腿骨頭より尾部側に 1 cm ずらした位置より 45 度の角度で 2 cm 皮膚切開し、筋膜切開後、大腿二頭筋を鉗子で鈍性分離した。次に、右側坐骨神経に触れないように周囲の結合組織を剥離し、坐骨神経の半径を 7 - 0 シルク製縫合糸にて 100 gram の張力で結紮した。最後に筋膜を 5 - 0 吸収糸で 8 針縫合

し、皮膚を 4 - 0 シルク製縫合糸で 5 針縫った³²。Sham 手術群は、坐骨神経周囲の結合組織を剥離後、結紮を行わずに上記方法で閉合した³²。

④ GAIT システムによる歩様異常の評価

作出したモデルが歩様異常を呈するか検討するため、歩様異常自動定量化装置 GAIT システムを用いてステップサイクル数と STR を自動検出した。まず、手術前に Wistar/ST ラットを GAIT システム用アクリルホイールに入れ、2 分間馴化を行った。次に 4.0 — 6.0 rpm の速度で 1 分間ラットをホイール内で歩行馴化させ²⁸、1 分間のインターバルの後に歩行可能な最高速度で 2 分間ホイールを回転させ、歩行訓練を行った。本訓練はモデルの作出 2 週間前から 1 日 1 回全てのラットで行った⁴¹。

⑤ von Frey 試験

作出したモデルの静的機械的アロディニアを評価するにあたり、その重症度が妥当か検討するため、von Frey 試験によって後肢裏の静的機械的痛覚閾値を評価した。静的機械的痛覚閾値 (PWT) の評価は、試験開始 2 週間前より毎日 15 分間ラットをテストケージで馴化させた後、Dynamic Plantar Aesthesiometer (Ugo Basile) を用いて行った^{44,45}。測定の際は、測定前に 10 分間テストケージにおいて馴化させた後、1 g/sec (各カットオフ値 40 g、40 sec) の圧力でラットの足裏を刺激し、ラットが逃避行動を行った際の圧力 (gram) を記録した^{44,45}。各個体両後肢 1 日 3 回実施し、その平均値を算出した。

⑥ Unilateral hot plate 試験

静的温熱的痛覚潜時 (PWL) は、von Frey 試験と同様のインターバルでテストシリンダー内における馴化を行った後に、Hot/cold plate (Ugo Basile) を用いて評価した。測定の際は、Hot/cold plate を $52.5^{\circ}\text{C} \pm 0.2^{\circ}\text{C}$ (カットオフ値: 40 sec) に設定し⁴⁶、Menéndez, L. *et al.*らの方法⁴⁶を用いて片肢ずつ PWL 値を記録した。測定毎のインターバルは 15 分設け、von Frey 試験と同様に各個体両後肢 1 日 3 回測定を実施し、その平均値を算出した。

⑦ 統計処理

全てのデータは、統計処理ソフト SigmaPlot®11 を用いて、平均値±標準偏差 (SEM) で表記した。各群間比較及び 2 値間における比較検定は Fisher's Protected Least Significant Difference (Fisher's LSD) を用いて検定を行った。上記の検定結果における $P < 0.05$ を統計学的に有意と判定した。

(2) 結果

① GAIT 測定による PSL モデルにおける歩様異常の評価

GAIT システムによる手術後 3 日目の測定において、STR 値は Sham 手術群で 0.122 ± 0.07 であったのに対し、PSL 手術群では 0.738 ± 0.10 となり、統計学的有意な差が確認された (Figure 1)。さらに手術後 7 日目の測定では、PSL 手術群の歩様異常の重症度はピークに達し (0.657 ± 0.03)、手術後 14 日目の測定時には改善傾向が確認された (0.789 ± 0.09)。一方、Sham 手術を実施した群のラットでは、手術後 14 日目の測定まで類似値を示し、統計学的有意な変化は確認されなかった (Figure 1)。

② von Frey 試験による PSL モデルにおける PWT の評価

Dynamic Plantar Aesthesiometer による手術後 3 日目の測定で、PWT 値は Sham 手術群の処置肢において 23.4 ± 3.8 gram であったのに対し、PSL 手術群の処置肢では 11.5 ± 1.7 gram となり、統計学的有意な差が確認された (Figure 2)。さらに手術後 7 日目の測定でも、PSL 手術群の PWT 値は低下したままで 15.0 ± 0.1 gram、手術後 14 日目の測定時でも改善傾向は確認されなかった (10.7 ± 1.0 gram)。一方、Sham 手術を実施した群の処置肢では、手術後 7 日目、14 日目の測定でも類似値 (7 日目 : 27.6 ± 0.9 、14 日目 : 26.3 ± 2.4) を示し、統計学的有意な変化は確認されなかった (Figure 2)。一方、非手術肢における PWT 値は Sham 手術群で手術後 7 日目に 26.6 ± 1.2 gram、14 日目に 27.2 ± 1.2 gram となった。また PSL 手術群では、手術後 7 日目に 25.5 ± 0.9 gram、14 日目に 25.0 ± 1.1 gram となり、Sham 手術群、PSL 手術群の両方で、試験を通じて統計学的有意な変化は認められなかった。また、群間においても有意な変化は確認されなかった (Figure 2)。

③ Unilateral hot plate 試験による PSL モデルの PWL の評価

Unilateral hot plate 試験による Sham 手術群の処置肢における PWL 値は、手術後 3 日目の測定で、 12.4 ± 1.0 sec を記録した。一方、PSL モデルの手術後 3 日目の PWL 値は 6.0 ± 0.9 sec を示し、群間において統計学的有意な変化が認められた。PSL 手術群の PWL 値は、手術後 7 日目 (6.7 ± 1.3 sec) 及び 14 日目 (6.6 ± 1.7 sec) でも低下傾向にあり、Sham 手術群と比較して統計学的な差が確認された (Figure 3)。非手術肢における PWL 値は、PSL 手術群において、手術後 3 日目に 17.1 ± 2.3 sec を示し、7 日目 (18.4 ± 1.8 sec)、14 日目 (15.9 ± 2.1 sec) にも同様の値を示した。Sham 手術群の非手術肢でも、PWL 値は、手術後 3 日目に 15.8 ± 1.9 sec、7 日目に 15.9 ± 1.7 sec、14 日目に 15.6 ± 1.4 sec を示し、統計学的有意な変化は示さなかった。

評価系	患者	動物モデル
静的異常評価	Visual analogue scale Mc Gill Pain Questionnaire Brief pain inventory	von Frey試験 Hot plate試験 ホルマリン試験
動的異常評価	Roland Morris Disability Questionnaire Pain Disability Assessment Scale	??

Table 1 神経障害性疼痛患者及び動物モデルにおける評価系

末梢及び中枢の神経障害性疼痛を有する患者では、痛みの静的及び動的異常の評価系が確立されている。患者における静的評価方法の Visual analogue scale は、刺激を加えた際にどの程度の痛みであったか、0 から 10 の数字（0 が痛みなし、10 が想像できる最高の痛み）で指示してもらう方法である。Mc Gill Questionnaire、Brief Pain inventory は、痛みの 3 側面（感覚、感情、評価）を考慮し、作成された問診による評価手法である。動的評価方法の Pain Disability Assessment Scale 、Roland Morris Disability Questionnaire は、痛みによって日常生活行動に支障をきたしているか問診によって評価する手法である。

一方で、動物モデルでは、von Frey 試験や Hot late 試験などの痛みの静的異常の評価系は確立されているものの、動的異常の抽出手法が存在しない。

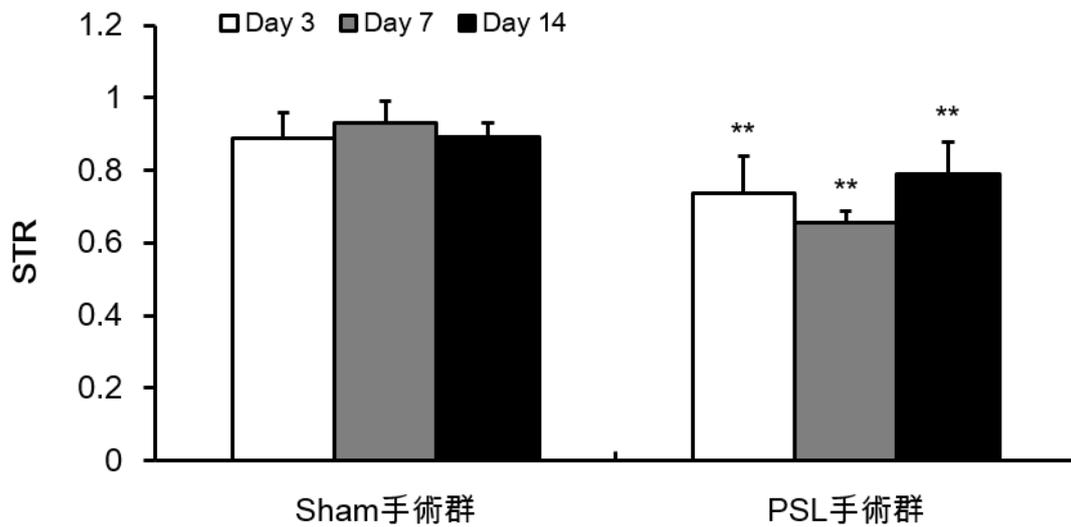


Figure 1 PSL 手術後の Swing time ratio (STR) 値の変化

PSL 手術を行った群では、Sham 手術を行った群と比較して手術後 3 日目より STR 値が有意に減少していた。一方、Sham 手術を行った群では、減少傾向は確認されなかった。全てのデータは、平均値 ± 標準誤差で表している。統計学的検定は、Fisher's LSD で行った。** $P < 0.01$ は、各測定日における Sham 手術群と比較した時の統計学的有意差を表している。

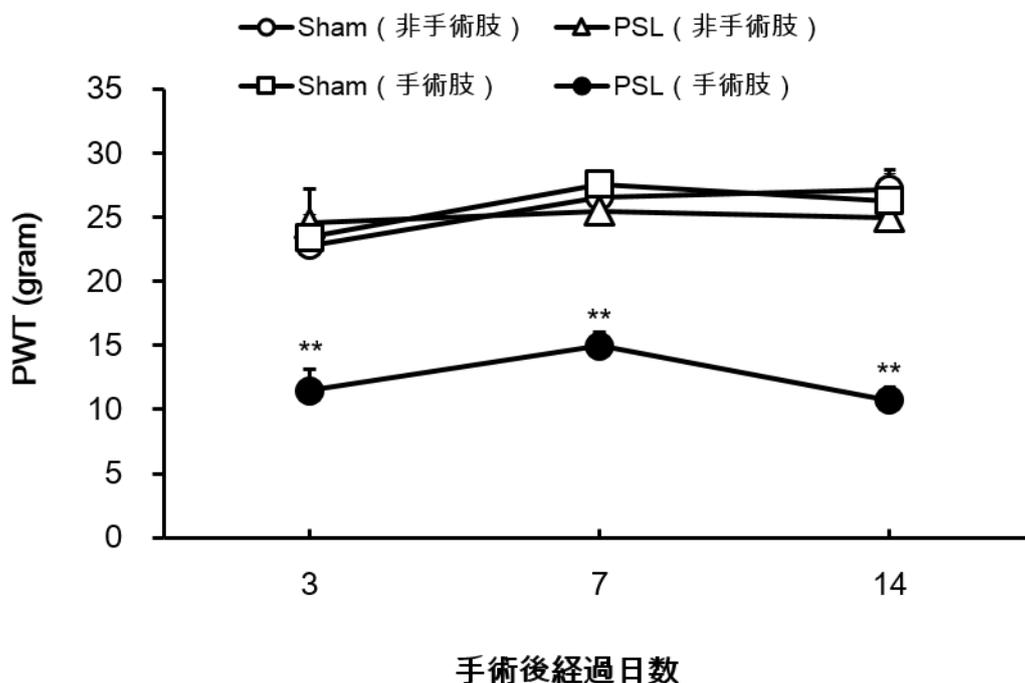


Figure 2 PSL 手術後の Paw withdrawal threshold (PWT) の変化

PSL 手術群の手術肢では、Sham 手術群の手術肢と比較して手術後 3 日目より 14 日目まで PWT 値が有意に減少していた。一方、Sham 手術を行った群では、減少傾向は確認されなかった。全てのデータは、平均値 ± 標準誤差で表している。統計学的検定は、Fisher's LSD で行った。** $P < 0.01$ は、各群の同肢を比較した時の統計学的有意差を表している。

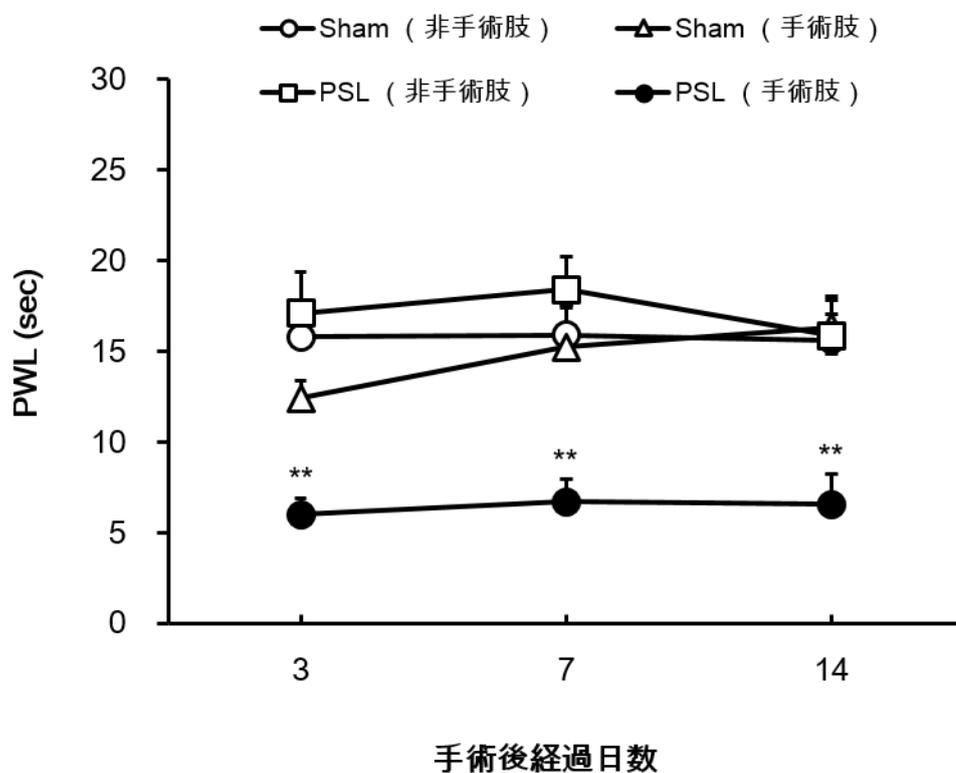


Figure 3 PSL手術後のPaw withdrawal latency (PWL)の変化

PSL手術群の手術肢では、Sham手術群の手術肢と比較して手術後3日目より14日目までPWL値が有意に減少していた。一方、Sham手術を行った群では、減少傾向は確認されなかった。全てのデータは、平均値 ± 標準誤差で表している。統計学的検定は、Fisher's LSDで行った。**** $P < 0.01$** は、各群の同肢を比較した時の統計学的有意差を表している。

(3) 考察

本章において作出した神経障害性疼痛モデル PSL ラットは、手術後 3 日目には機械的痛覚過敏症並びに温熱的痛覚過敏症を発症していた。坐骨神経部分結紮によるこれらの症状は、過去の報告と同様の結果であり^{32,36}、またそれらの症状が手術後 14 日目まで持続したことから本章では、神経障害性疼痛の主徴である慢性的な静的アロディニアを誘発できたものと考えられる。また今回、PSL モデルに対する歩様異常を GAIT システムによって初めて自動定量解析したが、神経障害性疼痛に起因する歩行機能の低下やアロディニアによって誘発される接地に対する逃避反射が STR 値に反映されていることが伺えた。本結果を用いて、次項において薬効評価を行い疾患特異的な行動異常が鎮痛薬の効果によって改善されるか検証した。

【3】神経障害性疼痛モデル動物の行動学的評価

(1) 材料と方法

① 使用動物

体重 403 g–581 g の Wistar/ST 系雄性ラット 15 週齢以上 (SLC) を用いた。恒温 (22±4°C)、恒湿 (40±15%)、人工照明 (7:00–19:00) の一定環境下で飼育し、離乳後は固形飼料 (CRF-1) 及び水道水を自由に摂取させた。1 週間の馴化期間の後実験に供した。なお、本研究は東京農工大学動物実験委員会の承認の下で行った (承認番号 26-105)。

② 試薬及び薬剤

薬剤投与試験で使用したインドメタシン (大日本住友製薬) とプレガバリン (Pfizer) は、メノウ乳鉢にて顆粒を粉碎後、0.5% methylcellulose 加生理食塩水に懸濁し 10 mg/kg の濃度で経口投与した⁴⁶。

③ 実験群

実験群は、右肢坐骨神経の結紮処置を行った手術群並びに結紮せず閉合した Sham 群を設け比較検討を行った。なお各群の個体数は、 $n = 10$ とした。

薬剤投与試験では、各群をさらに薬剤投与群と基剤投与群に分け、経口投与後の歩様異常並びにアロディニア症状の変化を評価した。

④ GAIT システムによる歩行訓練

歩様異常自動定量化装置 GAIT システムへの馴化及び歩行訓練のため、手術前に Wistar/ST ラットを GAIT システム用アクリルホイールに入れ、2 分間

馴化を行った。次に 4.0 - 6.0 rpm の速度で 1 分間ラットをホイール内で歩行馴化させ⁴¹、1 分間のインターバルの後に歩行可能な最高速度で 2 分間ホイールを回転させ、歩行訓練を行った。本訓練はモデルの作出 2 週間前から 1 日 1 回全てのラットで行った⁴¹。なお、トレーニング期間内に歩行馴化が行えなかったラット 3 匹は、以後の試験対象外とした。

⑤ 神経障害性疼痛モデル (PSL モデル) ラットの作出

Seltzer らの開発した PSL method³²は、神経障害性疼痛モデルラットのグローバルスタンダードな作出手法として確立されていることから、本モデルを試験に使用した。

まず、2 - 3%イソフルラン混合 O₂ガスの麻酔下で、Wistar/ST ラットの右後肢大腿骨頭より尾部側に 1 cm ずらした位置より 45 度の角度で 2 cm 皮膚切開し、筋膜切開後、大腿二頭筋を鉗子で鈍性分離した。次に、右側坐骨神経に触れないように周囲の結合組織を剥離し、坐骨神経の半径を 7-0 シルク製縫合糸にて 100 g の張力で結紮した。最後に筋膜を 5-0 吸収糸で 8 針縫合し、皮膚を 4-0 シルク製縫合糸で 5 針縫った³²。Sham 手術群は、坐骨神経周囲の結合組織を剥離後、結紮を行わずに上記方法で閉合した³²。

⑥ GAIT 測定

まず、歩様異常自動定量化装置 GAIT システムによる本測定はモデルの作出後 3 日目と 7、14、21、28、35 日目に行った。歩行可能な最高速度における 2 分間の歩様を高速度カメラ (120 fps) 及び Light Capture Version 1.00 (I-O data Device) で記録し、GAIT software を用いて、歩数及び STR を自動解析した^{41,43}。STR は、下記の公式によって算出される。

・ STR = 未処置後肢の STR / 坐骨神経結紮処置後肢の STR

GAIT システムによる色彩判別及びマーカー追尾のため、測定前にラットの両後肢裏を蛍光ピンク色の油性マーカーでマーキングを行った⁴¹。

⑦ von Frey 試験

PWT の評価は、試験開始 2 週間前より毎日 15 分間ラットをテストケージで馴化させた後、Dynamic Plantar Aesthesiometer (Ugo Basile) を用いて行った^{44,45}。

測定の際は、測定前に 10 分間テストケージにおいて馴化させた後、1 g/sec (各カットオフ値 40 gram、40 sec) の圧力でラットの足裏を刺激し、ラットが逃避行動を行った際の圧力を記録した^{44,45}。各個体両後肢 1 日 3 回実施し、その平均値を算出した。

⑧ Unilateral hot plate 試験

PWL は、von Frey 試験と同様のインターバルで馴化を行った後に Hot/cold plate (Ugo Basile) を用いて評価した。測定の際は、Hot/cold plate を 52.5°C ±0.2°C (カットオフ値 : 40 sec) に設定し⁴⁶、Menéndez, L. *et al.* らの方法⁴⁶を用いて片肢ずつ痛覚潜時を記録した。von Frey 試験と同様に各個体両後肢 1 日 3 回実施し、その平均値を算出した⁴⁶。

⑨ 薬剤投与

1) 単回投与試験

1 ml を 1 匹あたりの投与量とし、オペレーションを行った各群に基剤、インドメタシンまたはプレガバリンを 1 回経口投与した⁴⁷。各群オペレー

ション 7 日後の個体を本試験に用い、投与開始前、投与開始後 30 分、60 分、90 分、120 分に GAIT 試験、von Frey 試験、Unilateral hot plate 試験を実施した⁴⁷。投与は測定開始の 30 分前に行った。

2) 反復投与試験

1 ml を 1 日あたりの 1 匹の投与量とし、オペレーションを行った各群に基剤、インドメタシンまたはプレガバリンを 1 日 2 回 12 日間 12 時間毎に経口投与した。単回投与試験と同様に各群オペレーション 28 日後の個体を本試験に用い、投与開始前、投与開始後 3 日、6 日、9 日、12 日、投与終了 3 日後に GAIT 試験、von Frey 試験、Unilateral hot plate 試験を実施した⁴⁷。各測定日における投与は、測定開始の 60 分前に行った。

⑩ 病理組織学的解析

病理組織学的評価のため、オペレーション前、オペレーション後 3、7、14、21、28、35 日目の両後肢坐骨神経の結紮部位より ± 1.5 mm の組織を採材し、10%中性緩衝ホルマリン溶液にて 24 時間固定後、パラフィン包埋を行った。3 μm の厚さで薄切した切片は、ヘマトキシリン・エオジン染色、トルイジン青染色 (pH 1.0) 及びマッソン・トリクローム染色を行い⁴⁸、坐骨神経横断面における神経軸索径、ミエリン鞘径、正常神経比率、結合組織率を解析した⁴⁹。

神経変性の組織学的評価 (神経軸索径、ミエリン鞘径及び正常神経比率) は、トルイジン青染色を行った切片の $\times 400$ の鏡検下での 5 視野における平均値を用いて算出した⁴⁹。神経線維化の評価 (結合組織率) は、マッソン・トリクローム染色を行った後、 $\times 100$ の鏡検下で坐骨神経全体を撮影し、Image J Version 1.47 を用いてグレースケール化した後、結合組織を赤色に変換し、そのピクセ

ル数を用いて算出した。

⑪ 統計処理

全てのデータは、統計処理ソフト SigmaPlot®11 を用いて、平均値±標準偏差 (SEM) で表記した。各群間比較及び 2 値間における比較検定は Fisher's LSD を用いて多重比較検定を行った。上記の検定結果における $P < 0.05$ を統計学的に有意と判定した。

また、行動学的試験 (GAIT 試験、von Frey 試験、Unilateral hot plate 試験) 間における相関性は、Pearson correlation coefficient test を用いて解析した。

(2) 結果

① PSL モデルにおける行動学的異常

GAIT システムによる STR の解析結果は、通常未処置の個体において、1 に近い値を示すことが分かっているが^{25,28}、本試験において STR は、PSL モデル群で右肢坐骨神経結紮後 3 日目の測定から試験終了まで、試験開始前の値と比較し統計学的有意に減少した。ただし STR は、結紮後 3 日目 (0.777 ± 0.113) と比較し、7 日目 (0.819 ± 0.101) に歩様の改善が見られた。これらの統計学的有意差は、Sham 群において確認できなかった (Figure 4a)。さらにステップサイクル数も PSL モデル群において、Sham 群 (80 ± 20) またはオペレーション前 (72 ± 21) と比較し、手術 3 日後に統計学的有意な減少 (63 ± 23) を示した (Figure 4b)。

von Frey 試験における静的機械的痛覚閾値の統計学的有意な減少は、Figure 5 で示すように、PSL モデル群の結紮を行った後肢において試験開始前 (25.8 ± 5.3 gram) と比較し、術後 3 日目から 35 日目まで確認された (6.7 ± 1.0 gram)。対照的にこれらの統計学的有意差は、非結紮肢では確認されなかった (28.4 ± 2.9 gram)。そして Sham 群の両後肢の値は、PSL モデルの非結紮肢と近似値を示した (28.4 ± 2.9 gram)。

Unilateral hot plate 試験による PSL モデルの手術後 3 日目以降の PWL (6.4 ± 0.9 sec) は、手術前の結果 (12.1 ± 2.9 sec) と比較し統計学的有意に減少した (Figure 6)。他方、PSL モデル群における未処置肢の PWL は手術後 35 日目まで統計学的有意な変化は示さなかった (15.7 ± 1.5 sec)。Sham 手術群における PWL 値の統計学的有意差は、試験を通じて両後肢に見られなかった (15.2 ± 1.3 sec)。

② 坐骨神経の病理学的解析

ヘマトキシリン・エオジン染色による坐骨神経横断面の形態学的特徴を確認した後³⁴、トルイジン青染色を行った切片を用いて、PSL 処置肢における神経変性の評価を行った。PSL 処置によって術後 3 日目から 14 日目に神経軸索、ミエリン鞘、正常神経比率が Sham 処置群と比較し、統計学的有意に減少した (Figure 7a–7d)。また、PSL 処置後 21 日目以降、障害を受けた神経の一部は再生したが、他方で線維化が進行し結合組織が統計学的有意に増加した (Figure 7e)。Sham 群における病理組織学的変化は、試験を通じて確認できなかった (Figure 7e)。さらに術後 21 日目に PSL 手術群の坐骨神経内に肥満細胞の浸潤を認めた。PSL モデルにおけるこれらの病理組織学的変化は、近年報告されている文献^{35,36}の結果と類似の結果を示している。

③ インドメタシン及びプレガバリンの単回投与における行動変化

上記の結果から PSL モデルにおける GAIT システムの歩様異常の検出は、ラットの後肢異常のパラメーターとして有用であることから、次に鎮痛薬を投与し、歩様異常の改善がみられるか調査した。まずプレガバリンの単回投与を行った結果、PSL 手術群の歩様異常の改善は、投与前と比較し、投与後 30 分から 60 分の間に確認された (Figure 8a)。しかしながら、基剤を投与した群では、投与開始前から投与開始後 120 分まで統計学的有意差は確認できなかった (Figure 8a)。プレガバリンを投与した PSL 手術群の処置肢の PWT 値は、投与開始後 30 分から 90 分の間に統計学的有意な改善が確認されたが、120 分 (11.1 ± 2.5 gram) にはその効果が消失した (Figure 8b)。Unilateral hot plate 試験による PWT 値の統計学的有意な改善は、投与開始 30 分 (7.8 ± 1.8 sec) から見られたが、120 分 (7.5 ± 1.5 sec) にはその効果が消失した

(Figure 8c)。他方、インドメタシンを投与した PSL 手術群では、STR 値、PWT 値、PWL 値は試験を通じて近似値を示し、改善の傾向は確認できなかった (Figure 9a–9c)³⁷。Pearson correlation coefficient analysis による行動学的指標間の相関性の解析結果から、GAIT システムによる STR 値と von Frey 試験による PWT 値の間で最も相関性が顕著に現れた (Table 2)。

④ インドメタシン及びプレガバリンの反復投与における行動変化

最後に慢性的な神経障害性疼痛に対するプレガバリンの鎮痛効果を検証するため、12 日間連日投与を行い、歩様異常に対する効果を調査した。プレガバリンを投与した PSL 手術群における STR 値は、投与開始 3 日目から改善し、その効果は投与開始 12 日目、投与開始後 3 日目 (0.957 ± 0.013) まで持続した。他方、基剤を投与した群では、試験を通じて統計学的有意な変化は確認されなかった (0.815 ± 0.024 、Figure 10a)。STR 値の結果と同様に PWT 値 (23.7 ± 1.8 gram) 及び PWL 値 (13.1 ± 0.3 sec) は、投与開始後 3 日目の測定から投与期間中、統計学的有意に改善された (Figure 10b、10c)。しかしながら、投与終了 3 日後には、その改善効果が消失し、統計学的有意差は見られなくなった。また基剤投与群は、PSL 手術群における PWT 値 (18.0 ± 1.1 gram) 及び PWL 値 (9.4 ± 0.6 sec) を改善させなかった (Figure 10b、10c)。

ピアソン積率相関係数	
von Frey試験 vs GAIT試験	0.784
von Frey試験 vs Hot plate試験	0.815
Hot plate試験 vs GAIT試験	0.879

Table 2 PSL手術後14日目のGAIT試験、von Frey試験（手術肢）、Hot plate試験（手術肢）のピアソン積率相関係数

ピアソン積率相関係数は、1の近似値程正の相関があり、-1の近似値程負の相関がある。PSL手術後14日目の各試験のピアソン積率相関係数を算出したところ、Hot plate試験とGAIT試験の間で最も正の相関性があることが分かった。

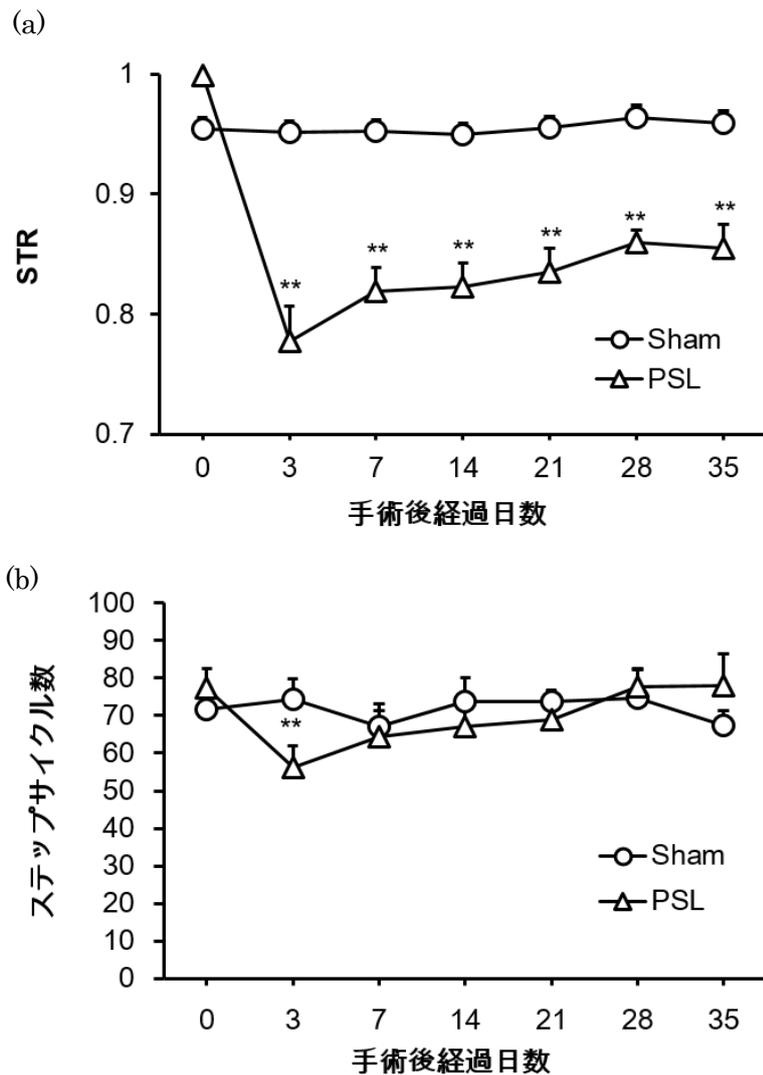


Figure 4 PSL 手術後の歩様の変化

PSL 手術後の(a) Swing time ratio (STR)と(b) GAIT 試験時のステップサイクル数は、手術後 3 日目に統計学的有意に減少した。しかしながら、Sham 手術を施した群では、手術後 35 日目まで明らかな変化は見られなかった。

全てのデータは、平均値 ± 標準誤差で表している。統計学的検定は、Fisher's LSD で行った。 $**P < 0.01$ は、各測定日における Sham 手術群と比較した時の統計学的有意差を表している。

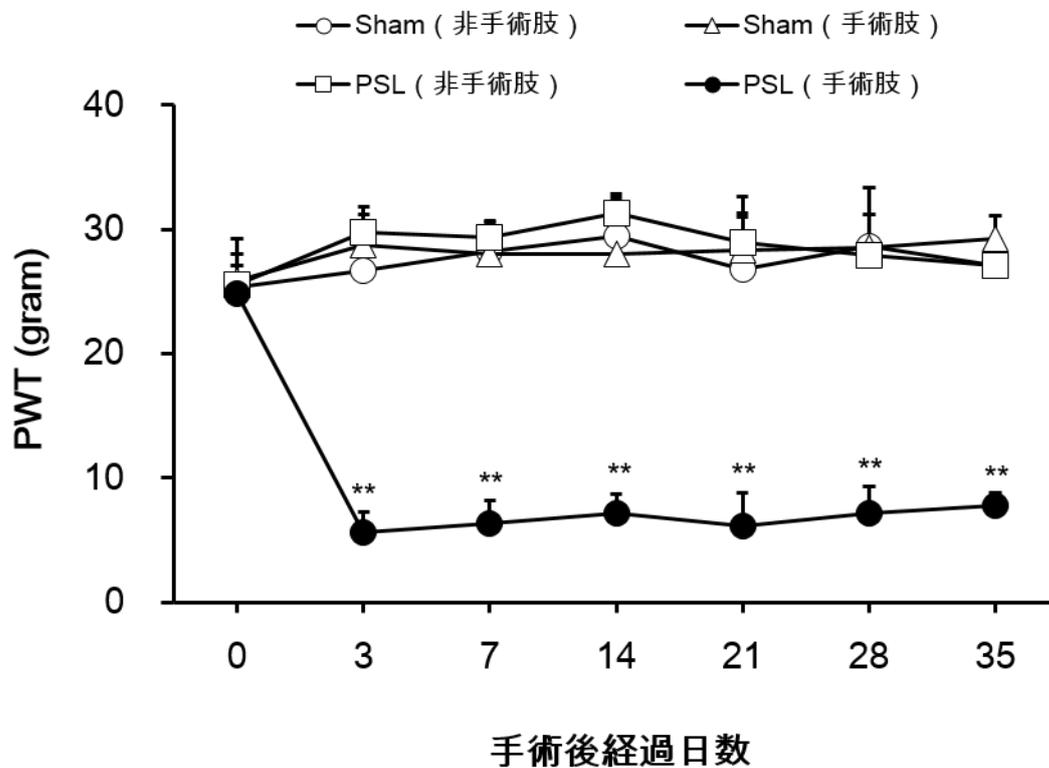


Figure 5 PSL 手術後の Paw withdrawal threshold (PWT) の変化

PSL 手術群では、手術後 3 日目より 35 日目まで PWT 値は有意に低下した。一方、Sham 手術群では、試験を通じて統計学的有意な変化は見られなかった。全てのデータは、平均値 ± 標準誤差で表している。統計学的検定は、Fisher's LSD で行った。 $**P < 0.01$ は、Sham 手術群の同肢と比較した時の統計学的有意差を表している。

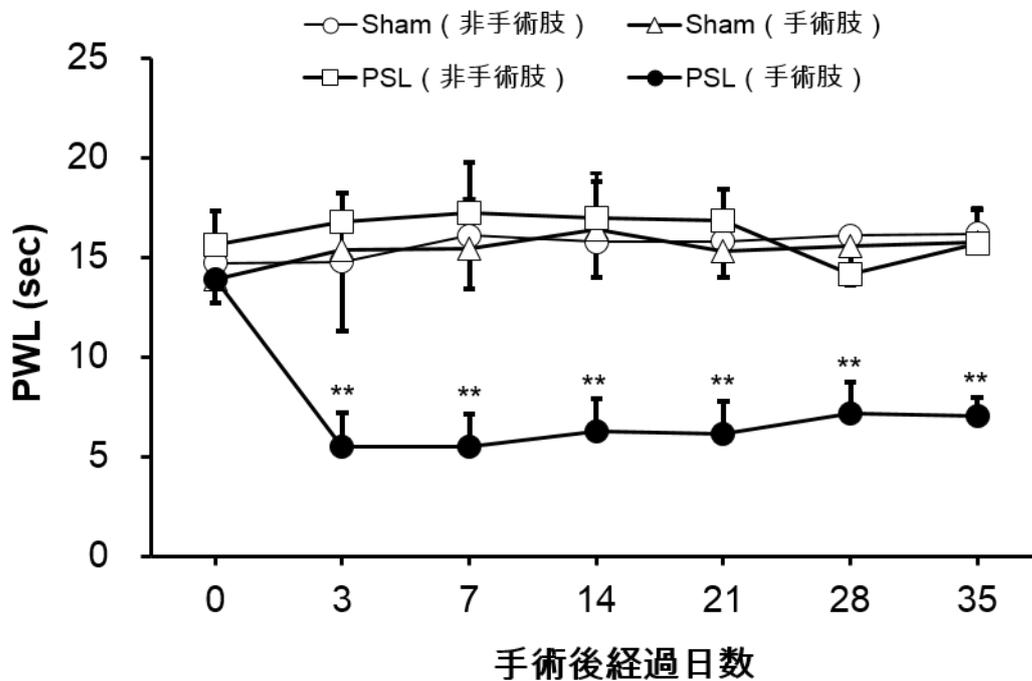


Figure 6 PSL手術後のPaw withdrawal latency (PWL)の変化

PSL手術群では、手術後3日目より35日目までPWL値は有意に低下した。一方、Sham手術群では、試験を通じて統計学的有意な変化は見られなかった。全てのデータは、平均値 ± 標準誤差で表している。統計学的検定は、Fisher's LSDで行った。 $**P < 0.01$ は、Sham手術群の同肢と比較した時の統計学的有意差を表している。

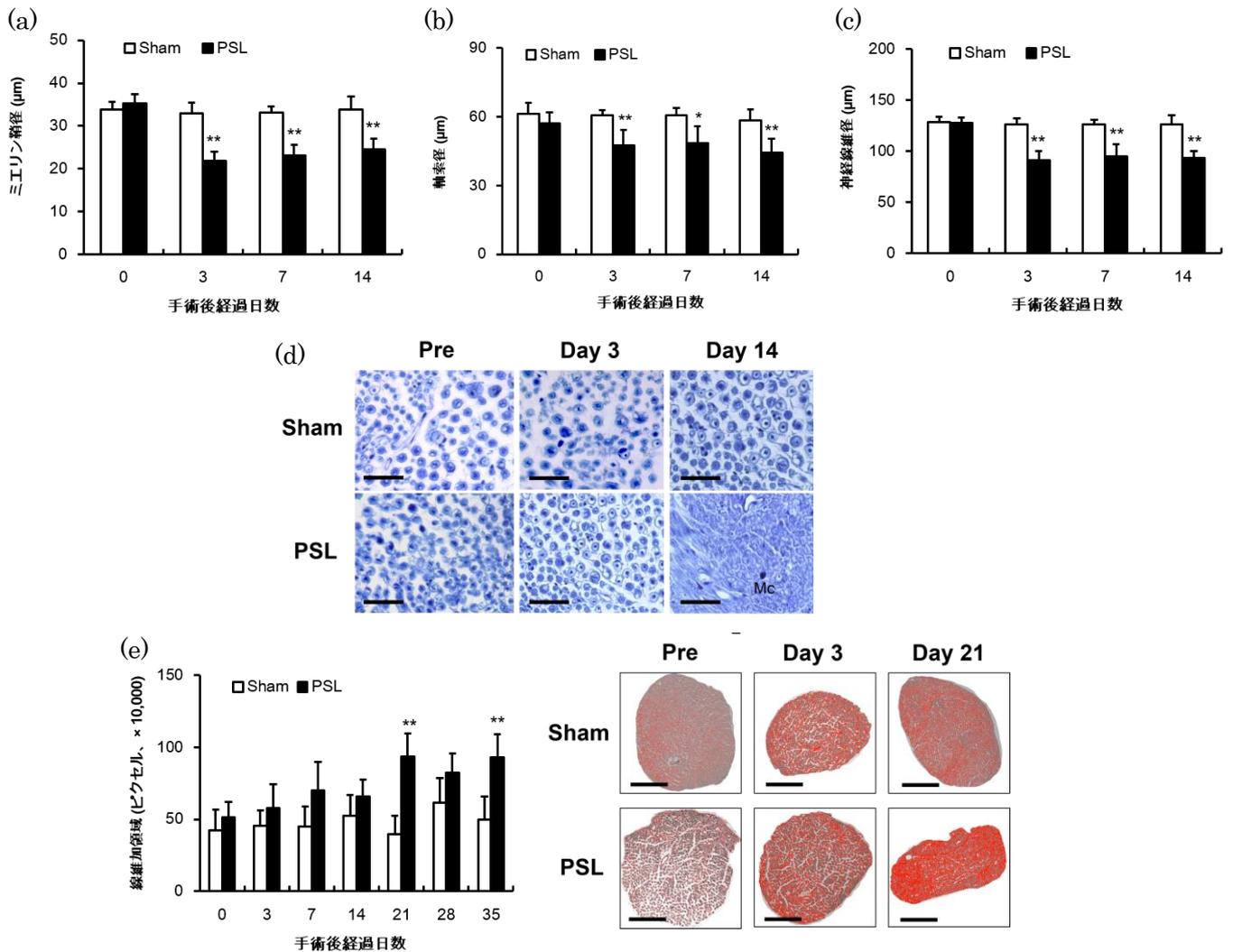


Figure 7 PSL 手術後の坐骨神経の病理組織学的変化

手術後 14 日目までの(a) ミエリン鞘径、(b) 軸索径、(c) 神経線維径と手術後 35 日目までの線維化領域。(d) トルイジンブルー染色による結紮肢坐骨神経の病理組織像。Mc は坐骨神経内に浸潤した肥満細胞を示した。スケールバー：50 μm。(e) 神経線維径を Image J Version 1.47 を用いてピクセル計算にて算出した。線維性組織の占める領域を赤色で示した。全てのデータは、平均値 ± 標準誤差で表している。スケールバー：200 μm。統計学的検定は、Fisher's LSD で行った。 $*P < 0.05$ 、 $**P < 0.01$ は、Sham 手術群と比較した時の統計学的有意差を表している。

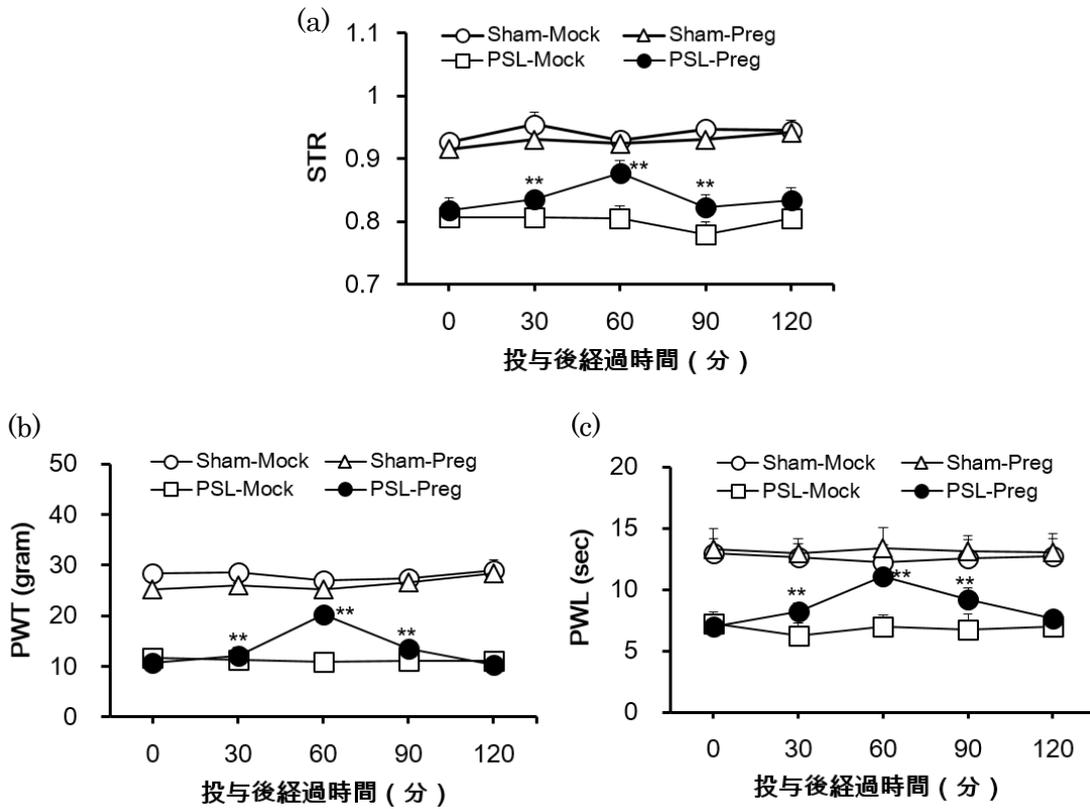


Figure 8 プレガバリン単回投与による PSL モデルの歩様と痛覚閾値の変化
 プレガバリン (Preg) または基剤 (Mock) を経口投与にて単回投与後 120 分
 までの(a) Swing time ratio (STR)値、(b) Paw withdrawal threshold (PWT)
 値、(c) Paw withdrawal latency (PWL) 値を評価した。全てのデータは、平
 均値 ± 標準誤差で表している。統計学的検定は、Fisher's LSD で行った。****P**
< 0.01 は、同モデルの基剤投与群と比較した時の統計学的有意差を表してい
 る。

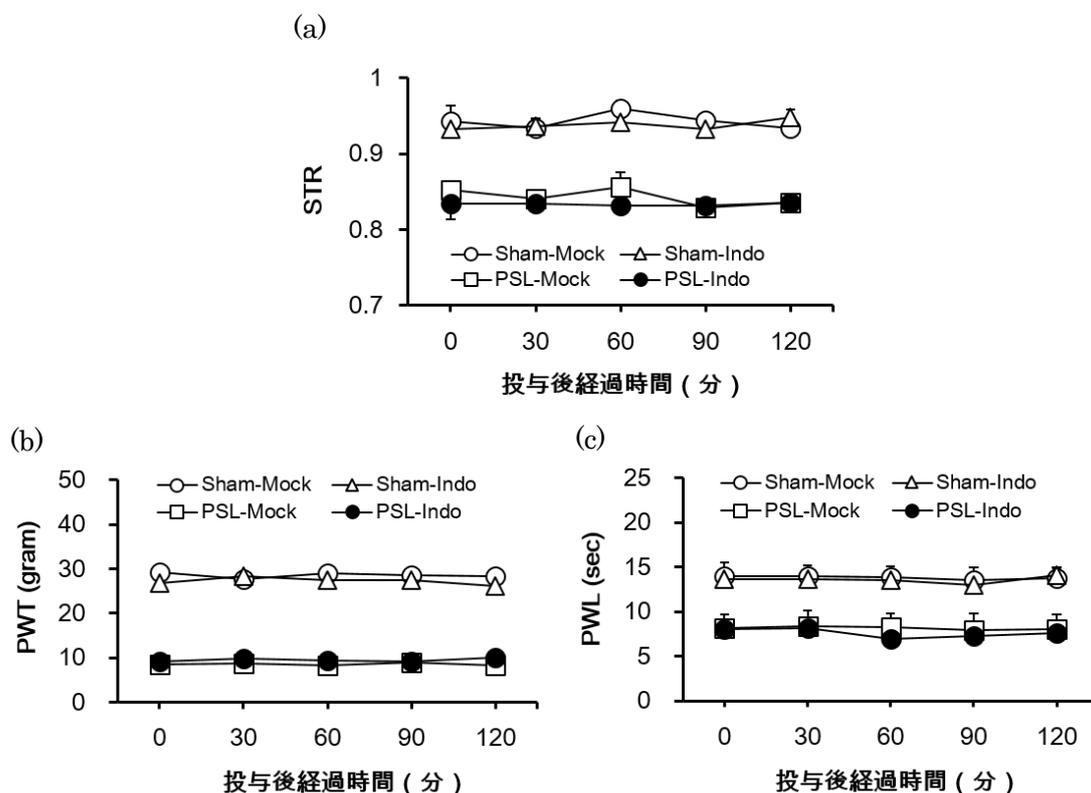


Figure 9 インドメタシン単回投与による PSL モデルの歩様と痛覚閾値の変化
 インドメタシン (Indo) または基剤 (Mock) を経口投与にて単回投与後 120
 分までの(a) Swing time ratio (STR) 値、(b) Paw withdrawal threshold
 (PWT) 値、(c) Paw withdrawal latency (PWL) 値を評価した。全てのデータ
 は、平均値 ± 標準誤差で表している。統計学的検定は、Fisher's LSD で行っ
 た。

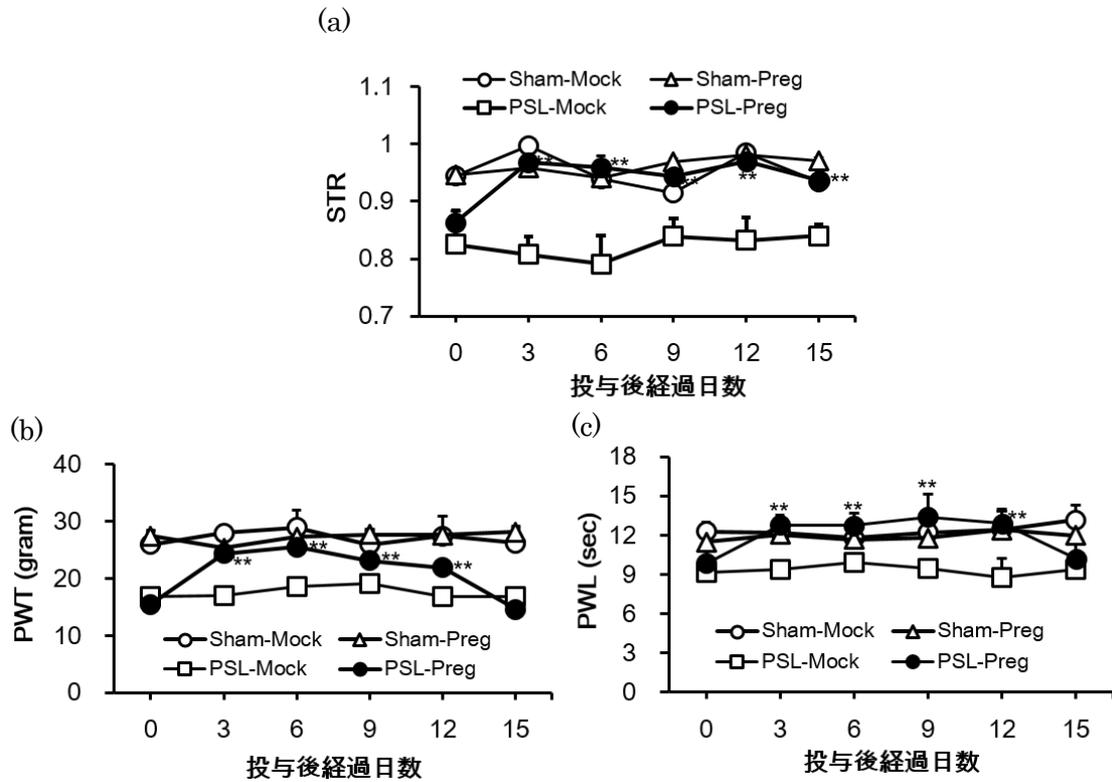


Figure 10 プレガバリン反復投与による PSL モデルの歩様と痛覚閾値の変化
 プレガバリン (Preg) を経口投与にて反復投与後の各測定日の(a) Swing time ratio (STR) 値、(b) Paw withdrawal threshold (PWT) 値、(c) Paw withdrawal latency (PWL) 値の変化を検証した。なお、投与は 12 日目まで行い、各測定項目の評価は投与中止後 3 日目 (投与後経過日数 15 日目) まで行った。全てのデータは、平均値 ± 標準誤差で表している。統計学的検定は、Fisher's LSD で行った。** $P < 0.01$ は、同モデルの基剤投与群と比較した時の統計学的有意差を表している。

(3) 考察

静的アロディニアは、神経障害性疼痛における典型的な症状の1つであり、動物モデルでは機械的アロディニアを評価する von Frey 試験や温熱的アロディニアを評価する Hot plate 試験によって解析されている。しかしながら、その結果は手技者のスキル、温湿度などの環境条件に大きく依存するため、熟練したスキルが必要である。一方、動のアロディニアを行動学的かつ正確に捕捉する技術が過去に示唆されてきた。Vrinten と Hemers⁵⁰ は、CatWalk システムを用いた自発運動時の歩行解析と機械的アロディニアの評価によって、神経障害性疼痛の重症度を評価できることを報告し、さらにそれらが関連していることを示唆している⁵⁰。CatWalk システムは自発運動時の多様なパラメーター（歩幅、歩方向、足裏圧、接地面積、Swing time など）を算出するが、自発運動によって得られた結果は、トレッドミルなどの強制的な歩行を強いられる状況とは歩行機能の解析基準が異なる。また、自然歩行解析のために疼痛を惹起するとそもそもモデル動物が歩行しないという問題点が指摘されていた⁵⁰。さらに再現性に乏しく、Vrinten と Hemers⁵⁰ らの報告からしばらくして、全く反対の結果が報告されている⁵¹。そのため、より利便で繊細にアロディニアに基づく接地逃避行動を捕捉できる評価系が望まれていた。GAIT システムは、ホイール内を一定の速度で半強制的に歩行させるため、重度の痛みや麻痺を呈するラットから正確に歩様を捉えることができ、強制歩行による評価（トレッドミルなど）と比較してより自然な歩行を可能にしている。そこで本研究では、GAIT システムより得られた STR が重度の神経障害性疼痛モデルの歩様異常を捉えることができるか検証した。STR は PSL 処置を行った群で有意に低下し、この結果は von Frey 試験や Unilateral hot plate 試験の結果と高い相関性を示した。対照的に Sham 群では、PSL 処置群のような STR の明確な変

化は確認できなかった。この結果は、GAIT システムによって得られた STR が、PSL 誘発性神経障害性疼痛の評価に有用であることを示唆している。病理組織学的解析における病理学的変化は PSL 処置を行った肢に局限していたことから歩様異常は組織損傷と神経組織のリモデリングによって誘発されていると示唆される。慢性疼痛及び神経障害性疼痛の緩和は最も重要な臨床課題であり²²、機械的または温熱的疼痛の評価と歩様異常の解析は慢性疼痛に対する鎮痛成分の選定に有用である²²。本研究における薬効評価試験では、非選択性 COX-1、COX-2 抑制剤であるインドメタシン投与は統計学的有意な変化を示さなかった。事実、Labuda と Little⁵¹ は神経障害性疼痛モデルに対するインドメタシン投与は、抗アロディニア作用を示さないと報告している。彼らの研究と同様に本研究でも PSL 処置を行ったラットにおいて、抗アロディニア作用や歩様異常の改善は確認できなかった。他方、Cao らによる研究⁵² はプレガバリンが抗アロディニア作用を示すことを示唆しており、本研究においてもプレガバリンの単回投与によって von Frey 試験と同様に一時的な STR の改善が確認できた。さらにプレガバリンの反復投与は、STR を通常の数値まで引き上げた。これらの結果から GAIT システムを用いた STR 解析による動的体重負荷の評価は、神経障害性疼痛モデルラットに対して有用であり、慢性疼痛における新規治療薬の探索に用いることが可能であると考えられる。

【4】小括

神経障害性疼痛の症状は、侵害受容線維である C 線維の神経損傷に基づく持続的な興奮によって放出される過剰な発痛物質（ブラジキニンやセロトニンなど）に起因し、神経興奮の閾値が低下することによってアロディニア並びに痛覚過敏を呈し、自発痛を伴う。動物モデルを用いた本病態の検討でも、神経損傷によって誘発される症状は患者のそれと類似したものであり、肢裏の痛覚閾値の変化は病態の重症度を知る上で非常に重要な意義がある。しかしながら、患者の QOL を低下させる要因は、主に自発痛に基づく歩行困難などの動的行動学的異常に起因している。そのため近年、神経障害性疼痛モデル動物における動的異常の検出方法の検討が行われてきたが、静的痛覚異常を強く反映する方法の発見には至らなかった。本研究では、歩様異常自動定量化装置 GAIT システムによる解析が神経障害性疼痛に基づく運動量の低下と動的行動異常を反映することを見出した。さらに、神経障害による動的変化は、静的変化と同様の経過を辿ることが分かった。これらのことから STR の解析は動物モデルにおける動的異常を検出するための有用なパラメーターになることが示唆された。

神経障害性疼痛モデル動物の行動学的評価では前項の結果を踏まえ、PSL 手術を行い、皮膚切開などの組織損傷に起因する炎症性の疼痛が緩和され治癒した後に PSL モデルラットを薬効評価実験に供した。インドメタシンは、COX 活性を阻害することによりプロスタグランジン産生に基づく発痛を抑制する。一方、プレガバリンは神経細胞に発現している Ca^{2+} チャンネルの 1 種である $\alpha 2\text{-}\delta 1$ サブユニットの阻害剤であり、 $\alpha 2\text{-}\delta 1$ サブユニットの活性による神経細胞からのグルタミン酸放出を抑制することで鎮痛作用を発揮する。本研究では、PSL 手術を行った群においてインドメタシンの単回投与によるアロディニアの緩和効果や歩様異常の改善は見られず、プレガバリンを単回投与したところ限

局的ではあるが、投与後 60 分にアロディニアの消失ならびに歩様異常の有意な改善が見られたことから、PSL 処置によって惹起された神経障害性疼痛は、 $\alpha 2\text{-}\delta 1$ サブユニット依存的な細胞内への Ca^{2+} 流入に起因する神経活性が過敏な痛覚応答や逃避反射などの行動学的異常を誘発していると考えられた。しかしながら、プレガバリンの反復投与による結果が示唆しているようにアロディニアの症状や歩様異常の改善は、持続的に投与し続けると鎮痛効果を示すが、投薬を中止した後はまた同程度の神経障害性疼痛を惹起することが示唆された。

第2章 アトピー性皮膚炎モデルマウスを用いた痒みの定量化

【1】序論

日本皮膚科学会の「アトピー性皮膚炎の定義、診断基準」によれば、アトピー性皮膚炎とは、「増悪と寛解を繰り返す、掻痒のある湿疹を主病変とする疾患」⁵³であり、多くの患者は家族歴、既往歴（気管支喘息、アレルギー性鼻炎、結膜炎、アトピー性皮膚炎の内の一つまたは複数の疾患）やアトピー素因（IgE抗体を産生し易い）を有している⁵³。アトピー性皮膚炎は環境要因（ハウスダストなど）と遺伝子変異要因（フィラグリンなど）により発症誘導され¹⁸、種々のストレスは病勢を悪化させる。欧米型のライフスタイルへの変化とともに、我が国でも確実に患者数は増加しており、罹患率は15%前後で推移している⁵³。アトピー性皮膚炎の主な症状は、定義にもある通り掻痒と湿疹である。アトピー性皮膚炎において、湿疹は掻痒を惹起し、掻痒感による患部の掻破行動は湿疹を悪化させ、さらなる掻痒を誘発する（Itch-Scratch サイクル）⁵⁴。この Itch-Scratch サイクルが惹起する掻破行動によって、破壊と修復を繰り返す一次求心性神経終末は神経成長因子 NGF やメタロプロテアーゼなどの基底膜分解因子の作用により表皮層まで浸潤し、痒み刺激を伝達する C 線維自由神経終末も表皮層に達することから外部起痒刺激に対して鋭敏になる。そのため、痒みとそれに伴う掻破行動は根幹をなしており、痒みと掻破行動の抑止が多くの研究の焦点となっている。

近年、様々なアトピー性皮膚炎の動物モデルが報告されている。NC/Tnd マウスはその代表例で、Specific pathogen free (SPF) 環境下で飼育すると皮膚炎症状を発症しないが、空気清浄や消毒を行わない Conventional 環境下で飼育すると生後8週齢前後を境として強い掻痒を伴う乾燥性の皮膚炎を自然発症する⁵⁵。

扁平上皮層の過形成、肥満細胞の脱顆粒、真皮層への好酸球中心の炎症性細胞浸潤、CD4 陽性 T 細胞や肥満細胞からのインターロイキン 4 の産生、Th2 型反応による血中総 IgE 値の上昇などといった免疫学的または分子生物学的解析結果によって、その皮膚炎がヒトのアトピー性皮膚炎に酷似していることが分かっている⁵⁶。従って、NC/Tnd マウスを用いた各種因子や細胞の役割の検証は、アトピー性皮膚炎の病態を知る上で非常に重要なツールとなっている。

かゆみは本来、生体における危機応答および回避を誘発する反応のひとつであるが、アトピー性皮膚炎に代表される過剰で持続的なかゆみとそれに伴う搔破行動は、ストレスとなって生理学的機能障害を惹起し、病勢の増悪化と患者の QOL を著しく低下させる。動物モデルを用いた痒みの評価方法は、後肢で病変部あるいは発痒物質投与部位を引っ掻く、搔破行動の測定が最も一般的な方法で、手技者による肉眼的観察が一般的な方法として用いられてきた⁵⁷。測定手順が容易であること、安価に行えることがそのメリットとして挙げられるが、この方法は手技者による主観混入による結果のばらつき、データ取得効率の悪さ、測定精度の低さ、測定時間の制限などが問題となるが多かった。そのため、アトピー性皮膚炎に代表される、かゆみを主訴とする疾患患者数が増加するに当たって、より客観的で精度の高い搔破行動の自動解析システムが開発されてきた^{58,59}。

本項では、上記のような問題解決を目指して開発された次世代型擦過行動自動定量化システム SCLABA[®]-Real を用いてアトピー性皮膚炎モデル NC/Tnd マウスの搔破行動を定量化し⁵⁹、種々の条件における搔破行動とアトピー性皮膚炎の病勢増悪化との関連性を解析した。

【2】搔痒の定量的評価の検討

(1) 材料と方法

① 使用動物

体重 16 g–27 g の SPF 環境下及び Conventional 環境下で飼育された NC/Tnd 雄性マウス 6–17 週齢を用いた。恒温 ($22\pm 4^{\circ}\text{C}$)、恒湿 ($40\pm 15\%$)、人工照明 (7:00–19:00) の一定環境下で飼育し、離乳後は固形飼料 (CRF-1) 及び水道水を自由に摂取させた。1 週間の馴化期間の後実験に供した。なお、本研究は東京農工大学動物実験委員会の承認の下で行った。

② 痒みの定量的評価方法

フレーム間差分抽出法の原理に基づき、画像処理組込型高速度カメラを用いて搔破行動の抽出を行った。本手法には、次世代型擦過行動自動定量化システム SCLABA[®]-Real を用い、毎秒 240 フレームの割合で動物の動きを記録し、動物が 1 フレーム毎に動いた面積 (フレーム間差) をリアルタイムで算出した⁶⁰。独自のパラメーターで得られたデータは、SCLABA[®]-Real 解析用ソフトを用いて搔破行動として定量化した。

③ 皮膚炎重症度臨床症状スコアの評価

NC/Tnd マウスの皮膚炎症状が顔面、頸背部皮膚に現れることから、当該部位の皮膚炎症状を①Pruritus/Itching (搔痒症)、②Erythema/Hemorrhage (発赤・出血)、③Edema (浮腫)、④Excoriation/Erosion (擦過傷、組織欠損)、⑤Scaring/Dryness (痂皮形成、乾燥) の 5 項目について、左記に示すスコア①0 点 (無症状)、②1 点 (軽度)、③2 点 (中等度)、④3 点 (重度) により評点化を

行った⁵⁵⁾。

なお、評点化の2日前にバリカンにて頸背部の除毛処置を行った。

④ 統計処理

全てのデータは、統計処理ソフト SigmaPlot[®]11 を用いて、平均値±標準偏差 (SEM) で表記し、各群間比較は Tukey's test を用いて検定を行った。上記の検定結果における $P < 0.05$ を統計学的に有意と判定した。

(2) 結果

① SPF NC/Tnd マウスの皮膚炎重症度臨床症状スコアの変化

搔破行動回数の変化と同様に SPF 環境下で飼育された NC/Tnd マウスでは、生後 6 週から 15 週の間にかけて全ての個体で 0 点を記録し、統計学的有意な変化は認められなかった (Figure 11a)。

② Conventional NC/Tnd マウスにおける皮膚炎重症度臨床症状スコアの変化

Conventional 環境下で飼育された NC/Tnd マウスでは、皮膚炎重症度臨床症状スコアは生後 6 週から 15 週にかけて時系列的に増加した。この結果も搔破行動回数の変化と同様の傾向を示している (Figure 11a)。

③ SPF NC/Tnd マウスの搔破行動回数の変化

SPF 環境下で飼育されたマウスの搔破行動回数は、週齢を重ねても 15 週齢時までに有意な変化は見られなかった (Figure 11b)。

④ Conventional NC/Tnd マウスにおける搔破行動回数の変化

Conventional 環境下で飼育された NC/Tnd マウスでは、12 週齢時に 6 週齢や 9 週齢と比較して統計学的有意な搔破行動回数の増加が確認された。また、12 週齢時と比較して 15 週齢時に搔破行動回数はさらに増加した (Figure 11b)。

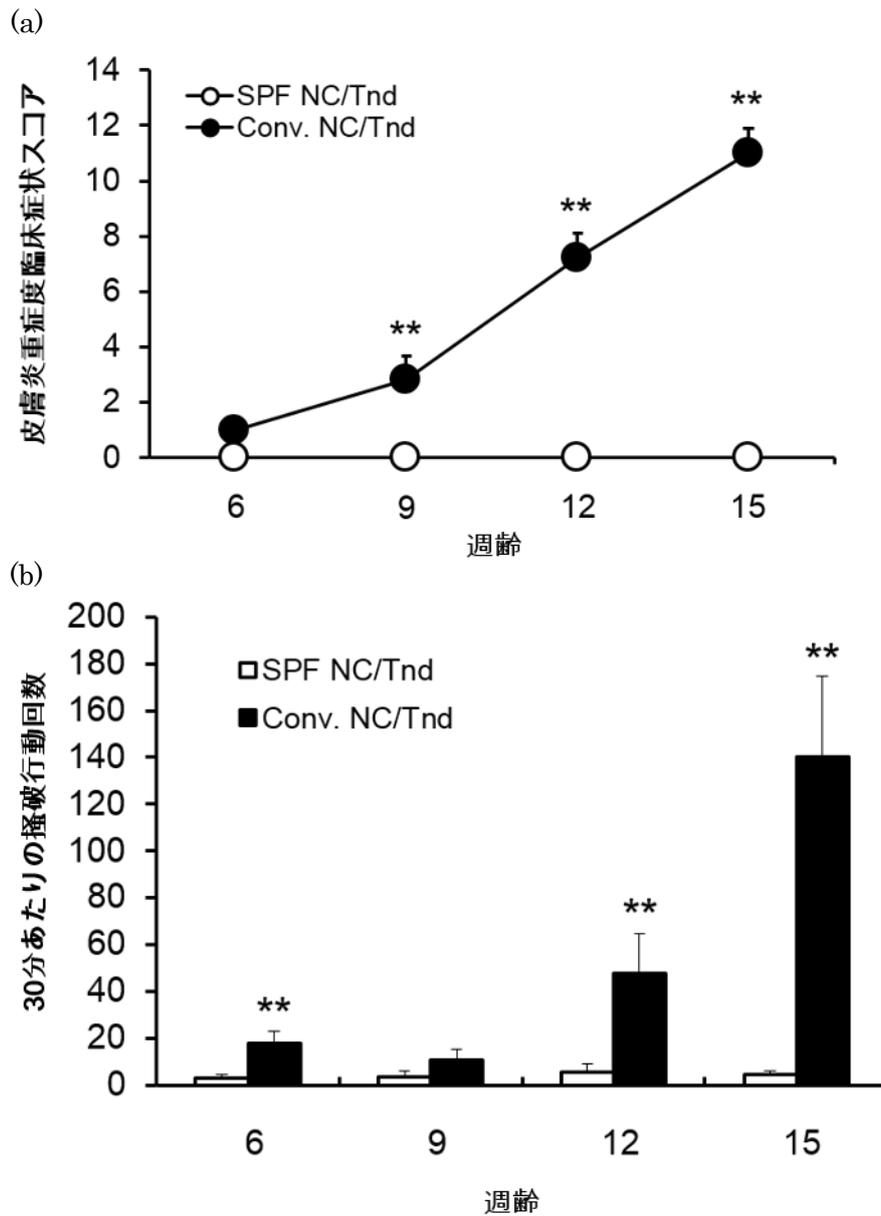


Figure 11 Conventional (Conv.) 及び SPF 環境下で飼育された NC/Tnd マウスの加齢に伴う臨床症状の変化

6 週齢から 15 週齢の 3 週齢毎の(a) 皮膚炎重症度臨床症状スコア、(b) 掻破行動回数を示す。全てのデータは、平均値 ± 標準誤差で表している。統計学的検定は、Tukey's test で行った。 $**P < 0.01$ は、各週齢における SPF NC/Tnd マウスと比較した時の統計学的有意差を表している。

(3) 考察

SPF 環境下で飼育した NC/Tnd マウスでは、皮膚炎重症度臨床症状スコアは全ての個体で 0 点（無症状）を示した。また、搔破行動回数も 6 週齢から 15 週齢にかけて、0 から 20 回と非常に低い値で推移し、統計学的有意な変化は確認できなかった。

一方、Conventional 環境下で飼育した NC/Tnd マウスにおいて、搔破行動回数及び皮膚炎重症度臨床症状スコアは週齢依存的に有意に上昇した。

このことから皮膚炎重症度と搔破行動回数には強い因果関係があり、皮膚炎重症度が上昇するにつれて搔破行動回数は増加すると考えられる。事実、アトピー性皮膚炎の患者において、その症状の重症度が高くなるにつれて搔破行動回数は増加する傾向にあるとの報告がある。

また、アトピー性皮膚炎の病勢の増悪化について、搔破行動による皮膚バリアの破壊がアレルゲンの侵入を容易にし、皮膚病変における増殖表皮細胞並びに免疫担当細胞の過剰応答を誘発し、さらなる起痒物質の放出を誘導すると考えられている。そのため、動物モデルにおける痒みのより客観的な定量方法の確立は、アトピー性皮膚炎という難治性疾患の病態の調査や医薬品開発において非常に重要な評価項目である。搔破行動を検出できると謳われている検出システムは存在するが、現時点でスタンダードとして使用されているものは存在しない。そのため、SCLABA[®]-Real システムを用いた本研究による成果は、より客観的なアトピー性皮膚炎の病態の解析に大きく寄与することができると考えられる。

【3】アトピー性皮膚炎の病勢と痒み行動量の変化の検討

(1) 材料と方法

① 使用動物

体重 17 g–26 g の Conventional 環境下で飼育された NC/Tnd 雄性マウス 14–17 週齢を用いた。恒温 ($22 \pm 4^\circ\text{C}$)、恒湿 ($40 \pm 15\%$)、人工照明 (7:00–19:00) の一定環境下で飼育し、離乳後は固形飼料 (CRF-1) 及び水道水を自由に摂取させた。1 週間の馴化期間の後実験に供した。なお、本研究は東京農工大学動物実験委員会の承認の下で行った。

② 0.1%タクロリムス軟膏の塗布

タクロリムス軟膏はアトピー性皮膚炎患者の皮膚炎緩和と痒みの抑制に有用であることが知られている⁶¹。そこで、0.1%タクロリムス軟膏の連日塗布が搔破行動の変化に影響を与えるか調査するため、Conventional 環境下で飼育された NC/Tnd マウスに対して本試薬を 100 mg/day の塗布量で頸背部皮膚に塗布した⁶²。

③ 搔破行動の測定及び解析

搔破行動の測定は、次世代型擦過行動自動定量化システム SCLABA[®]-Real を用いて、1 週間に 1 度、30 分間測定を実施し、搔破行動の変化を解析した⁶⁰。マウスの環境馴化は、測定開始の 30 分前より測定用アクリル製ケージを用いて行い、測定時は無人暗所環境下でマウスの行動を記録した⁶⁰。解析条件は $\theta_c = 23$, $\tau_0 = 45$, $\tau_1 = 85$, $\tau_2 = 150$ とした⁵⁸。

④ 皮膚炎重症度臨床症状スコアの評価

皮膚炎症状重症度スコアの変化が搔破行動の結果に反映されているか確認するため、皮膚炎重症度臨床症状スコアもあわせて評価した。

NC/Tnd マウスの皮膚炎症状が顔面、頸背部皮膚に現れることから、当該部位の皮膚炎症状を①Pruritus/Itching (搔痒症)、②Erythema/Hemorrhage (発赤・出血)、③Edema (浮腫)、④Excoriation/Erosion (擦過傷、組織欠損)、⑤Scaring/Dryness (痂皮形成、乾燥) の 5 項目について、左記に示すスコア①0点 (無症状)、②1点 (軽度)、③2点 (中等度)、④3点 (重度) により評点化を行った⁵⁵⁾。

⑤ 統計処理

全てのデータは、統計処理ソフト SigmaPlot[®]11 を用いて、平均値±標準偏差 (SEM) で表記した。各群間比較は Dunnett's test、Tukey's test、Steel's test を用いて検定を行った。上記の検定結果における $P < 0.05$ を統計学的に有意と判定した。

(2) 結果

① 0.1%タクロリムス軟膏の塗布による皮膚炎重症度臨床症状スコアの変化

0.1%タクロリムス軟膏塗布によって皮膚炎重症度臨床症状スコアは、無処置群と比較して塗布開始 3 日目以降に有意に減少した (Figure 12a)。特に塗布開始 9 日目以降にスコアは重症度が軽度と判定できるまで減少した。一方、無処置群では、経過観察 3 日目以降に皮膚炎重症度臨床症状スコアは有意に増加し、経過観察 12 日目以降に重度の皮膚炎を有すると判定できるスコアまで増加した。(Figure 12a)。

② 0.1%タクロリムス軟膏の塗布による搔破行動の変化

0.1%タクロリムス軟膏塗布による搔破行動回数の解析結果は、対照群と比較して時系列的に有意に減少した (Figure 12b)。特に測定開始 7 時間後までは有意差はあるものの、対照群と比較して大きな差はないが、測定開始 8 時間後から 24 時間後までに対照群と比較して、搔破行動回数の明らかな抑制効果が確認できた (Figure 12b)。

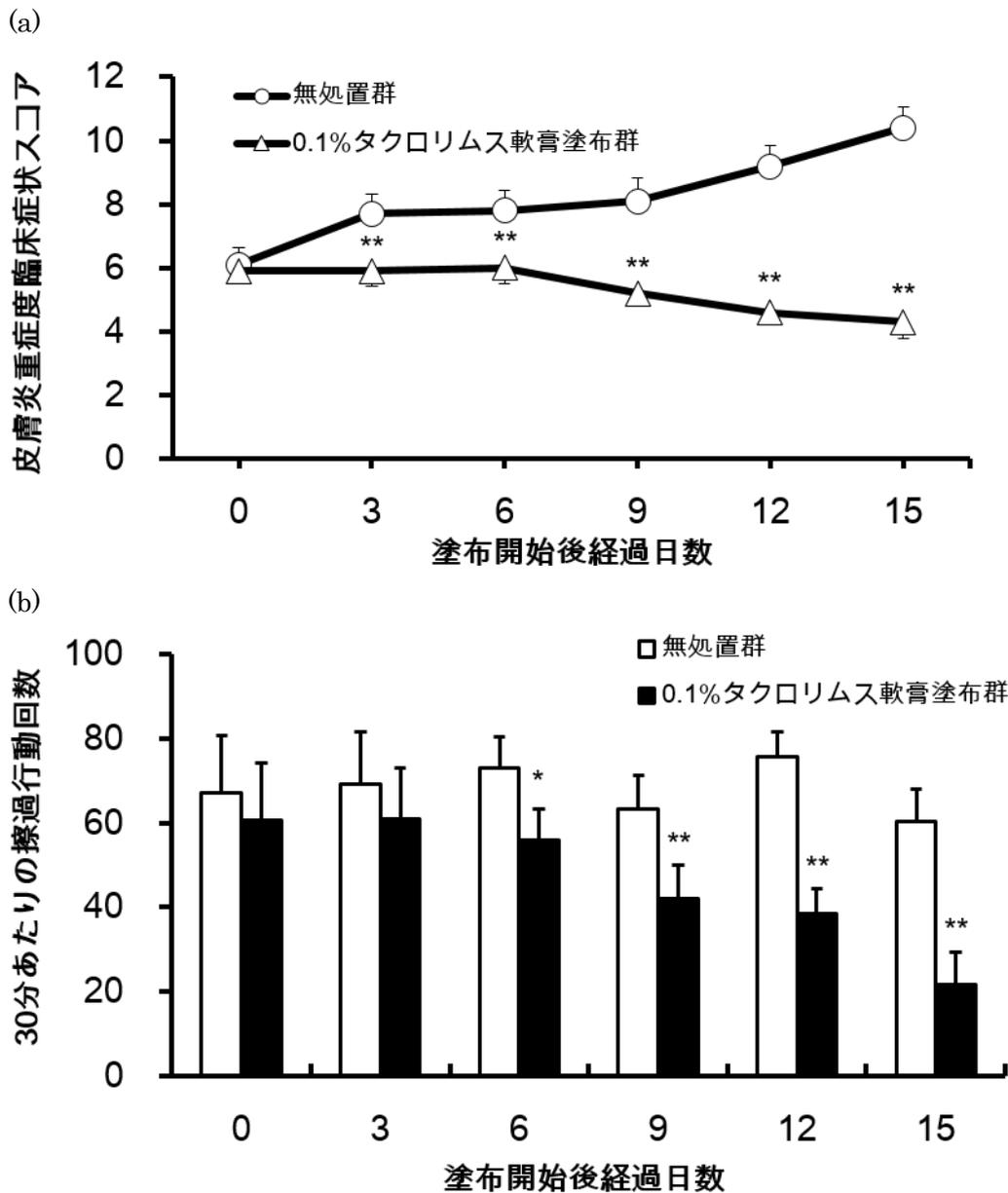


Figure 12 0.1%タクロリムス軟膏塗布による Conventional (Conv.) NC/Tnd マウスの皮膚炎臨床症状と搔破行動の変化

0.1%タクロリムス軟膏を8週齢の Conventional NC/Tnd マウスに連日塗布し、3日毎に(a) 皮膚炎重症度臨床症状スコア、(b) 搔破行動回数を評価した。全てのデータは、平均値 ± 標準誤差で表している。統計学的検定は、Tukey's test で行った。 $*P < 0.05$ 、 $**P < 0.01$ は、各測定日における無処置群と比較した時の統計学的有意差を表している。

(3) 考察

0.1%タクロリムス軟膏は、アトピー性皮膚炎治療薬として広く利用されているカルシニューリン阻害機序に基づく炎症緩和の薬剤である。本項において、NC/Tnd マウスに対して 0.1%タクロリムス軟膏を連日塗布することで皮膚炎症状の緩和と搔破行動回数の減少が示されたことは、皮膚炎臨床症状と搔破行動回数の上に強い相関関係があることを示唆している。また、本項で使用した SCLABA[®]-Real システムのフレーム間差分解析が、90%以上の搔破行動を正確にキャプチャでき、また測定終了後のオフライン解析によって偽陽性行動を編集・除去することで約 100%の搔破行動を抽出することができたこと、さらに 0.1%タクロリムス軟膏によるアトピー性皮膚炎の鎮静化に伴う搔破行動回数の減少を本機器によって解析できたことから、SCLABA[®]-Real システムは痒みのモデル動物を用いた新たな評価系として有用であると考えられる。

【4】小括

痒みとそれに伴う搔破行動は、皮膚バリアの破壊を誘発しアレルギーの侵入を容易にする。アトピー素因を有した患者では、その時に肥満細胞や好酸球などの免疫担当細胞の過剰応答を誘発するため、大量の起痒物質が放出され、異常な搔痒感に見舞われる⁵⁴。このサイクルは、アトピー性皮膚炎の病態の慢性化において最も重要な要因となっている。アトピー性皮膚炎患者の QOL を著しく低下させる痒みの評価系は、搔破行動の解析で、動物モデルにおける搔破行動の解析は撮影した動画を基にした測定者のカウントが従来の方法である⁵⁷。しかし、主観性が強くデータのばらつきが大きいため、搔破行動の自動定量化ができる機器の開発が行われてきた。マグネットを利用した磁場変化の抽出解析や力変換器を利用した動物の反復動作の検出などがその代表例⁶³であるが、搔破行動時に高速で動く動物の後肢の反復運動（1秒に10回以上）をより自然な形で抽出することが困難であった。本章で使用した SCLABA[®]-Real システムは、動物に対して侵襲的処置を行わず、より自然な形で搔破行動の抽出を行うことができることから⁵⁸、アトピー性皮膚炎モデルマウスの病態の増悪に伴う搔破行動の増加が本システムによって抽出ができるか検討した。

Conventional 環境下で飼育した NC/Tnd マウスでは、6 から 9 週齢の間で皮膚炎重症度臨床症状スコアが有意に増加し、9 から 15 週齢にかけてさらに増加した。8 週齢前後でアトピー性皮膚炎様症状が発症し、15 週齢前後で症状が慢性化するという Matsuda らの報告⁵⁵の再現性を取ることができた。また、SPF 環境下で飼育した場合には、症状を発症しないという点も類似したデータを得ることができた⁵⁵。

皮膚炎症状の発症に伴い、6 から 9 週齢の間で Conventional NC/Tnd マウスにおける搔破行動の増加が観察された。一方、非発症群（SPF NC/Tnd マウス

群) において搔破行動の増加は確認できなかった。

第3章 アトピー性皮膚炎に続発するうつ様行動異常病態の解析

【1】序論

うつ病とは、精神障害の一種であり抑うつ気分、意欲、嗜好性、精神活動の低下、不眠、持続した不安を行動学的主徴とする。生後、中枢神経系細胞は補われることはないと考えられてきたが、近年大脳辺縁帯領域である海馬歯状回において神経新生が起きていることが報告されており²⁸、うつ病を発症すると神経新生が低下することが示唆されている⁴。うつ病の診断には、DSM-Vなどの問診の他、光トポグラフィーなどが行われているが⁴、多種多様な疾患に続発する合併症として生じるため、複数の原因因子が病態形成を成しており、その経路が不明瞭で分類が困難である⁴。うつ病は慢性的な精神ストレスによって生じ、ストレス刺激に対する生体反応として視床下部－下垂体－副腎皮質系があるが、うつ病では、コルチコステロン受容体を介したこの閉鎖的フィードバック機構が破綻しており、ストレスによって産生される血中コルチコステロン濃度が顕著に増加する²⁸。さらに、コルチコステロンが海馬歯状回における神経新生を抑制し、うつ様行動異常を誘発することが報告されていることから、コルチコステロンがうつ様変化を誘導する分子の1種であると考えられている。そのため、コルチコステロン慢性投与によるうつ病動物モデルは主要なモデルとして知られている^{28,64}。

うつ病の治療には、主にセロトニンやノルアドレナリンに作用するセロトニン再取込阻害剤やセロトニン・ノルアドレナリン再取込阻害剤が利用されるが、上述の理由によりその効果は限局的である⁶⁵。アトピー性皮膚炎において、慢性的な精神ストレスの負荷と炎症反応は、重度なうつ疾患を誘発することが知ら

れている⁶⁶。特に皮膚湿疹によって惹起された掻痒感と患部の掻破行動の繰り返しは、しばしば不眠を誘発することから、痒みがうつ病の主要な原因と考えられている⁶⁷。近年の疫学的調査報告によると、アトピー性皮膚炎を有する患者は、他の慢性皮膚病変を主症状とする皮膚疾患患者と比較して、うつ発症率が優位に高く、アトピー性皮膚炎患者の10.1%がうつ疾患を発症し、15.2%の患者は自殺念慮や自傷行動を伴うと報告されている⁶⁸。皮膚などの末梢組織における慢性的な炎症反応によって過剰に産生されるインターロイキン1 β やインターロイキン6といった種々のサイトカインは、血液脳関門を容易に通過し、海馬における神経新生を抑制することでうつ様の感情・行動変化を誘発することが知られている⁶⁹。しかしながら、末梢組織における炎症反応は、うつ病を誘発する主要な経路であるにもかかわらず、そのメカニズムは不明瞭である。

本項では、SPF環境下で飼育すると皮膚炎症状を発症しないが、空気清浄や消毒を行わないConventional環境下で飼育すると生後8週齢前後を境として強い掻痒を伴う乾燥性の皮膚炎を自然発症するNC/Tndマウスを用いて、種々のうつ病に関連する行動学的試験と病理組織学的試験を実施し、アトピー性皮膚炎の合併症としてのうつ病の病態解析とその主要な原因となる標的分子の解析を行った。

【2】皮膚炎病勢に伴ううつ様行動異常の定量化

(1) 材料と方法

⑤ 使用動物

体重 16 g–27 g の SPF 環境下及び Conventional 環境下で飼育された NC/Tnd 雄性マウス 6–15 週齢を用いた。恒温 ($22 \pm 4^\circ\text{C}$)、恒湿 ($40 \pm 15\%$)、人工照明 (7:00–19:00) の一定環境下で飼育し、離乳後は固形飼料 (CRF-1) 及び水道水を自由に摂取させた。1 週間の馴化期間の後実験に供した。なお、本研究は東京農工大学動物実験委員会の承認の下で行った。(承認番号：27–34)

さらに、主要なうつ様症状を呈するモデルマウスの作製のため、7 週齢、22 から 34 グラムの C57/BL6 雄性マウスに 5 mg/kg/day の濃度のコルチコステロン加生理食塩水を 5 週間自由飲水させた。なお、濃度算出のため、1 週間毎日、マウスの飲水量を記録し、その平均値を 1 日の給水量として用いた⁶⁴。

⑥ 痒みの定量的評価方法

フレーム間差分抽出法の原理に基づき、画像処理組込型高速度カメラを用いて搔破行動の抽出を行った。本手法には、次世代型擦過行動自動定量化システム SCLABA[®]-Real を用い、毎秒 240 フレームの割合で動物の動きを記録し、動物が 1 フレーム毎に動いた面積 (フレーム間差) をリアルタイムで算出した。独自のパラメーターで得られたデータは、SCLABA[®]-Real 解析用ソフトを用いて搔破行動として定量化した⁶⁰。なお、測定条件は無人暗室で 30 分間の測定とし、測定前に 30 分間の馴化を行った⁶⁰。

⑦ 皮膚炎重症度臨床症状スコアの評価

NC/Tnd マウスの皮膚炎症状が顔面、頸背部皮膚に現れることから、当該部位の皮膚炎症状を①Pruritus/Itching (掻痒症)、②Erythema/Hemorrhage (発赤・出血)、③Edema (浮腫)、④Excoriation/Erosion (擦過傷、組織欠損)、⑤Scaring/Dryness (痂皮形成、乾燥) の 5 項目について、左記に示すスコア①0点 (無症状)、②1点 (軽度)、③2点 (中等度)、④3点 (重度) によりそれぞれ評点化を行った⁵⁵⁾。

なお、評点化の 2 日前にバリカンにて頸背部の除毛処置を行った。

⑧ 絶望関連行動の評価

うつ様行動の指標の一つである学習性絶望の評価のため、尾懸垂試験による不動時間の定量化がしばしば実施されている。そこで、一般的な手法に基づき、SPF 環境下及び Conventional 環境下で飼育された 6、9、12、15 週齢の NC/Tnd 雄性マウスの尾部を 30cm の高さで固定し、2 分間の馴化時間の後、4 分間における合計不動時間を算出した⁷¹⁾。なお、行動学的変化に影響を及ぼす環境要因を除くため、明所、静音無人の条件で試験は実施した。

⑨ 嗜好性関連行動の評価

うつ病患者及びうつ様症状を呈する実験動物では、嗜好性が有意に減少することが知られている。そこで、各週齢における NC/Tnd マウスの嗜好性を評価するため、給水瓶を 2 本用意し、一方に 1%スクロース溶液、他方に水道水を用意し、2 日間飼育ケージ内で自由摂取させ、1%スクロース溶液の飲水量の割合を算出した。なお、ボトル位置は試験開始 24 時間後に入れ替えた⁶⁴⁾。

⑩ 不安様行動の評価

不安様行動の調査には、新規環境下における立ち上がり時間及び行動位置の記録が利用される。そこで、60cm×60cm の四方形のアクリルケージ内におけるマウスの行動を記録した（オープンフィールド試験）⁷²。立ち上がり時間は、マウスが立ち上がった時の高さに設定された、アクリルケージ内を横断する赤外線マウスが遮断した合計時間を算出し、結果として用いた。マウスの行動位置は、アクリルケージ真上に固定されたモーションキャプチャーカメラで追尾記録され、60cm×60cm のフィールドを 25 区画（横 5 区画×縦 5 区画）に分類し、中心領域（25 区画の内、辺縁 16 区画を除く内側 9 区画）にマウスが滞在した合計時間を算出した。なお、試験は 15 分間、測定時の行動に影響を与えないよう防音室で実施された⁷²。

⑪ 統計処理

全てのデータは、統計処理ソフト SigmaPlot[®]11 を用いて、平均値±標準偏差（SEM）で表記した。各群間比較は Tukey's test を用いて検定を行った。上記の検定結果における $P < 0.05$ を統計学的に有意と判定した。

(2) 結果

⑤ SPF 及び Conventional NC/Tnd マウスの搔破行動回数の変化

SPF 環境下で飼育されたマウスの搔破行動回数は、週齢を重ねても 15 週齢時までに有意な変化は見られなかった (Figure 13a)。これは、過去に報告された結果と一致する⁶⁰。一方、Conventional 環境下で飼育された NC/Tnd マウスでは、6 週齢から 15 週齢にかけて搔破行動回数は増加し、同週齢の SPF NC/Tnd マウスと比較して統計学的有意な搔破行動回数の増加が確認された。特に 9 週齢時と比較して 12 週齢時に搔破行動回数は 4.5 倍増加し、さらに 12 週齢時と比較して 15 週齢時には 2.9 倍増加した (Figure 13a)。

⑥ SPF 及び Conventional NC/Tnd マウスの皮膚炎重症度臨床症状スコアの変化

搔破行動回数の変化と同様に SPF 環境下で飼育された NC/Tnd マウスでは、生後 6 週から 15 週の間にかけて全ての個体で皮膚炎重症度臨床症状スコアの合計点は 0 点を記録し、統計学的有意な変化は認められなかった (Figure 13b)。一方、Conventional 環境下で飼育された NC/Tnd マウスでは、皮膚炎重症度臨床症状スコアは生後 6 週から 15 週にかけて時系列的に有意に増加した。この結果も搔破行動回数の変化と同様の傾向を示している (Figure 13b)。

⑦ 絶望関連行動の変化

尾懸垂試験における合計不動時間は、6 週齢時に SPF NC/Tnd マウスと Conventional NC/Tnd マウスで明らかな差は確認されなかった (Figure 14a)。しかしながら、Conventional NC/Tnd マウスにおいて、9 週齢以降合計不動時間は延長し、同週齢の SPF NC/Tnd マウス及び 6 週齢時の Conventional

NC/Tnd マウスと比較して統計学的有意な差が現れた。その値は 12 週齢時において、うつ病モデルマウスと近い値 (138.36 ± 14.82 sec) となった。一方、SPF NC/Tnd マウスでは、6 から 15 週齢の間で有意な変化は現れなかった (85.6 ± 6.4 sec、Figure 14a)。

⑧ 嗜好性関連行動の変化

2 日間の試験期間で Conventional NC/Tnd マウスが 1%スクロース溶液を飲水した合計量の割合は、6 週齢時には SPF NC/Tnd マウスと同様の値を示し ($77.2 \pm 11.0\%$)、6 週齢時と比較して 9 週齢時 ($54.2 \pm 13.2\%$) に有意に減少したが、9 週齢以降のさらなる減少は認められなかった (Figure 14b)。9 週齢から 15 週齢時の値は、うつ病モデルマウス ($56.4 \pm 7.1\%$) と近い値か下回る値を示している。一方、SPF NC/Tnd マウスにおいて、試験を通して嗜好性に有意な変化は確認されなかった ($70.7 \pm 3.9\%$ 、Figure 14b)。

⑨ 不安様行動の変化

オープンフィールド試験による新規環境下での合計立ち上がり時間は、Conventional NC/Tnd マウスにおいて、同週齢の SPF NC/Tnd マウス (104.6 ± 23.7 秒) 及び 6 週齢時の結果 (114.6 ± 13.2 sec) と比較して、9 週齢 (69.3 ± 11.9 秒) 以降有意に減少した (Figure 14c)。また、これらの値はうつ病モデルマウス (62.4 ± 7.4 sec) と近い値となっている (Figure 14)。一方、SPF NC/Tnd マウスでは、週齢に関わらず合計立ち上がり時間に有意な変化は見られなかった (104.4 ± 6.7 sec)。次にフィールド上の中心領域にマウスが滞在した合計時間は、合計立ち上がり時間と同様に同週齢の SPF NC/Tnd マウス (205.5 ± 50.0 秒) 及び 6 週齢時の結果 (193.2 ± 27.9 sec) と比較して、9 週齢 (78.5 ± 9.8 sec)

以降有意に減少した。これらの値は、うつ病モデルマウスの結果と比較しても有意に低い値を示している (146.7 ± 7.3 sec) (Figure 14)。また、SPF NC/Tnd マウスでは、週齢に関わらず中心領域に滞在した合計時間に有意な変化は見られなかった (197.4 ± 9.6 sec, Figure 14d)。

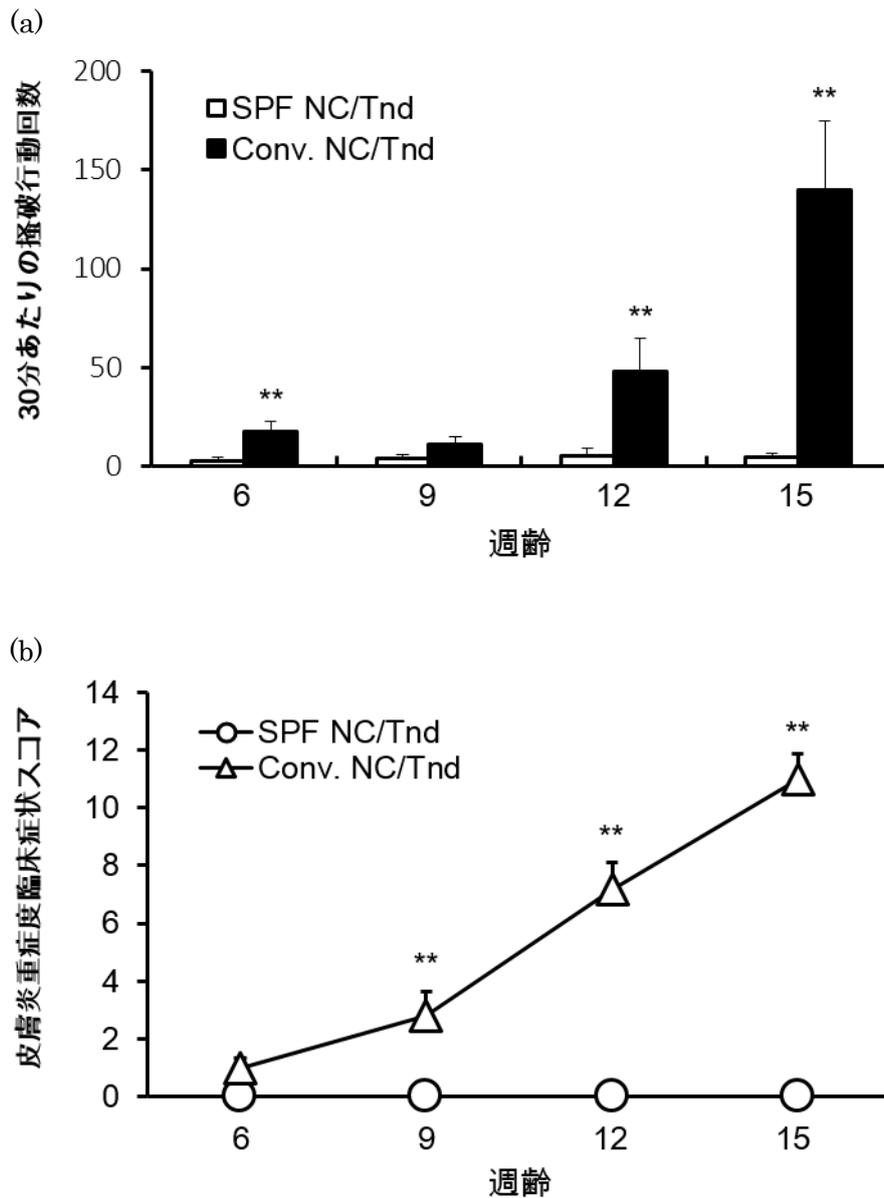


Figure 13 加齢に伴う NC/Tnd マウスにおけるアトピー性皮膚炎の臨床症状の変化

6 から 15 週齢までの Conventional (Conv.) 及び SPF 環境下で飼育された NC/Tnd マウスの(a) 30 分あたりの搔破行動回数と (b) 皮膚炎重症度臨床症状スコア。全てのデータは、平均値 ± 標準誤差で表している。統計学的検定は、Tukey's test で行った。** $P < 0.01$ は、各週齢時における SPF NC/Tnd マウス群と比較した時の統計学的有意差を表している。

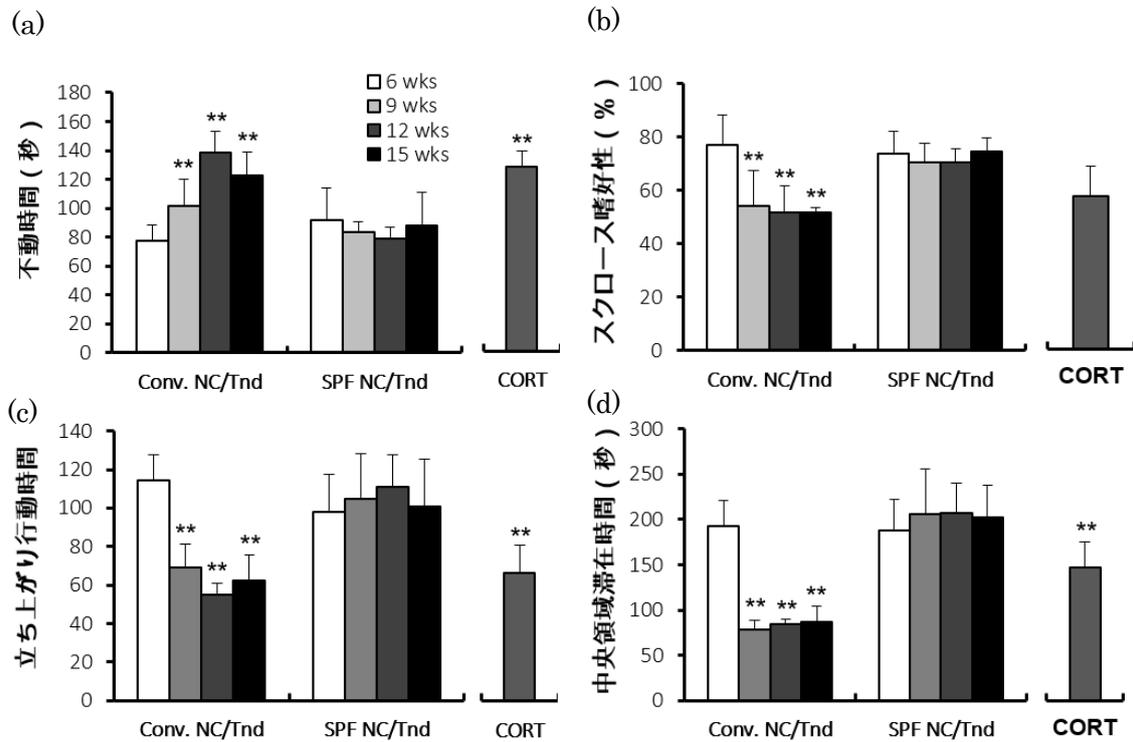


Figure 14 NC/Tnd マウスにおけるうつ様行動変化

(a) 尾懸垂試験による 4 分間当たりの不動時間 (b) 2 種給水ボトル選択法によるスクロース嗜好性評価。 (c) オープンフィールド試験による 15 分あたりの合計立ち上がり時間。 (d) オープンフィールド試験による 15 分あたりの中央領域滞在時間。 CORT は 7 週齢時より 5 週間、5 mg/kg/day の濃度でコルチコステロンを給水させた 12 週齢時のコルチコステロン誘導性うつ病モデル動物の結果である。全てのデータは、平均値 ± 標準誤差で表している。統計学的検定は、Tukey's test で行った。** $P < 0.01$ は、各週齢時における SPF NC/Tnd マウス群と比較した時の統計学的有意差を表している。

(3) 考察

SPF 環境下で飼育した NC/Tnd マウスの搔破行動回数は、6 週齢から 15 週齢にかけて、0 から 20 回と非常に低い値で推移し、統計学的有意な変化は確認できなかった。また、皮膚炎重症度臨床症状スコアは全ての個体で 0 点（無症状）を示した。一方、Conventional 環境下で飼育した NC/Tnd マウスにおいて、搔破行動回数及び皮膚炎重症度臨床症状スコアは週齢依存的に有意に上昇した。このことから皮膚炎重症度と搔破行動回数には強い因果関係があり、皮膚炎重症度が上昇するにつれて搔破行動回数は増加すると考えられる。事実、アトピー性皮膚炎の患者において、その症状の重症度が高くなるにつれて搔破行動回数は増加する傾向にあるとの報告がある⁴⁷。

また、6 週齢から 9 週齢の間にかけて皮膚炎重症度臨床症状スコアが、無症状から軽度に移行したことから、この期間が本モデルマウスにおけるアトピー性皮膚炎の発症時期であると考えられる。

本項では、尾懸垂試験による絶望評価、スクロース嗜好性試験による嗜好性評価、オープンフィールド試験による新規環境下での不安様行動評価を行った。これらの結果から、Conventional 環境下で飼育された NC/Tnd マウスでは、6 週齢から 9 週齢の間でうつ様行動が現れることが示唆され、この結果はアトピー性皮膚炎の発症時期と同じであるが、9 週齢以降うつ様行動パラメーターに有意な変化はなかったことから、必ずしも皮膚炎の重症度がうつ様行動の重症度と相関している訳ではないと考えられる。しかしながら、SPF 環境下で飼育された皮膚炎を伴わない NC/Tnd マウスでは、うつ様行動パラメーターに変化がなかったことから、アトピー性皮膚炎の発症によってうつ様行動が現れることは確認され、さらに不安様行動がうつ病モデルマウスよりも重度に現れたことから、本モデルマウスにおいて、皮膚炎によって惹起された慢性的な

炎症反応と精神ストレスによる脳内炎症は、特に不安様行動に対して強く反映すると考えられる。これらの結果は、近年のアトピー性皮膚炎患者を対象とした疫学的調査に基づくエビデンスと一致した結果となっている⁴⁸。

【3】うつ様病態の発症機構の解析

(1) 材料と方法

① 使用動物

体重 16 g–27 g の SPF 環境下及び Conventional 環境下で飼育された NC/Tnd 雄性マウス 6–15 週齢を用いた。恒温 ($22 \pm 4^\circ\text{C}$)、恒湿 ($40 \pm 15\%$)、人工照明 (7:00–19:00) の一定環境下で飼育し、離乳後は固形飼料 (CRF-1) 及び水道水を自由に摂取させた。1 週間の馴化期間の後実験に供した。なお、本研究は東京農工大学動物実験委員会の承認の下で行った。(承認番号: 27–34)

一般的なうつ病モデルマウスの作製のため、7 週齢、22 から 34 グラムの C57/BL6 雄性マウスに 5 mg/kg/day の濃度のコルチコステロン加生理食塩水を 5 週間自由飲水させた。なお、濃度算出のため、1 週間毎日、マウスの飲水量を記録し、その平均値を 1 日の給水量として用いた⁵¹。

② NC/Tnd マウスの海馬歯状回における神経新生の評価

2 項で述べた全ての行動学的試験終了後、マウスの脳組織は摘出され、免疫組織化学的解析に用いられた。固定標本の作製及び免疫組織化学は、5 分以内に深麻酔下で 0.1M リン酸緩衝液を 10 ml 灌流し、4%パラホルムアルデヒドを含む 0.1M リン酸緩衝液 (PBS, pH 7.4, 4°C) にて灌流固定し、大脳を摘出した。摘出した大脳は同じ固定液に 4°C 条件下で 6 時間浸漬した。その後 10%スクロースを含む PBS に 24 時間、20%同溶液で 24 時間及び 30%同溶液 48 時間浸漬置換し、包埋後、クライオスタットを用いて凍結脳切片を作成し、24 時間乾燥させた。15 μm で薄切された切片は、抗原賦活後、抗マウス Double cortin X (DCX) 抗体 (海馬における未成熟神経細胞のマーカー)、抗マウス Brain lipid binding

protein (BLBP) 抗体 (海馬における神経前駆細胞のマーカー) で標識され、封入後、海馬歯状回における陽性細胞数をカウントした。

③ 皮膚炎惹起によるうつ様行動の発症の評価

次に、皮膚炎によってうつ様行動が発症していることを証明するため、SPF 環境下で飼育された NC/Tnd マウス (6 週齢、雄) を用いて、アレルギー性接触性皮膚炎モデルマウスを作製し、うつ様行動の評価を行った。モデル作成方法は左記である。アレルギー性接触性皮膚炎の感作は 5% Picryl chloride 加エタノールアセトン混合 (4:1) 溶液を除毛した腹部及び足裏に 100 μ l 塗布することで行った⁷²。反復チャレンジは、1 週間に 1 回、耳介及び頸背部皮膚に 1% Picryl chloride 加オリーブオイルを 100 μ l 塗布することで行った⁷²。実施した試験項目は 2 項と同様に、①皮膚炎重症度臨床症状スコア、②搔破行動回数、③絶望評価、④嗜好性、⑤不安様行動の評価である。具体的な手法は 2 項に示した。

④ NC/Tnd マウスに対する SC144 投与によるうつ様行動変化と海馬歯状回における神経新生の評価

NC/Tnd マウスの血清中 Interleukin-6 (IL-6) の濃度が高値を示したことから、Glycoprotein 130 のインヒビターである SC144 を 10 mg/kg の濃度で 1 日 1 回、8 週間、腹腔内投与した⁷³。8 週間経過後、皮膚炎臨床症状スコアの評価、擦過行動回数の定量化、尾懸垂試験、オープンフィールド試験を実施した後、脳組織を採材し、②と同様の免疫組織化学的手法により神経新生の評価を行った。なお対照群として Vehicle 投与群を用いた。

⑤ NC/Tnd マウスに対する抗マウス IL-6 中和抗体投与によるうつ様行動変化

と海馬歯状回における神経新生の評価

次に、IL-6 阻害剤のうつ様病態に対する影響を調査するため、抗マウス IL-6 中和抗体を 10 mg/kg の濃度で 4 週間に 1 回、計 2 回尾静脈内投与し、8 週間経過後、皮膚炎臨床症状スコアの評価、擦過行動回数の定量化、尾懸垂試験、オープンフィールド試験を実施した後、脳組織を採材し、②と同様の免疫組織化学的手法により神経新生の評価を行った⁷¹。なお対照群として Vehicle 投与群を用いた。

⑥ 統計処理

全てのデータは、統計処理ソフト SigmaPlot[®]11 を用いて、平均値±標準偏差 (SEM) で表記し、各群間比較は Tukey's test を用いて検定を行った。上記の検定結果における $P < 0.05$ を統計学的に有意と判定した。

(2) 結果

① Conventional NC/Tnd マウスの海馬歯状回における神経新生の低下

SPF 環境下で飼育されたマウス海馬歯状回における抗 DCX 抗体陽性細胞数は、週齢が変化しても 15 週齢時 (31.0 ± 6.7) までに有意な変化は見られなかった (Figure 15a)。一方、Conventional NC/Tnd マウスにおいて、6 週齢時に SPF NC/Tnd マウスと同等の数であった DCX 陽性細胞数は、9 週齢時 (11.0 ± 2.0) に明らかな減少傾向を示し、12 週齢 (3.0 ± 1.4) 以降にさらに減少した。次に抗 BLBP 抗体陽性細胞数を解析したところ、SPF NC/Tnd 及び Conventional NC/Tnd マウスの間で有意な差は見られず、加齢による変化も確認できなかった (Figure 15b)。

② アレルギー性接触性皮膚炎惹起によるうつ様行動の発症

Picryl chloride 塗布によって誘発されたアレルギー性接触性皮膚炎では、皮膚炎重症度臨床症状スコアは、Vehicle 塗布群と比較して感作後 4 日目の評価 (3 ± 0.5 点) から有意に上昇し、時間経過とともに皮膚炎はさらに増悪化した (Figure 16a)。一方、Vehicle を塗布した群でも 4 日目 (1.9 ± 0.3 点) 以降の評価で軽度な炎症反応が確認された。擦過行動回数は、塗布期間終了時に定量化されたが、Vehicle 塗布群 (11.0 ± 6.4 回) と比較して Picryl Chloride 塗布群において有意な上昇が確認された (47.4 ± 10.1 回、Figure 16b)。

うつ様行動パラメーターの指標である尾懸垂試験による合計不動時間は、Vehicle 塗布群と比較して Picryl chloride 塗布群において有意に延長した (98.2 ± 10.4 秒、Figure 16c)。しかしながら、2 項で記載した同週齢時の Conventional 環境下で飼育された NC/Tnd マウスと比較すると、時間延長は軽度であった。また、海馬歯状回における抗 DCX 抗体陽性細胞数を解析したところ、Picryl

chloride を塗布した群において、Vehicle 塗布群と比較して有意な減少を認めた (Figure 16d)。

③ Conventional NC/Tnd マウスにおける IL-6 阻害剤によるうつ様病態の改善

IL-6 とその受容体の複合体が結合する Glycoprotein 130 を特異的阻害剤 SC144 によって阻害したところ、皮膚炎重症度臨床症状スコアは、投与開始前と比較して投与開始後 1 週目以降に有意に増加した (Figure 17a)。また、投与開始 1 週目における皮膚炎重症度臨床症状スコアの上昇傾向は、基剤投与群 (9.0 ± 0.6 点) と比較して SC144 投与群 (6.3 ± 0.3 点) で軽微であったが、塗布開始 2 週目以降に統計学的有意差は見られなくなった (Figure 17a)。擦過行動回数も皮膚炎重症度臨床症状スコアの結果と同様に SC144 投与群において、投与開始前 (13.3 ± 5.2 回) と比較して投与開始後 1 週目 (46.7 ± 9.4 回) 以降に有意に増加したが、基剤投与群 (103.0 ± 42.2 回) と比較するとその増加傾向は軽微であった (Figure 17b)。投与開始 2 週目以降 SC144 投与群と基剤投与群の間で統計学的有意差は見られなくなった。尾懸垂試験による合計不動時間は、基剤投与群と比較して 35.2%減少した (Figure 17b)。一方、うつ様行動の指標である尾懸垂試験による不動時間は、SC144 投与群において基剤投与群と比較して有意な改善が認められた (Vehicle 投与群 : 112.0 ± 24.5 秒、SC144 投与群 : 81.2 ± 13.4 秒、Figure 17c)。さらに、海馬歯状回における抗 DCX 抗体陽性細胞数は、基剤投与群と比較して有意に増加した (基剤投与群 : 4.8 ± 2.6 、SC144 投与群 : 18.3 ± 2.1 、Figure 17d)。

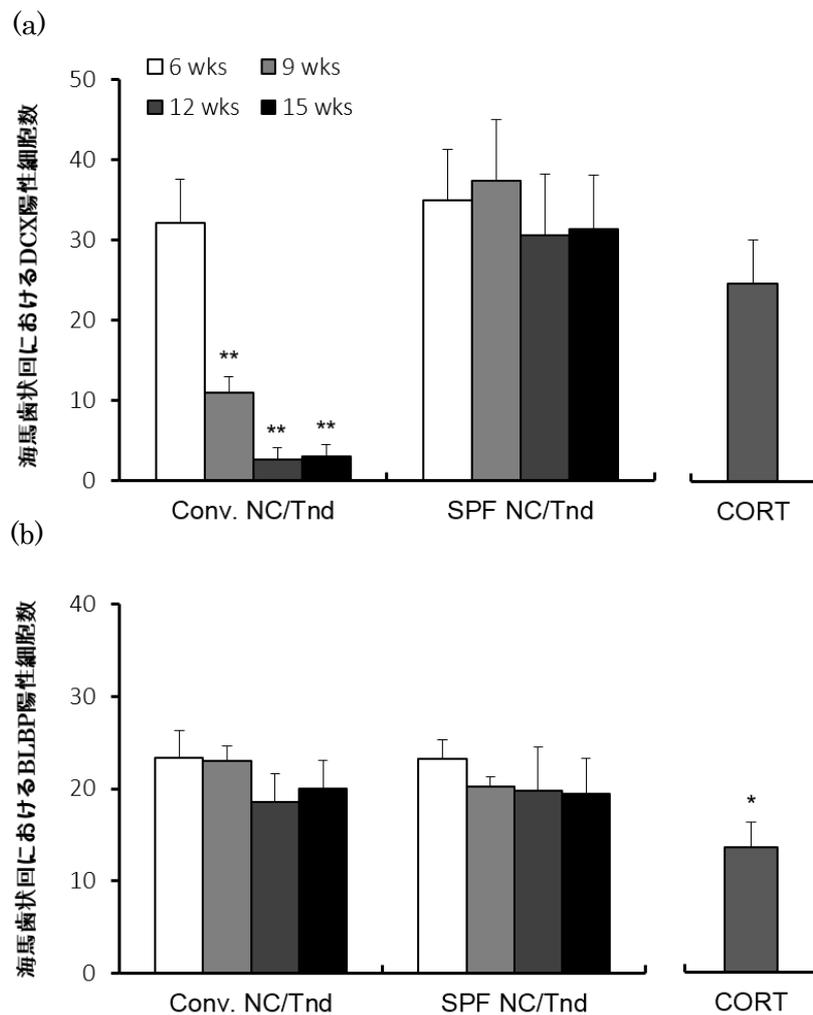


Figure 15 NC/Tnd マウスにおける海馬依存性神経新生

(a) NC/Tnd マウスの海馬歯状回における Double cortin X (DCX)陽性細胞数と
 (b) NC/Tnd マウスの海馬歯状回における Brain lipid binding protein (BLBP)
 陽性細胞数。CORT は 7 週齢時より 5 週間、5 mg/kg/day の濃度でコルチコス
 テロンを給水させた 12 週齢時のコルチコステロン誘導性うつ病モデル動物の
 結果である。全てのデータは、平均値 ± 標準誤差で表している。統計学的検
 定は、Tukey's test で行った。* $P < 0.05$ 、** $P < 0.01$ は、各週齢時における
 SPF NC/Tnd マウス群と比較した時の統計学的有意差を表している。

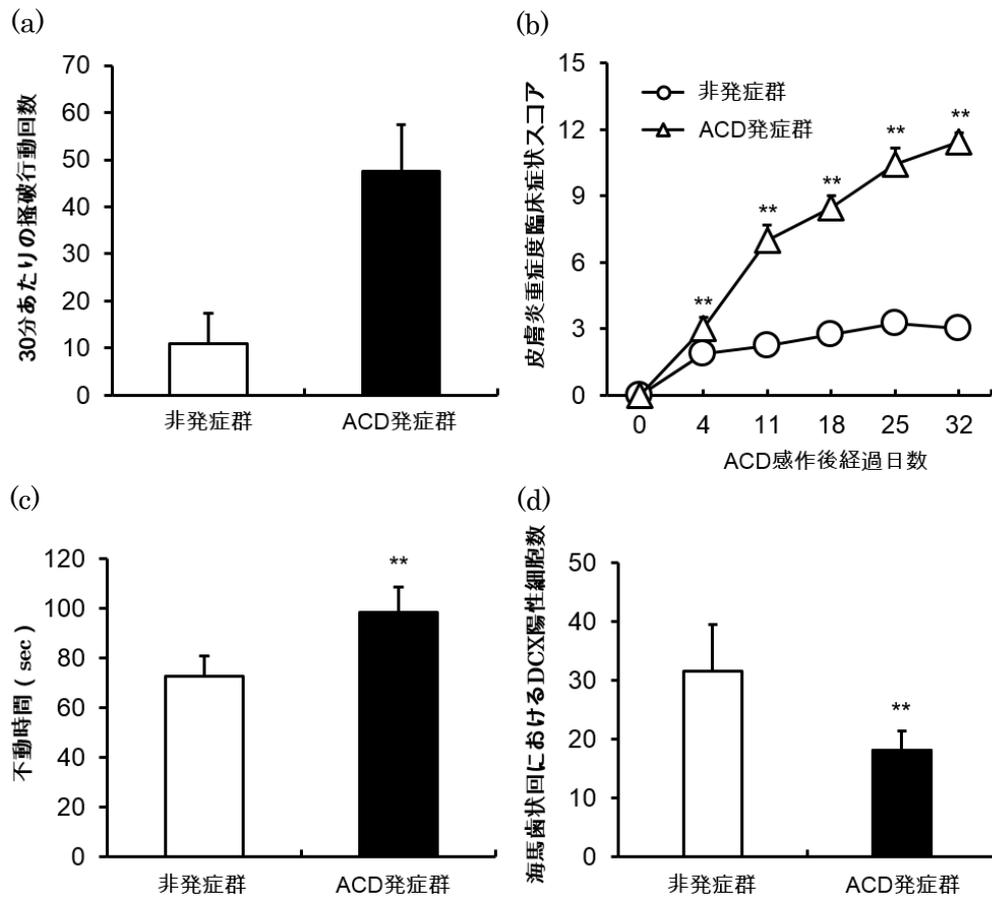


Figure 16 SPF NC/Tnd マウスに対するアレルギー性接触性皮膚炎 (ACD) 誘発後の皮膚炎症状とうつ様症状の変化

ACD 誘発後の(a) 30 分間当たりの搔破行動回数と (b) 皮膚炎重症度臨床症状スコア、(c) 尾懸垂試験による 4 分間当たりの不動時間、(d) 海馬歯状回における DCX 陽性細胞数。全てのデータは、平均値 ± 標準誤差で表している。統計学的検定は、Tukey's test で行った。** $P < 0.01$ は、非発症群と比較した時の統計学的有意差を表している。

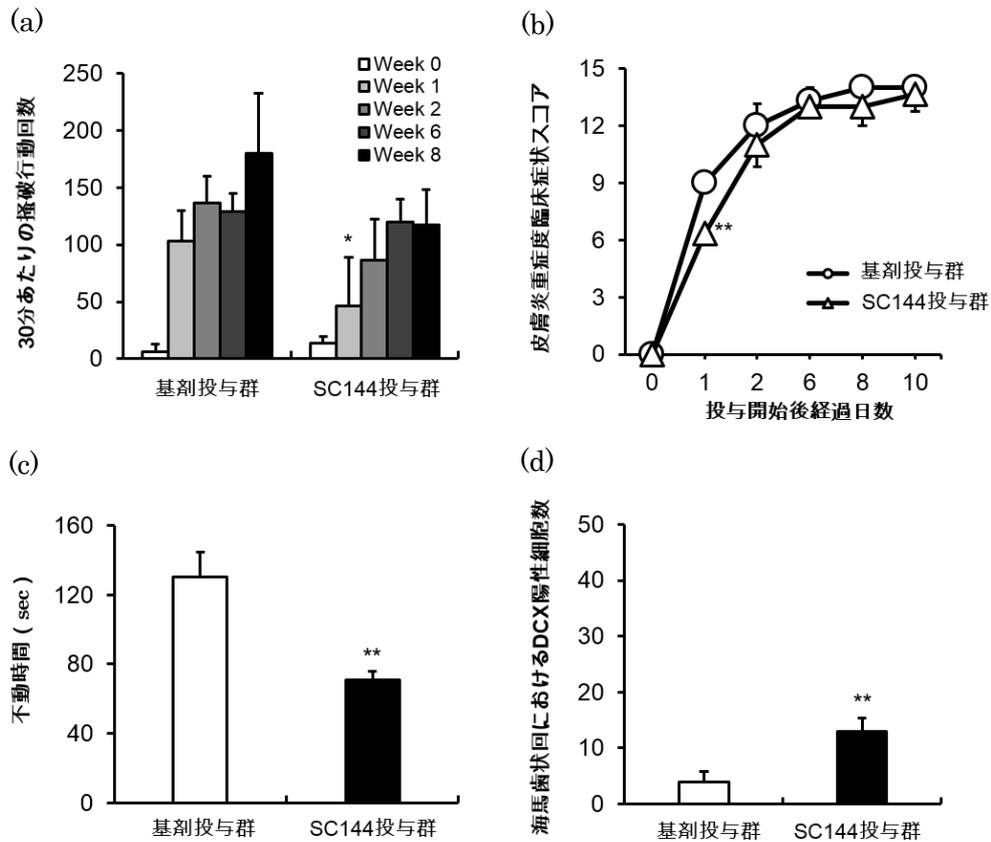


Figure 17 Conventional NC/Tnd マウスに対する SC144 尾静脈投与によるアトピー性皮膚炎臨床症状とうつ様症状の変化

Glycoprotein 130 特異的阻害剤 SC144 投与後の (a) 30 分間当たりの搔破行動回数と (b) 皮膚炎重症度臨床症状スコア、(c) 尾懸垂試験による 4 分間当たりの不動時間、(d) 海馬歯状回における DCX 陽性細胞数。全てのデータは、平均値 ± 標準誤差で表している。統計学的検定は、Tukey's test で行った。 $*P < 0.05$ 、 $**P < 0.01$ は、各測定日における基剤投与群と比較した時の統計学的有意差を表している。

(3) 考察

重度ないし中等度の皮膚炎を有する NC/Tnd マウスの海馬歯状回における未成熟ニューロン陽性細胞数は、皮膚炎発症後（9 週齢以降）及び SPF NC/Tnd マウスの結果と比較して明らかに減少した。海馬歯状回における神経新生とうつ様行動には強い因果関係があることから、本モデルマウスは病理組織化学的所見からも皮膚炎に伴う重度のうつ様病態を発症していると考えられる。また、うつ病モデルマウスと比較しても極端な抗 DCX 抗体陽性細胞数の減少傾向から、うつ様症状以外の認知や記憶に関連する精神異常を呈している可能性も考えられる。そして、抗 BLBP 抗体陽性細胞数は、SPF NC/Tnd マウスと比較しても有意な変化は見られなかったことから、本モデルマウスのうつ様病態の進展には、神経前駆細胞から未成熟ニューロンへの分化段階に異常があることが考えられた。

次に、本モデルマウスを用いて皮膚炎誘導によりうつ様病態が発症するか解析したところ、うつ様病態の指標となる尾懸垂試験による合計不動時間及び抗 DCX 抗体陽性細胞数は、皮膚炎誘導群と皮膚炎非誘導群の間で統計学的有意な変化は見られたものの、その程度は軽微であった。このことから、慢性的に進行するアトピー性皮膚炎によって生じるうつ様病態は接触性過敏症によって誘発されるアレルギー反応も寄与しているが、その影響は限局的であると考えられた。

アトピー性皮膚炎に伴ううつ様病態の進展が、末梢組織における炎症反応によって誘発されているか解析するため、Conventional NC/Tnd マウスの末梢血中から IL-6 のカップリングレセプターである Glycoprotein 130 阻害剤を投与したところ、Conventional NC/Tnd マウスの海馬歯状回における未成熟ニューロン数が増加した。近年の報告では、末梢炎症に起因するうつ様病態の発症機

構は、炎症によって骨髄より過剰産生された単球が脳血液関門を通過後、マクロファージに分化し、IL-1 β 、IL-6、TNFなどの種々のサイトカインを産生することで海馬歯状回における神経新生を抑制していることが示唆されている⁷⁴。しかしながら、本研究では、Glycoprotein 130の阻害剤を末梢から投与（尾静脈投与）することによってうつ様病態が改善したことから、単球依存性のうつ様病態の進展ではなく、アトピー性皮膚炎によって過剰産生されたIL-6が血中を介し、海馬歯状回における神経新生の抑制を誘導していると考えられる。さらに、アトピー性皮膚炎患者では、IL-6受容体の一塩基置換が報告されており⁷⁵、可溶性IL-6受容体の遊離を容易にすると報告されている⁷⁶。そのため、アトピー性皮膚炎の場合、血中IL-6濃度の増加に加え、可溶性受容体の濃度が増加し、うつ様病態の進展に寄与していると考えられる。これらのことから、本モデルマウスにおけるうつ様病態の進展は、アトピー性皮膚炎によって過剰産生されたIL-6が血中を介し、海馬歯状回における神経前駆細胞のニューロンへの分化を抑制することで惹起されるものであると考えられる。

【4】小括

痒みとそれに伴う搔破行動は、皮膚バリアの破壊を誘発しアレルギーの侵入を容易にする。アトピー素因を有した患者では、その時に肥満細胞や好酸球などの免疫担当細胞の過剰応答を誘発するため、大量のサイトカインを含むケミカルメディエーターが放出される。これらのケミカルメディエーターは主にアトピー性皮膚炎の慢性化に寄与するものと考えられてきた。しかしながら、そのサイドエフェクトとして末梢組織における炎症反応がうつ様病態の進展にも寄与することを証明するため、本章ではアトピー性皮膚炎モデルマウスにおける脳神経科学的アプローチを行った。その結果、アトピー性皮膚炎モデルマウスでは、うつ様行動を示し、海馬の未成熟ニューロン陽性細胞数が明確に減少した。一方、皮膚炎を有さない同モデルマウスではうつ様行動の変化は見られず、海馬歯状回における未成熟ニューロン数も変化しなかった。また、アレルギー性接触性皮膚炎を誘発したところ、皮膚炎は重度に進行したにもかかわらず、うつ様病態変化は軽微であった。そして、SC144 投与実験の結果から、血中の IL-6 濃度が上昇し、IL-6 の阻害剤によってうつ様病態は改善した。以上のことから、右記のことが推察される。①アトピー性皮膚炎において、皮膚炎の発症に伴い、極めて重度の不安様行動を有するうつ様病態が発症すること。②接触性皮膚炎によって惹起されるうつ様症状は、アトピー性皮膚炎を自然発症した NC/Tnd マウスのそれより軽微であり、アトピー性皮膚炎特有の素因がうつ様症状の惹起に関わっていること。③IL-6 阻害剤の結果から、アトピー性皮膚炎によって惹起されるうつ様症状は、末梢組織で過剰に産生された IL-6 が血中を介し、海馬歯状回における神経新生を抑制的に調節していること。以上のことから、本章ではアトピー性皮膚炎によるうつ様病態の発症機構の主要なメカニズムを明らかにし

た。しかしながら、末梢組織における炎症反応以外にも、精神ストレスによって産生されるグルココルチコイドや脳内炎症によって、マイクログリアやアストロサイト、ニューロン自身から産生される炎症性メディエーター、血液脳関門を通過した単球がマクロファージに分化してうつ様病態の進展に与える影響も忘れてはならない。

総括

第一章において検討を行った坐骨神経の部分的結紮によって惹起した神経障害性疼痛では、中等度の機械的および温熱的痛覚過敏を伴うことが知られている²⁸。また、神経結紮による線維化や坐骨神経線維変性とリモデリングなどの組織学的変化も生じる²⁸。本研究では、von Frey 試験及び Hot plate 試験によって中等度から重度の機械的及び温熱的痛覚過敏が確認された。これらの症状は試験終了時のモデル作製 35 日目まで持続し、今回検討を行った GAIT システムによる歩様異常のパラメーターの一つである STR と高い相関性を示した。さらに投薬試験の結果、プレガバリンの単回投与によって von Frey 試験と同様に一時的な STR の改善が確認でき、反復投与は、STR を通常の数値まで引き上げた。これらの結果から GAIT システムを用いた STR 解析による動的体重負荷の評価は、坐骨神経部分的結紮による神経障害性疼痛モデルラットに対して有用であり、慢性疼痛における新規治療薬の探索に用いることが可能であると考えられる。

アトピー性皮膚炎では、病態の進展に伴い慢性で持続的な掻痒症と搔破行動の増加を呈することが知られている²⁰。そこで第 2 章では、アトピー性皮膚炎自然発症モデル NC/Tnd マウスにおける搔破行動を SCLABA[®]-Real システムによるフレーム間差分析⁴⁶という新たな方法で抽出が可能か検討した。さらにアトピー性皮膚炎を中等度に発症した NC/Tnd マウスに対して 0.1% タクロリムス軟膏を塗布することで皮膚炎の抑制と搔破行動回数及び持続時間の変化を解析した。SCLABA[®]-Real システムによる搔破行動回数の変化は、皮膚炎の臨床症状重症度スコアと同様に 7 週齢以降に有意に増加し、15 週齢まで増加傾向を示した。同週齢の無症状の NC/Tnd マウス（SPF 環境下で飼育したマウ

ス) では、皮膚炎臨床症状重症度スコア及び搔破行動は、試験を通じて類似の値を示した。さらに 12 週齢の皮膚炎を中等度に発症した NC/Tnd マウスに対して 0.1%タクロリムス軟膏を 1 日 1 回計 14 日間、100 mg を症状部位である頸背部皮膚に塗布したところ塗布後 1 週目の測定時より有意な搔破行動回数及び持続時間の低下が認められ、皮膚炎の臨床症状重症度スコアも同様の傾向を示した。これらの結果から、SCLABA[®]-Real システムを用いた本成果は、アトピー性皮膚炎という難治性疾患の病態の調査や医薬品開発において非常に重要な評価項目である痒みの自動定量化を可能にし、客観的な病態の解析に大きく寄与することができると示唆された。

第 2 章の検討を踏まえ、第 3 章ではアトピー性皮膚炎によって惹起されるうつ様症状の検討を行った。過去に NC/Tnd マウスを用い、中枢神経系障害の検討を行った報告事例は確認できなかったことから、本章では試験系の確立とテストバッテリーの検討に重点を置き、さらに標的分子の解析とそのルーツの検討を行った。第 2 章で得た結果と類似するように 9 週齢から 15 週齢にかけて、Conventional 環境下で飼育した NC/Tnd マウスにおいて、皮膚炎臨床症状重症度と搔破行動回数の増加が認められた。さらに各週齢において搔破行動回数の解析後、スクロース嗜好性試験、オープンフィールド試験、尾懸垂試験の順に行動学的試験を行い、海馬歯状回を採材後、未成熟ニューロンマーカーである DCX 陽性細胞の数をカウントした。これら試験の解析の結果、SPF 環境下で飼育したアトピー性皮膚炎を有さない同系統のマウスでは、各週齢において有意な変化は認められなかったにもかかわらず、アトピー性皮膚炎を発症するマウスでは、皮膚炎発症時期である 9 週齢以降に嗜好性の低下、活動量の低下、不安様症状と学習性絶望の増加、海馬歯状回における神経新生の分化抑制が認められ、重度のうつ様症状を呈することが示唆された。特にコルチコス

テロン誘導性うつ病モデルマウス⁴⁷と比較しても不安様症状と神経新生の抑制は著しく、これらの結果からアトピー性皮膚炎モデルマウスでは、うつ様症状を悪化させるエフェクター分子が存在すると考えられた。さらに Conventional NC/Tnd マウスにおけるうつ様症状が、アトピー性皮膚炎の発症初期にはすでに示されていたことから、アトピー性皮膚炎の主徴である過敏な免疫応答の初期に産生される炎症性サイトカインがうつ様症状を増悪化させる因子であると考へ、炎症性サイトカインの1種である IL-6 シグナル阻害剤 (gp130 阻害剤) 及び中和抗体を末梢血から投与すると、うつ様行動及び神経新生抑制の改善が見られた。このことから、本モデルマウスにおけるうつ様症状は、アトピー性皮膚炎急性期に末梢組織で産生された IL-6 が血中を介し、海馬歯状回における神経新生を抑制し、うつ様症状の行動学的変化を惹起したことが示唆された。

以上のように本研究では、末梢及び中枢神経系障害疾患の特異的な行動異常に基づいた病態の解析に成功した。しかしながら、多くのエビデンスがあっても動物モデルにおける行動学的異常がターゲットとする疾患の病態を確実に反映しているという根拠はなく、1つの指標として用いられるべきで多角的かつ包括的な解析によって病態の調査が重要であることは忘れてはならない。

引用文献

1. Irwin, S. 1968. Comprehensive observational assessment: A systematic, quantitative procedure for assessing the behavioral and physiologic state of the mouse. *Psychopharmacologia*. 13:222–257.
2. Crawley, J. N., and R. Paylor. 1997. A proposed test battery and constellations of specific behavioral paradigms to investigate the behavioral phenotypes of transgenic and knockout mice. *Hormones and Behavior*. 31:197–211.
3. Attal, N., G. Cruccu, R. Baron, M. Haanpää, P. Hansson, T. S. Jensen, and T. Nurmikko. 2010. EFNS guidelines on the pharmacological treatment of neuropathic pain: 2010 revision. *European Journal of Neurology*. 17(9):1113–e88.
4. Belmaker, R. H., and G. Agam. 2008. Major depressive disorder. *New England Journal of Medicine*. 358:55–68.
5. Dworkin, R. H., J.W. Gnann, Jr., A. L. Oaklander, S. Raja, K.E. Schmader, and R. J. Whitley. 2008. Diagnosis and assessment of pain associated with herpes zoster and postherpetic neuralgia. *The Journal of Pain*. 9:Supplement 1, S37–S44.
6. Ziegler, D. 2008. Painful diabetic neuropathy: treatment and future aspects. *Diabetes/Metabolism Research and Reviews*. 24: Supplement 1, S52–S57.
7. Finnerup, N. B., S. H. Sindrup, and T. S. Jensen. 2010. The evidence for pharmacological treatment of neuropathic pain. *Pain*. 150:573–581.

8. Doth, A. H., P. T. Hansson, M. P. Jensen, and R. S. Taylor. 2010. The burden of neuropathic pain: A systematic review and meta-analysis of health utilities. *Pain*. **149**:338–344.
9. Heutink, M., M. W. M. Post, H. M. H. Bongers-Janssen, C. A. Dijkstra, G. J. Snoek, D. C. M. Spijkerman, and E. Lindeman. 2012. The CONECSI trial: Results of a randomized controlled trial of a multidisciplinary cognitive behavioral program for coping with chronic neuropathic pain after spinal cord injury. *Pain*. **153**:120–128.
10. Baron, R., A. Binder, and G. Wasner. 2010. Neuropathic pain: diagnosis, pathophysiological mechanisms, and treatment. *Lancet Neurology*, **9**:807–819.
11. Dworkin, R. H., A. B. Connor, M. Backonja, J. T. Farrar, N. B. Finnerup, T. S. Jensen, E. A. Kalso, C. Miaskowski, T. J. Nurmikko, R. K. Portenoy, A. S. C. Rice, B. R. Stacey, R. Treede, D. C. Turk, and M. S. Wallace. 2007. Pharmacologic management of neuropathic pain: Evidence-based recommendations. *Pain*. **132**:237–251.
12. Miyazaki, M., and T. Yamamoto. 2012. The Efficacy of Morphine, Pregabalin, Gabapentin, and Duloxetine on Mechanical Allodynia Is Different from That on Neuroma Pain in the Rat Neuropathic Pain Model. *Anesthesia & Analgesia*. **115**:182–188.
13. van Hecke, O., S. K. Austin, R. A. Khan, B. H. Smith, and N. Torrance. 2014. Neuropathic pain in the general population: A systematic review of epidemiological studies. *Pain*. **155**:654–662.
14. von Frey, M. 1896. Beiträge zur Sinnesphysiologie der Haut. Dritte

- Mittheilung. Berichte über die Verhandlungen der Königlich Sächsischen Gesellschaft der Wissenschaften zu Leipzig. *Mathematics Physics Klasse*. 47:166–184.
15. Woolfe, G., and A. D. MacDonald. 1944. The evaluation of the analgesic action of pethidine hydrochloride (DEMEROL). *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 80:300–307.
 16. Dubuisson, D., and S. G. Dennis. 1977. The formalin test: a quantitative study of the analgesic effects of morphine, meperidine, and brain stem stimulation in rats and cats. *Pain*. 4:161–174.
 17. Lambert, G. A., G. Mallos, and A. S. Zagami. 2009. von Frey's hairs – a review of their technology and use – a novel automated von Frey for improved testing for hyperalgesia. *Journal of Neuroscience Methods*. 177:420–426.
 18. Weidinger, S., and N. Novak. 2016. Atopic dermatitis. *The Lancet*. 387:1109–1122.
 19. Rothman, S. 1941. Physiology of itching. *Physiological Review*. 21:357–381.
 20. Shimada, S. G., and R. H. LaMotte. 2008. Behavioral differentiation between itch and pain in mouse. *Pain*. 139:681–687.
 21. Tanaka, A., and H. Matsuda. 2010. Evaluation of itch by using NC/NgaTnd mice: a model of human atopic dermatitis. *Journal of BioMedicine and Biotechnology*. 2011:1–5.
 22. Paus, R. M. Schmelz, T. Biró, and M. Steinhoff. 2006. Frontiers in pruritus research: scratching the brain for more effective itch therapy.

- Journal of Clinical Investigation*. **116**:1174–1186.
23. Yashmaie, P., C. W. Koudelka, and E. L. Simpson. 2013. Mental health comorbidity in patients with atopic dermatitis. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. **131**:428–433.
24. Kleiman, E. M., R. T. Liu, and J. H. Riskind. 2014. Integrating the Interpersonal Psychological Theory of Suicide Into the Depression/Suicidal Ideation Relationship: A Short-Term Prospective Study. *Behavior Therapy*. **45**:212–221.
25. Kohn, R., S. Saxena, I. Levav, and B. Saraceno. 2004. The treatment gap in mental health care. *Bulletin of the World Health Organization*. **82**:811–890.
26. Berrocoso, E., K. Ikeda, I. Sora, G. R. Uhl, P. Sánchez-Blázquez, and J. A. Mico. 2013. Active behaviours produced by antidepressants and opioids in the mouse tail suspension test. *International Journal of Neuropsychopharmacology*. **16**:151–162.
27. Mineur, Y. S., C. Belzung, and W. E. Crusio. 2006. Effects of unpredictable chronic mild stress on anxiety and depression-like behavior in mice. *Behavioural Brain Research*. **175**:43–50.
28. Snyder, J. S., A. Soumier, M. Brewer, J. Pickel, and H. A. Cameron. 2011. Adult hippocampal neurogenesis buffers stress responses and depressive behaviour. *Nature*. **476**:458–461.
29. Loeser, J. D., and R. D. Treede. 2008. The Kyoto protocol of IASP basic pain terminology. *Pain*. **137**:473–477.
30. Kumar, N., A. Laferriere, J. S. C. Yu, A. Leavitt, and T. J. Coderre. 2010.

- Evidence that pregabalin reduces neuropathic pain by inhibiting the spinal release of glutamate. *Journal of Neurochemistry*. **113**:552–561.
31. Lee, B. H., Y. W. Yoon, K. Chung, and J. M. Chung. 1998. Comparison of sympathetic sprouting in sensory ganglia in three animal models of neuropathic pain. *Experimental Brain Research*. **120**:432–438.
 32. Seltzer, Z., R. Dubner, and Y. Shir. A novel behavioral model of neuropathic pain disorders produced in rats by partial sciatic nerve injury. *Pain*. **43**:205–218.
 33. Wang, L. X., and Z. J. Wang. 2003. Animal and cellular models of chronic pain. *Advanced Drug Delivery Reviews*. **55**:949–965.
 34. Shy, M. E., E. M. Frohman, Y. T. So, J. C. Arezzo, D. R. Cornblath, M. J. Giuliani, J. C. Kincaid, J. L. Ochoa, G. J. Parry, and L. H. Weimer. 2014. Quantitative sensory testing report of the therapeutics and technology assessment subcommittee of the American Academy of Neurology. *Neurology*. **155**:1002–1015.
 35. Shir, Y., R. Zeltser, J. J. Vantine, G. Carmi, I. Belfer, A. Zangen, D. Overstreet, P. Raber, and Z. Seltzer. 2001. Correlation of intact sensibility and neuropathic pain-related behaviors in eight inbred and outbred rat strains and selection lines. *Pain*. **90**:75–82.
 36. Lambert, G. A., G. Mallos, and A. S. Zagami. 2009. Von Frey's hairs – a review of their technology and use – a novel automated von Frey for improved testing for hyperalgesia. *Journal of Neuroscience Methods*. **177**:420–426.
 37. Kim, K. J., Y. W. Yoon, and J. M. Chung. 1997. Comparison of three

- rodent neuropathic pain models. *Experimental Brain Research*. **113**:200–206.
38. Mogil, J. S., A. C. Graham, S. F. Hughes, J. S. Austin, A. Schorscher-Petcu, D. J. Langford, and G. Bennett. 2004. Hypolocomotion, asymmetrically directed behaviors (licking, lifting, flinching, and shaking) and dynamic weight bearing (gait) changes are not measures of neuropathic pain in mice. *Molecular Pain*. **112**:12–15.
39. Amagai, Y., A. Tanaka, A. Matsuda, K. Oida, K. Jung, S. Nishikawa, H. Jang, S. Ishizaka, and H. Matsuda. 2013. Topical application of ketoprofen improves gait disturbance in rat models of acute inflammation. *Biomed Research International*. **540231**:Epub 2013 August 7.
40. Clarke, K. A., S. A. Heitmeyer, A. G. Smith, and Y. O. Taiwo. 1997. Gait analysis in a rat model of osteoarthritis. *Physiology & Behavior*. **62**:951–954.
41. Okamoto, N., A. Tanaka, K. Jung, K. Karasawa, K. Orito, A. Matsuda, Y. Amagai, K. Oida, K. Ohmori, and H. Matsuda. 2011. Silencing of *int6* gene restores function of the ischemic hindlimb in a rat model of peripheral arterial disease. *Cardiovascular Research*. **92**:209–217.
42. Pitcher, G. M., J. Ritchie, and J. L. Henry. 1999. Paw withdrawal threshold in the von Frey hair is influenced by the surface on which the rat stands. *Journal of Neuroscience Methods*. **87**:185–193.
43. Orito, K., S. Kurozumi, I. Ishii, A. Tanaka, J. Sawada, and H. Matsuda. 2007. A sensitive gait parameter for quantification of arthritis in rats.

Journal of Pharmacological Sciences. **103**:113–116.

44. Ferreira-Gomes, J., S. Adaes, and J. M. Castro-Lopes. 2008. Assessment of movement-evoked pain in osteoarthritis by the knee-bend and CatWalk tests: a clinically relevant study. *The Journal of Pain.* **9**:945–954.
45. Taylor, B. K., S. S. Abhyankar, N. T. Vo, C. L. Kriedt, S. B. Churi, and J. H. Urban. 2007. Neuropeptide Y acts at Y1 receptors in the rostral ventral medulla to inhibit neuropathic pain. *Pain.* **131**:83–95.
46. Menéndez, L., A. Lastra, A. Hidalgo, and A. Baamonde. 2002. Unilateral hot plate test: a simple and sensitive method for detecting central and peripheral hyperalgesia in mice. *Journal of Neuroscience Methods.* **113**:91–97.
47. Bauer, C. S., M. Nieto-Rostro, W. Rahman, A. Tran-Van-Minh, L. Ferron, L. Douglas, I. Kadurin, Y. S. Ranjan, L. Fernandez-Alacid, N. S. Millar, A. H. Dickenson, R. Lujan, and A. C. Dolphin. 2009. The increased trafficking of the calcium channel subunit $\alpha_2\delta$ -1 to presynaptic terminals in neuropathic pain is inhibited by the $\alpha_2\delta$ -1 ligand pregabalin. *The Journal of Neuroscience.* **29**:4076–4088.
48. Sommer, C., T. Lindenlaub, P. Teuteberg, M. Schäfers, T. Hartung, and K. V. Toyka. 2001. Anti-TNF-neutralizing antibodies reduce pain-related in two different mouse models of painful mononeuropathy. *Brain Research.* **913**:86–89.
49. Orbay, H., A. C. Uysal, H. Hyakusoku, and H. Mizuno. 2012. Differentiated and undifferentiated adipose-derived stem cells improve

- function in rats with peripheral nerve gaps. *Journal of Plastic, Reconstructive & Aesthetic Surgery*. **65**:657–664.
50. Vrinten, D. H., and F. F. T. Hamers. 2003. ‘CatWalk’ automated quantitative gait analysis as a novel method to assess mechanical allodynia in the rat; a comparison with von Frey testing. *Pain*. **102**:203–209.
51. LaBuda, C. J., and P. J. Little. 2005. Pharmacological evaluation of the selective spinal nerve ligation model of neuropathic pain in the rat. *Journal of Neuroscience Methods*. **144**:175–181.
52. Cao, Y., H. Wang, C. Y. Chiang, J. O. Dostrovsky, and B. J. Sessle. 2013. Pregabalin suppresses nociceptive behavior and central sensitization in a rat trigeminal neuropathic pain model. *The Journal of Pain*. **14**:193–204.
53. Katayama, I. et al. 2011. Japanese guideline for atopic dermatitis. *Allergy International*. **60**:205-220.
54. Grillo, M. P., R. A. Long., and D. Long. 2007. Habit Reversal Training for the Itch-Scratch Cycle Associated with Pruritic Skin Conditions. *Dermatology Nursing*. **19**:243–248.
55. Matsuda. H., N. Watanabe, G. P. Geba, J. Sperl, M, Tsudzuki, J, Hiroi, M, Mastumoto, H. Ushio, S. Saito, P. W. Askenase, and C. Ra. 1997. Development of atopic dermatitis-like skin lesion with IgE hyperproduction in NC/Nga mice. *International Immunology*. **9**: 61–466.
56. Shiohara T., J. Hayakawa, and Y. Mizukawa. 2004. Animal model for atopic dermatitis: are they relevant to human disease? *Journal of*

- Dermatological Science*. **36**:1–9.
57. Kuraishi, Y., T. Nagasawa, K. Hayashi, and M. Sato. 1995. Scratching behavior induced by pruritogenic but not algesiogenic agents in mice. *European Journal of Pharmacology*. **275**:229–233.
58. Orito, K., Y. Chida, C. Fujisawa, P. D. Arkwright, and H. Matsuda. 2004. A new analytical system for quantification scratching behavior in mice. *British Journal of Pharmacology*. **150**:33-38.
59. Hatano, Y., M. Q. Man, Y. Uchida, D. Crumrine, C. T. Scharschmidt, E. G. Kim, T. M. Maruo, K. R. Feingold, P. M. Elias, W. M. Holleran. 2009. Maintenance of an acidic stratum corneum prevents emergence of murine atopic dermatitis. *Journal of Investigative Dermatology*. **129**:1824–1835.
60. Jang, H., A. Matsuda, K. Jung, K. Karasawa, K. Matsuda, K. Oida, S. Ishizaka, G. Ahn, Y. Amagai, C. Moon, S. Kim, P. D. Arkwright, K. Takamori, H. Matsuda, and A. Tanaka. 2015. Skin pH Is the Master Switch of Kallikrein 5-Mediated Skin Barrier Destruction in a Murine Atopic Dermatitis Model. *Journal of Investigative Dermatology*. **136**:127–135.
61. Soter, N. A., A. B. Fleischer Jr., G. F. Webster, E. Monroe, and I. Lawrence. 2001. Tacrolimus ointment for the treatment of atopic dermatitis in adult patients: Part II, safety. *Journal of the American Academy of Dermatology*. **44**:S39–S46.
62. Sasakawa, T., Y. Higashi, Y. Hirayama, Y. Sasakawa, Y. Okubo, and S. Mutoh. 2004. Topical Application of FK506 (Tacrolimus) Ointment

- Inhibits Mite Antigen-Induced Dermatitis by Local Action in NC/Nga Mice. *International Archives of Allergy and Immunology*. **133**:55–63.
63. Inagaki, N., K. Igeta, N. Shiraishi, J. F. Kim, M. Nagao, N. Nakamura, and H. Nagai. 2003. Evaluation and Characterization of Mouse Scratching Behavior by a New Apparatus, MicroAct. *Skin Pharmacology and Physiology*. **16**:165–175.
64. David, D. J., B. A. Samuels, Q. Rainer, J. Wang, D. Marsteller, I. Mendez, M. Drew, D. A. Craig, B. P. Guiard, J. Guilloux, R. P. Artymyshyn, A. M. Gardier, C. Gerald, I. A. Antonijevic, E. D. Leonardo, and R. Hen. 2009. Neurogenesis-Dependent and -Independent Effects of Fluoxetine in an Animal Model of Anxiety/Depression. *Neuron*. **62**:479–493.
65. Ostroff, R. B., and C. Nelson. 1999. Risperidone Augmentation of Selective Serotonin Reuptake Inhibitors in Major Depression. *Journal of Clinical Psychiatry*. **60**:256–259.
66. Gupta, M. A., and A. K. Gupta. 1998. Depression and suicidal ideation in dermatology patients with acne, alopecia areata, atopic dermatitis and psoriasis. *British Journal of Dermatology*. **139**:846–850.
67. Fried, R. G., M. A. Gupta, and A. K. Gupta. 2005. Depression and skin disease. *Dermatologic Clinics*. **23**:657–664.
68. Dalgard, F. J., U. Gieler, L. Tomas-Aragones, L. Lien, F. Poot, G. B. Jemec, L. Misery, C. Szabo, D. Linder, F. Sampogna, A. W. Evers, J. A. Halvorsen, F. Balieva, J. Szepietowski, D. Romanov, S. E. Marron, I. K. Altunary, A. Y. Finlay, S. S. Salek, and J. Kupfer. 2015. The

- psychological burden of skin diseases: a cross-sectional multicenter study among dermatological out-patients in 13 European countries. *Journal of Investigative Dermatology*. **135**:984–991.
69. Savitz, J., W. C. Drevets, C. M. Smith, T. A. Victor, B. E. Wurfel, P. S. F. Bellgowan, J. Bodurka, T. K. Teague, and R. Dantzer. 2015. Putative Neuroprotective and Neurotoxic Kynurenine Pathway Metabolites Are Associated with Hippocampal and Amygdalar Volumes in Subjects with Major Depressive Disorder. *Neuropsychopharmacology*. **40**:463–471.
70. Steru, L., R. Chermat, B. Thierry, and P. Simon. 1985. The tail suspension test: A new method for screening antidepressants in mice. *Psychopharmacology*. **85**:367–370.
71. Prut, L., and C. Belzung. 2003. The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. *European Journal of Pharmacology*. **463**:3–33.
72. Landsteiner, K., and W. Chase. 1937. Studies on the sensitization of animals with simple chemical compounds. *Journal of Experimental Medicine*. **66**:337.
73. Xu, S., F. Grande, A. Garofalo, A., and N. Neamati. 2013. Discovery of a Novel Orally Active Small-Molecule gp130 Inhibitor for the Treatment of Ovarian Cancer. *Molecular Cancer Therapeutics*. **12**:937–949.
74. Miller, A., and C. L. Raison. 2016. The role of inflammation in depression: from evolutionary imperative to modern treatment target. *Nature Immunology*. **16**:22–34.
75. Esparza, J., Schaarsch, H., Liang, L., *et al.* 2013. A functional IL-6

receptor (*IL-6R*) variant is a risk factor for persistent atopic dermatitis.

Journal of Allergy and Clinical Immunology. **132**:371–377.

76. Garbers, C., Monhasery, N., Aparicio-Siegmund, S., Lokau, J., Baran, P., Nowell, M. A., Jones, S. A., Rose-John, S., and J. Scheller. 2014. The interleukin-6 receptor Asp358Ala single nucleotide polymorphism rs2228145 confers increased proteolytic conversion rates by ADAM proteases. *Biochimica et Biophysica Acta*. **1842**:1485–1494.

謝辞

本研究を遂行するにあたり、様々な方面からご支援・ご教授を賜りました東京農工大学生物システム応用科学府共同先進健康科学専攻の田中あかね教授に深謝いたします。また、論文作成に際しご指導頂いた共同先進健康科学専攻の松田浩珍教授、宮浦千里教授、田中秀幸教授、田中剛教授、ならびに早稲田大学理工学術院の柴田重信教授に感謝いたします。さらに、動物モデルのうつ様病態解析の技術指導ならびにオープンフィールド試験機器を貸与して下さった健康長寿医療センター・老化脳神経科学研究チームの遠藤昌吾先生、柳井修一先生、次世代型擦過行動自動定量化システム SCLABA[®]-Real に関して技術支援頂いた株式会社ノベルテックに感謝いたします。最後に、研究のすみやかな進行にご配慮下さった東京農工大学比較動物医学研究室の皆様に御礼申し上げます。