

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2017 年 9 月 8 日(08.09.2017)



(10) 国際公開番号
WO 2017/149745 A1

- (51) 国際特許分類:
G01N 33/483 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2016/056741
- (22) 国際出願日: 2016 年 3 月 4 日(04.03.2016)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (71) 出願人: テルモ株式会社(TERUMO KABUSHIKI KAISHA) [JP/JP]; 〒1510072 東京都渋谷区幡ヶ谷二丁目 4 番 1 号 Tokyo (JP).
- (72) 発明者: 網のぞみ(AMI, Nozomi); 〒2590151 神奈川県足柄上郡中井町井ノ口 1 5 0 0 番地 テルモ株式会社内 Kanagawa (JP). 玉造滋(TAMAT-SUKURI, Shigeru); 〒1631450 東京都新宿区西新宿 3 丁目 2 0 番 2 号 テルモ株式会社内 Tokyo (JP).
- (74) 代理人: 千葉剛宏, 外(CHIBA Yoshihiro et al.); 〒1510053 東京都渋谷区代々木 2 丁目 1 番 1 号 新宿マインズタワー 1 6 階 Tokyo (JP).
- (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): 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, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

- (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (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), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

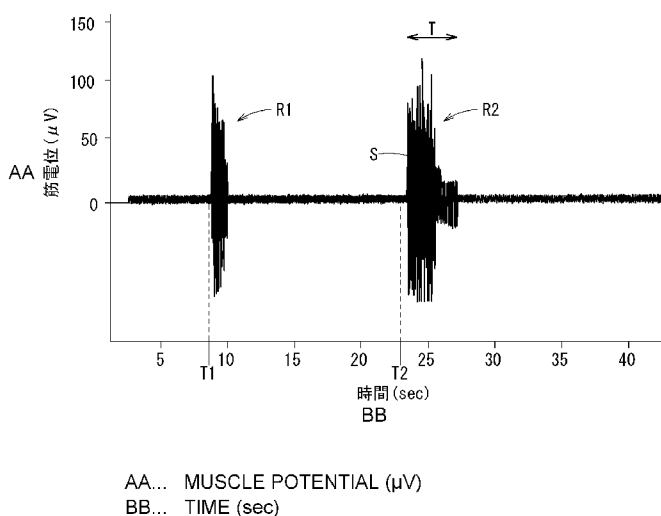
— 国際調査報告 (条約第 21 条(3))

(54) Title: METHOD FOR ASSESSING PAIN CAUSED BY ADMINISTRATION OF DRUG SOLUTION, AND METHOD FOR SELECTING DRUG SOLUTION ADMINISTRATION

(54) 発明の名称: 薬液投与による痛みの評価方法及び薬液投与の選定方法

[図2]

FIG. 2



(57) Abstract: In a method for assessing pain caused by the administration of a drug solution, a rat (12) is provided, the rat (12) is anesthetized by inhalation anesthesia, a measurement electrode (24) is placed in the semitendinosus muscle (12b) of the anesthetized rat (12), an injection needle (18) is punctured under the plantar skin surface (12a) of the anesthetized rat (12) while measuring the muscle potential in the semitendinosus muscle (12b) with the measurement electrode (24), a drug solution is administered to the anesthetized rat (12) through the injection needle (18) after a myoelectric reaction caused by the punctuation of the injection needle (18) disappears, and at least one of the measurement of the duration time (T) of the myoelectric reaction caused by the administration of the drug solution and the measurement of the EMG intensity, which is produced by integrating absolute values of muscle potentials during the period between the onset of the myoelectric reaction by the administration of the drug solution to the disappearance of the myoelectric reaction, is carried out.

(57) 要約:

[続葉有]

WO 2017/149745 A1



薬液投与による痛みの評価方法では、ラット（１２）を準備し、ラット（１２）を吸入麻酔にて麻酔し、麻酔されたラット（１２）の半腱様筋（１２ｂ）に測定電極（２４）を留置し、半腱様筋（１２ｂ）の筋電位を測定電極（２４）で測定しながら、麻酔されたラット（１２）の足底皮下（１２ａ）に注射針（１８）を穿刺し、注射針（１８）の穿刺による筋電反応が消えた後に、麻酔されたラット（１２）に注射針（１８）を介して薬液を投与し、薬液の投与による筋電反応の持続時間（Ｔ）の測定、及び薬液の投与による筋電反応が生じてから消えるまでの筋電位の絶対値を積分したＥＭＧ強度の測定の少なくとも一方を行う。

明 細 書

発明の名称：

薬液投与による痛みの評価方法及び薬液投与の選定方法

技術分野

[0001] 本発明は、薬液投与による痛みの評価方法及び薬液投与の選定方法に関する。

背景技術

[0002] 注射は最も用いられている薬液投与方法であるが、注射による痛みは患者にとって不快である。このため、注射による痛みを低減することが望まれている。注射による痛みには、注射針の穿刺による痛みと薬液（薬液の注入）による痛みがある。従って、注射による痛みを低減するためには、穿刺による痛みと薬液投与による痛みをそれぞれ評価（定量化）できることが必要である。

[0003] これに関連し、文献1では、麻酔したラットの脊髓反射で針の穿刺による痛みを評価する方法が提案されている。

文献1；岡本（Okamoto, K）、網（Ami, N）、大島（Oshima, H）、「麻酔ラットにおける屈筋反射反応と針挿入の痛みの評価（Assessment of needle insertion pain with flexor reflex responses in anesthetized rats）」、Pain Research、日本疼痛学会、2012年、第27巻、第24号、p. 215-225

[0004] また、文献2では、筋電図（EMG）から血管の痛みを評価する方法が提案されている。

文献2；Masumi, S、Senba, E、「麻酔ラットにおける脂肪乳剤誘発による血管の痛みにおける一酸化窒素の関与（Nitric oxide involvement in lipid emulsion-induced vascular pain in anestheti

zed rats)」、Eur J Pharmacol、Elsevier、2008年、第594号、p. 64-69

発明の概要

- [0005] しかしながら、従来では、薬液投与による痛みを評価（定量化）する有効な方法についての提案はなされていなかった。
- [0006] 本発明はこのような課題を考慮してなされたものであり、薬液投与による痛みの評価方法及び薬液投与の選定方法を提供することを目的とする。
- [0007] 上記の目的を達成するため、本発明に係る薬液投与による痛みの評価方法では、身体の前記所定部位と、前記所定部位に刺激を与えた際に脊髄反射によって屈曲する骨格筋とを有する哺乳類の実験動物を準備し、前記実験動物を吸入麻酔にて麻酔し、麻酔された前記実験動物の前記骨格筋に測定電極を挿入し、前記骨格筋の筋電位を前記測定電極で測定しながら、麻酔された前記実験動物の前記所定部位に注射針を穿刺し、前記注射針の穿刺による筋電反応が消えた後に、麻酔された前記実験動物に前記注射針を介して薬液を投与し、前記薬液の投与による筋電反応の持続時間の測定、及び前記薬液の投与による前記筋電反応が生じてから消えるまでの筋電位の絶対値を積分したEMG強度の測定の少なくとも一方を行う、ことを特徴とする。
- [0008] 上記の本発明の方法によれば、注射針の穿刺による筋電反応が消えた後に実験動物に薬液を投与して薬液投与による筋電反応を測定するので、筋電図（EMG）上で穿刺による筋電反応と薬液投与による筋電反応とが重なることがない。これにより、穿刺による痛みと分けて、薬液投与による痛みを評価（定量化）することができる。また、ヒトが感じる痛みは、実験動物を用いた筋電反応の結果と同様の傾向を示すため、本発明の方法により、ヒトに注射した場合の薬液投与による痛みを評価することが可能である。従って、本発明の方法によれば、より痛みの低減されたヒト用の薬液注射の開発に寄与することができる。
- [0009] 上記の薬液投与による痛みの評価方法において、前記実験動物の前記所定部位の複数の投与箇所、組成の異なる複数の前記薬液を同じ投与条件で投

与し、又は同一組成の前記薬液を異なる投与条件で投与してもよい。

[0010] このように、同じ実験動物で複数箇所投与することにより、薬液組成又は投与条件による痛みの違いを比較することができ、より痛みの少ない薬液又は投与条件を選定することができる。

[0011] 上記の薬液投与による痛みの評価方法において、前記実験動物は、ラットであってもよい。

[0012] 上記の薬液投与による痛みの評価方法において、前記所定部位は足底皮下であり、前記骨格筋は半腱様筋であってもよい。

[0013] 上記の薬液投与による痛みの評価方法において、前記複数の投与箇所における一箇所当たりの投与量は10～100 μ Lであってもよい。

[0014] 上記の薬液投与による痛みの評価方法において、隣接する前記投与箇所同士の間隔を2 mm以上あけてもよい。

[0015] これにより、薬液投与による筋電反応の取得において、隣接する投与箇所による影響を回避し、精度の高い測定が可能となる。

[0016] 上記の薬液投与による痛みの評価方法において、前記複数の投与箇所での総投与量は200 μ L以下であってもよい。

[0017] 上記の薬液投与による痛みの評価方法において、前記薬液の投与速度は5～100 μ L/secであってもよい。

[0018] 上記の薬液投与による痛みの評価方法において、穿刺による前記筋電反応が消えてから1秒以上経過した後に、前記薬液の投与を開始してもよい。

[0019] これにより、穿刺による筋電反応と分けて、薬液投与による筋電反応をより効果的に測定することができる。

[0020] 上記の薬液投与による痛みの評価方法において、穿刺による前記筋電反応が生じた場合にのみ前記薬液を投与してもよい。

[0021] これにより、無駄な薬液投与を回避することができる。

[0022] 上記の薬液投与による痛みの評価方法において、前記測定電極として双極電極を用い、前記実験動物の胸部皮膚に基準電極を貼付してもよい。

[0023] これにより、ノイズの少ない筋電位波形を取得することができ、測定精度

を向上させることができる。

[0024] また、本発明に係る薬液投与の選定方法は、身体の所定部位と、前記所定部位に刺激を与えた際に脊髄反射によって屈曲する骨格筋とを有する哺乳類の実験動物を準備する準備ステップと、前記実験動物を吸入麻酔にて麻酔する麻酔ステップと、麻酔された前記実験動物の前記骨格筋に測定電極を留置する測定電極留置ステップと、前記骨格筋の筋電位を前記測定電極で測定しながら、麻酔された前記実験動物の前記所定部位に注射針を穿刺する穿刺ステップと、前記注射針の穿刺による筋電反応が消えた後に、麻酔された前記実験動物に前記注射針を介して薬液を投与する投与ステップと、前記薬液の投与による筋電反応が生じてから消えるまでの前記筋電位の絶対値を積分したE M G強度の測定、及び前記薬液の投与による前記筋電反応の持続時間の測定の少なくとも一方を行う測定ステップと、を含み、組成の異なる複数の薬液毎に、又は複数の投与条件毎に、前記穿刺ステップ、前記投与ステップ及び前記測定ステップを行い、さらに、組成の異なる前記複数の薬液のうち、前記持続時間が最も短い、あるいは前記E M G強度が最も小さい薬液組成、又は前記複数の投与条件のうち、前記持続時間が最も短い、あるいは前記E M G強度が最も小さい投与条件を特定する特定ステップを含む、ことを特徴とする。

[0025] この方法によれば、痛みの少ない薬液組成又は投与条件を選定することができる。

[0026] 本発明の薬液投与による痛みの評価方法によれば、穿刺による痛みと分けて、薬液投与による痛みを評価（定量化）することができる。また、本発明の薬液投与の選定方法によれば、痛みの少ない薬液組成又は投与条件を選定することができる。

図面の簡単な説明

[0027] [図1]本発明の方法に用いる一構成例に係る測定システムの概略図である。

[図2]本発明の方法によって得られる筋電位波形の一例である。

[図3]図3 Aは、組成の異なる複数の薬液をラットに注射した場合の各薬液の

投与による筋電反応の持続時間を示すグラフであり、図3Bは、組成の異なる複数の薬液をラットに注射した場合の各薬液の投与による筋電反応から得たEMG強度を示すグラフである。

[図4]図4Aは、生理食塩水を異なる複数の注入量にてヒトに注射した場合の痛みの大きさ(VAS)を示すグラフであり、図4Bは、生理食塩水を異なる複数の投与量にてラットに注射した場合の注射液による筋電反応から得たEMG強度を示すグラフである。

[図5]図5Aは、異なる複数のpH値でヒトに注射した場合の痛みの大きさ(VAS)を示すグラフであり、図5Bは、異なる複数のpH値でラットに注射した場合の注射液による筋電反応から得たEMG強度を示すグラフである。

[図6]図6Aは、5%NaClをヒトに注射した場合の痛みの大きさ(VAS)の時間経過を示すグラフであり、図6Bは、NaClを異なる複数の濃度にてラットに注射した場合の注射液による筋電反応から得たEMG強度を示すグラフである。

[図7]図7Aは、グルタミン酸を異なる複数のモル濃度にてヒトに注射した場合の痛みの大きさ(VAS)を示すグラフであり、図7Bは、グルタミン酸を異なる複数のモル濃度にてラットに注射した場合の注射液による筋電反応から得たEMG強度を示すグラフである。

[図8]図8Aは、ポリエチレングリコール・生理食塩水混合液を異なる複数の粘度にてラットに注射した場合の注射液による筋電反応の持続時間を示すグラフであり、図8Bは、ポリエチレングリコール・生理食塩水混合液を異なる複数の粘度にてラットに注射した場合の注射液による筋電反応から得たEMG強度を示すグラフである。

[図9]図9Aは、リン酸緩衝生理食塩水(pH5)を異なる複数の投与速度にてラットに注射した場合の注射液による筋電反応から得たEMG強度を示すグラフであり、図9Bは、10%NaClを異なる複数の投与速度にてラットに注射した場合の注射液による筋電反応から得たEMG強度を示すグラフ

である。

[図10]本発明の実施例を示すグラフであって、pHが異なる複数の薬液（炎症性自己免疫疾患治療用の注射用水性製剤）をラットに注射した場合の薬液投与による筋電反応から得たEMG強度を示すグラフである。

発明を実施するための形態

[0028] 以下、本発明に係る薬液投与による痛みの評価方法及び薬液投与の選定方法について好適な実施形態を挙げ、添付の図面を参照しながら説明する。

[0029] 図1は、本発明の方法に用いる一構成例に係る測定システム10の概略図である。図1に示す本実施形態において、薬液投与による痛みの評価のために使用する被検体（実験動物）はラット12である。使用し得るラット12の条件としては、例えば、7～10週齢、体重200～400g、系統はSD（他の系統でも可）である。ラット12の順化・検疫期間は5日間以上とするのが好ましい。ラット12には麻酔用マスク13を装着し、吸入麻酔をする。

[0030] なお、使用し得る実験動物は、身体の所定部位と、所定部位に刺激を与えた際に脊髄反射によって屈曲する骨格筋とを有する哺乳類であればよい。ラット12の場合、足底皮下12aに刺激を与えた際に脊髄反射によって半腱様筋12bが屈曲する。ラット12以外に使用し得る哺乳類の実験動物としては、例えば、マウス、モルモット、スナネズミ、ハムスター、フェレット、ウサギ、イヌ、ミニブタ等が挙げられる。

[0031] 薬液はシリンジ14に充填される。シリンジ14の容量は例えば、1～10mLである。シリンジ14は樹脂製の軟質チューブ16を介して注射針18に接続されている。適用し得る注射針18のサイズは、例えば、34G～22Gである。注射針18はラット12の足底皮下12aに穿刺される。

[0032] シリンジ14はシリンジポンプ20に装着される。シリンジポンプ20は、装着されたシリンジ14の押子14aを押すスライダ22を備える。シリンジポンプ20では、設定された送液量とシリンジ14の種類（容量）に基づいて、スライダ22で押子14aを押し込む速度を決定する。これにより

、ラット 1 2 への薬液の投与速度を任意に設定することができる。薬液の投与速度は例えば $5 \sim 100 \mu\text{L} / \text{sec}$ である。

[0033] 薬液投与による痛みを測定するために、ラット 1 2 の大腿部の半腱様筋 1 2 b の筋電位を記録する。筋電位の記録においては、針状の測定電極 2 4 (例えば、双極釣針電極) を半腱様筋 1 2 b に穿刺して留置するとともに、胸部皮膚 1 2 c に基準電極 2 6 を貼付する。測定電極 2 4 及び基準電極 2 6 からの電位信号は、高感度生体電気増幅器 2 8 によって増幅され、データ収集装置 3 0 に送信される。

[0034] データ収集装置 3 0 では、所定のサンプリング間隔 (例えば、 0.1 ms) でデータ (電位信号) を記録し、筋電位波形を生成する。パーソナルコンピュータ 3 2 では、データ収集装置 3 0 により生成された筋電位波形をモニタ画面 3 2 a に表示する。

[0035] また、この測定システム 1 0 では、注射による筋電反応を測定する前準備として、筋電反応 (筋肉の収縮) を測定できる麻酔深度に調節するために、クリップ型刺激電極 3 4 を使用した電気刺激を行う。クリップ型刺激電極 3 4 は、図示しない電気刺激装置に接続されている。

[0036] 薬液投与による痛みの評価方法及び薬液投与の選定方法は、上記のように構成された測定システム 1 0 を用いる場合、例えば以下のように行うことができる。

[0037] 異なる複数の薬液組成からどの組成が最も痛みが少ないかを調べたい場合には、組成の異なる複数の薬液を準備する。薬液組成の違いは、例えば、薬液成分 (例えば、有効成分の化学構造、バッファー、安定化剤、酸化防止剤等) の種類、pH 値、粘度等による。あるいは、異なる複数の投与条件からどの投与条件が最も痛みが少ないかを調べたい場合には、同一組成の薬液について異なる複数の投与条件を計画する。投与条件のパラメータとしては、薬液の投与速度 (注入速度)、投与量が挙げられる。

[0038] 被検体となるラット 1 2 を準備し (準備ステップ)、ラット 1 2 に吸入麻酔をする (麻酔ステップ)。適用可能な吸入麻酔薬としては例えばイソフル

ランが挙げられる。空気に対する麻酔濃度は、麻酔導入時で例えば3～4% / Airであり、記録時で例えば1～2% / Airである。なお、安定したデータを得るため、麻酔中は、保温マットによりラット12を加温し、体温を一定に保つことが好ましい。

[0039] 次に、麻酔されたラット12の半腱様筋12bに測定電極24を留置する(測定電極留置ステップ)。具体的には、クリップ型刺激電極34でラット12の後肢の甲と裏を挟み込み、図示しない電気刺激装置により、クリップ型刺激電極34を介して痛覚のC繊維に電気刺激(例えば、40Hz、10mA、2ms)を与える。このとき収縮が認められた位置の大腿部皮膚を約1cm程度切開して半腱様筋12bを露出させてから、測定電極24を挿入する。

[0040] 測定電極24を留置したら、クリップ型刺激電極34を介して図示しない電気刺激装置により再び電気刺激(例えば、40Hz、5mA、2ms)を与え、筋電反応強度を参照しながら、ラット12の麻酔深度を微調整する。その後、麻酔深度を一定に保持する。

[0041] また、ラット12の胸部を脱毛して胸部皮膚12cを露出させた後、胸部皮膚12cに基準電極26を貼付する。なお、基準電極26の貼付は、測定電極24の留置の前でも後でもよく、あるいは並行して行ってもよい。測定電極24として双極電極を用いるとともに、ラット12の胸部皮膚12cに基準電極26を貼付すると、ノイズの少ない筋電位波形を取得することができ、測定精度を向上させることができる。なお、基準電極26を貼付する場合には、測定電極24は単極電極であってもよい。

[0042] 以上の準備が整ったら、同一のラット12を用いて、組成の異なる複数の薬液毎に、又は複数の投与条件毎に、以下に説明する穿刺ステップ、投与ステップ及び測定ステップを行う。すなわち、ある薬液組成又は投与条件にて穿刺ステップ、投与ステップ及び測定ステップを行った後に、同一のラット12を用いて、別の薬液組成又は投与条件にて穿刺ステップ、投与ステップ及び測定ステップを行うことを繰り返す。

- [0043] 穿刺ステップでは、麻酔されたラット 12 の足底皮下 12 a に注射針 18 を穿刺する。この場合、注射針 18 の先端部に設けられた刃面全体が足底皮下 12 a に刺さったら穿刺完了である。このように注射針 18 をラット 12 に穿刺すると、穿刺による筋電反応が生じる。
- [0044] 穿刺ステップに続く投与ステップでは、注射針 18 の穿刺による筋電反応が消えた後に、麻酔されたラット 12 に注射針 18 を介して薬液を投与する。この場合、シリンジポンプ 20 は予め設定された投与速度及び投与量に基づきシリンジ 14 の押子 14 a を押し込むことにより、薬液は、設定された投与速度及び投与量でラット 12 の足底皮下 12 a に注入される。
- [0045] なお、各投与ステップにおいて、隣接する投与箇所（穿刺箇所）同士の間隔は、一箇所当たりの投与量が $100\ \mu\text{L}$ 以下の場合で $2\ \text{mm}$ 以上あけることが好ましい。これにより、薬液投与による筋電反応の取得において、隣接する投与箇所による影響を回避し、精度の高い測定が可能となる。
- [0046] 組成の異なる複数の薬液を試験する場合には、各投与ステップでの薬液の投与速度及び投与量を同じにする。また、同一組成の薬液について複数の投与条件を試験する場合には、各投与ステップにおいて、薬液の投与速度と投与量の一方又は両方を変えて、薬液を投与する。
- [0047] ラット 12 の足底サイズを考慮すると、複数の投与箇所における一箇所当たりの投与量は $10\sim 100\ \mu\text{L}$ であることが好ましい。また、複数の投与箇所でのラット 12 への総投与量は $200\ \mu\text{L}$ 以下であることが好ましい。例えば、投与量と投与箇所数の組合せは、 $20\ \mu\text{L}\times 8$ 箇所（ $=160\ \mu\text{L}$ ）、 $50\ \mu\text{L}\times 4$ 箇所（ $=200\ \mu\text{L}$ ）、 $100\ \mu\text{L}\times 2$ 箇所（ $200\ \mu\text{L}$ ）等が挙げられる。また、薬液の投与速度は、例えば、 $5\sim 100\ \mu\text{L}/\text{sec}$ である。
- [0048] なお、穿刺ステップにおいて穿刺による筋電反応が生じた場合にのみ薬液を投与すると、無駄な薬液投与を回避することができる。すなわち、穿刺したにもかかわらず筋電反応が見られない場合には、別の場所に穿刺し直すことで、筋電反応が生じない箇所への薬液の投与を未然に防止することができる。

る。

[0049] 注射（穿刺及び薬液投与）に伴ってラット 12 の半腱様筋 12 b に発生した筋電位は、測定電極 24 により検出され、高感度生体電気増幅器 28 により増幅された後に、データ収集装置 30 に送られる。データ収集装置 30 によって、筋電位データから筋電位波形が生成される。生成された筋電位波形は、パーソナルコンピュータ 32 のモニタ画面 32 a に表示される。

[0050] 図 2 は、得られる筋電位波形の一例を示している。図 2 において、T1 は注射針 18 を穿刺した時点であり、穿刺による筋電反応（R1）が見られる。また、T2 はラット 12 への薬液の投与を開始した時点であり、薬液投与による筋電反応（R2）が見られる。

[0051] 上述したように、本発明では、注射針 18 の穿刺による筋電反応が消えた後に、麻酔されたラット 12 に注射針 18 を介して薬液を投与するので、穿刺による筋電反応と薬液投与による筋電反応とが時間的に重ならない。すなわち、薬液投与による筋電反応を、穿刺による筋電反応と分けて測定することができる。

[0052] このような筋電位波形が得られたら、薬液投与による痛みを評価（定量化）するために、測定ステップを行う。測定ステップでは、薬液投与による筋電反応の持続時間 T の測定、及び薬液投与による筋電反応が生じてから消えるまでの筋電位の絶対値を積分した積分値 S、すなわち EMG 強度（ $\mu V \cdot s$ ）の測定の少なくとも一方を行う。積分値 S は、筋電反応の持続時間 T の期間における筋電位を整流化し、積分した筋電位波形の面積である。薬液投与による筋電反応の持続時間 T と積分値 S は、パーソナルコンピュータ 32 により計算してもよいし、データ収集装置 30 により計算した値をモニタ画面 32 a に表示させてもよい。

[0053] このように、本発明の方法によれば、注射針 18 の穿刺による筋電反応が消えた後にラット 12 に薬液を投与して薬液投与による筋電反応を測定するので、筋電図（EMG）上で穿刺による筋電反応と薬液投与による筋電反応とが重なることがない。これにより、穿刺による痛みと分けて、薬液投与に

よる痛みを評価（定量化）することができる。この場合、穿刺による筋電反応が消えてから1秒以上（より好ましくは10秒以上）経過した後に、薬液の投与を開始すると、穿刺による筋電反応と分けて、薬液投与による筋電反応をより効果的に測定することができる。

[0054] 以上のように組成の異なる複数の薬液毎に、又は複数の投与条件毎に、穿刺ステップ、投与ステップ及び測定ステップを行い、次に、組成の異なる複数の薬液のうち持続時間Tが最も短いあるいは積分値Sが最も小さい薬液組成、又は複数の投与条件のうち持続時間Tが最も短いもしくは積分値Sが最も小さい投与条件を特定する（特定ステップ）。これにより、痛みの少ない薬液組成又は投与条件を選定することができる。

[0055] ここで、図3Aは、組成の異なる複数の薬液をラットに注射した場合の各薬液の投与による筋電反応の持続時間を示すグラフである。図3Bは、組成の異なる複数の薬液をラットに注射した場合の各薬液の投与による筋電反応から得たEMG強度を示すグラフである。図3A及び図3Bから、ラットでは薬液組成の違いによって、筋電反応の持続時間及びEMG強度が異なること、すなわち薬液投与による痛みに差があることが分かる。

[0056] 図4Aは、生理食塩水を異なる複数の投与量にてヒトに注射した場合の痛みの大きさ（VAS: Visual Analog Scale）を示すグラフである（下部に出典元を示す）。VASは、最大を10として、現在の痛みがどの程度であるかを示す評価スケールである。図4Bは、生理食塩水を異なる複数の投与量にてラットに注射した場合の注射液による筋電反応から得たEMG強度を示すグラフである。図4A及び図4Bから、投与量が増えるほど痛みが大きくなる傾向があることは、ヒトもラットも同じであることが分かる。

[0057] 図5Aは、異なる複数のpH値でヒトに注射した場合の痛みの大きさ（VAS）を示すグラフである（下部に出典元を示す）。図5Bは、異なる複数のpH値でラットに注射した場合の注射液による筋電反応から得たEMG強度を示すグラフである。図5A及び図5Bから、pH値が低いほど痛みが大

きくなる傾向があることは、ヒトもラットも同じであることが分かる。

[0058] 図6 Aは、5 % N a C l をヒトに注射した場合の痛みの大きさ (V A S) の時間経過を示すグラフである (下部に出典元を示す) 。図6 A から、5 % N a C l をヒトに注射すると、大きな痛みが生じることが分かる。一方、図6 B は、N a C l を異なる複数の濃度にてラットに注射した場合の注射液による筋電反応から得た E M G 強度を示すグラフである。図6 B から、ラットでは N a C l 濃度が5 % 以上で痛みが顕著に大きくなることが分かる。よって、図6 A 及び図6 B から、N a C l 濃度による痛みに関して、ヒトとラットは同様の傾向を示すことが分かる。

[0059] 図7 A は、グルタミン酸を異なる複数のモル濃度にてヒトに注射した場合の痛みの大きさ (V A S) を示すグラフである。なお、図7 A は、同図の下部に示す出典元のグラフに基づいて作成したグラフである。図7 B は、グルタミン酸を異なる複数のモル濃度にてラットに注射した場合の注射液による筋電反応から得た E M G 強度を示すグラフである。図7 A 及び図7 B から、グルタミン酸のモル濃度が高いほど痛みが大きくなる傾向があることは、ヒトもラットも同じであることが分かる。

[0060] 以上より、ヒトが感じる痛みの大きさは、ラットを用いた筋電反応の測定結果と同様の傾向を示すことが分かる。また、ラット以外の哺乳類の場合にも、ラットと同様の傾向を示すものと考えられる。よって、本発明の方法は、ヒト用の薬液及び投与方法の開発に適用することができる。

[0061] 図8 A は、ポリエチレングリコール・生理食塩水混合液を異なる複数の粘度にてラットに注射した場合の注射液による筋電反応の持続時間を示すグラフである。図8 B は、ポリエチレングリコール・生理食塩水混合液を異なる複数の粘度にてラットに注射した場合の注射液による筋電反応から得た E M G 強度を示すグラフである。図8 A 及び図8 B から、注射液の粘度の違いで痛みの大きさが変わることが分かる。

[0062] 図9 A は、リン酸緩衝生理食塩水 (p H 5) を異なる複数の投与速度にてラットに注射した場合の注射液による筋電反応から得た E M G 強度を示すグ

ラフである。図9Bは、10%NaClを異なる複数の投与速度にてラットに注射した場合の注射液による筋電反応から得たEMG強度を示すグラフである。図9A及び図9Bから、注射液の組成によっては、注射液の投与速度の違いによって痛みの大きさが変わることが分かる。

[0063] 次に、ラット12を用いた薬液投与による痛みの評価について、具体的な実施例を説明する。本実施例においては、以下のように、組成の異なるサンプル1～3の薬液（炎症性自己免疫疾患治療用の注射用水性製剤）を調整した。

[0064] （サンプル1）

リン酸水素二ナトリウム（無水）0.71gを注射用水50mLに溶解した。リン酸二水素ナトリウム（無水）0.60gを注射用水50mLに溶解した。リン酸水素二ナトリウム溶液：リン酸二水素ナトリウム溶液＝87：13の容量比で混合し、この混合液を注射用水で10倍希釈して10mMリン酸緩衝液とした。メトトレキサート125mg、塩化ナトリウム27mgを10mMリン酸緩衝液5mLに溶解し、水酸化ナトリウム適量にてpHを7.5付近に調整し、メトトレキサート25mg/mL濃度の水溶液を得た。この水溶液を0.2μmの孔径のメンブランフィルターを用いて濾過し、炎症性自己免疫疾患治療用の注射用水性製剤を調製した。

[0065] （サンプル2）

サンプル1における水酸化ナトリウムの添加量を変化させた以外は、サンプル1と同様に行い、pH8.0のメトトレキサートを含有する注射用水性製剤を調製した。

[0066] （サンプル3）

サンプル1における水酸化ナトリウムの添加量を変化させた以外は、サンプル1と同様に行い、pH8.5のメトトレキサートを含有する注射用水性製剤を調製した。

[0067] 図1に示した測定システム10を用い、サンプル1～3のメトトレキサートを含有する注射用水性製剤をラット12に投与したときの筋電図（EMG

）を測定した。

[0068] 具体的には、濃度 3 % / A i r のイソフルランでラット 1 2 を麻酔し、半腱様筋 1 2 b を露出した。麻酔を 1 . 5 % / A i r 程度に落とし、足先先端にクリップ型刺激電極 3 4 を装着した。電気刺激 (4 0 H z 、 1 0 m A 、 2 m s) を行い、収縮が認められた位置に測定電極 2 4 を挿入した。電気刺激強度を 5 m A に落とし、 1 0 0 μ V 程度の反応が得られるまで、麻酔濃度を落とした (1 ~ 1 . 4 % / A i r) 。麻酔濃度を変更してから 3 0 分以上安定化させ、ラット 1 2 への薬液の投与を行った。

[0069] ラット 1 2 への薬液の投与においては、シリンジポンプ 2 0 に 1 m L シリンジ 1 4 を装てんし、 2 9 G の注射針 1 8 を足底皮下 1 2 a に穿刺し、 1 0 μ L / s e c の投与速度で 2 0 μ L を投与した。同一の投与条件にてサンプル 1 ~ 3 を順次ラット 1 2 に投与した。E M G 強度の測定結果を図 1 0 に示す。

[0070] 図 1 0 から、異なる組成のサンプル 1 ~ 3 のうち、サンプル 1 の薬液投与による E M G 強度が最も小さいことが分かった。すなわち、サンプル 1 の薬液投与による痛みが最も少ないことが分かった。従って、本実施例では、痛みの少ない炎症性自己免疫疾患治療用の注射用水性製剤として、サンプル 1 の薬液組成を選定することとした。

[0071] 上記において、本発明について好適な実施形態を挙げて説明したが、本発明は前記実施形態に限定されるものではなく、本発明の要旨を逸脱しない範囲において、種々の改変が可能なことは言うまでもない。

請求の範囲

- [請求項1] 身体の所定部位と、前記所定部位に刺激を与えた際に脊髄反射によって屈曲する骨格筋とを有する哺乳類の実験動物を準備し、
前記実験動物を吸入麻酔にて麻酔し、
麻酔された前記実験動物の前記骨格筋に測定電極（24）を挿入し、
前記骨格筋の筋電位を前記測定電極（24）で測定しながら、麻酔された前記実験動物の前記所定部位に注射針（18）を穿刺し、
前記注射針（18）の穿刺による筋電反応が消えた後に、麻酔された前記実験動物に前記注射針（18）を介して薬液を投与し、
前記薬液の投与による筋電反応の持続時間の測定、及び前記薬液の投与による前記筋電反応が生じてから消えるまでの前記筋電位の絶対値を積分したEMG強度の測定の少なくとも一方を行う、
ことを特徴とする薬液投与による痛みの評価方法。
- [請求項2] 請求項1記載の薬液投与による痛みの評価方法において、
前記実験動物の前記所定部位の複数の投与箇所、組成の異なる複数の前記薬液を同じ投与条件で投与し、又は同一組成の前記薬液を異なる投与条件で投与する、
ことを特徴とする薬液投与による痛みの評価方法。
- [請求項3] 請求項2記載の薬液投与による痛みの評価方法において、
前記実験動物は、ラット（12）である、
ことを特徴とする薬液投与による痛みの評価方法。
- [請求項4] 請求項3記載の薬液投与による痛みの評価方法において、
前記所定部位は足底皮下（12a）であり、前記骨格筋は半腱様筋（12b）である、
ことを特徴とする薬液投与による痛みの評価方法。
- [請求項5] 請求項3又は4記載の薬液投与による痛みの評価方法において、
前記複数の投与箇所における一箇所当たりの投与量は10～100

μL である、

ことを特徴とする薬液投与による痛みの評価方法。

[請求項6] 請求項5記載の薬液投与による痛みの評価方法において、
隣接する前記投与箇所同士の間隔を2mm以上あける、
ことを特徴とする薬液投与による痛みの評価方法。

[請求項7] 請求項3～6のいずれか1項に記載の薬液投与による痛みの評価方法において、
前記複数の投与箇所での総投与量は200 μL 以下である、
ことを特徴とする薬液投与による痛みの評価方法。

[請求項8] 請求項3～7のいずれか1項に記載の薬液投与による痛みの評価方法において、
前記薬液の投与速度は5～100 $\mu\text{L}/\text{sec}$ である、
ことを特徴とする薬液投与による痛みの評価方法。

[請求項9] 請求項1～8のいずれか1項に記載の薬液投与による痛みの評価方法において、
前記穿刺による前記筋電反応が消えてから1秒以上経過した後に、
前記薬液の投与を開始する、
ことを特徴とする薬液投与による痛みの評価方法。

[請求項10] 請求項1～9のいずれか1項に記載の薬液投与による痛みの評価方法において、
前記穿刺による前記筋電反応が生じた場合にのみ前記薬液を投与する、
ことを特徴とする薬液投与による痛みの評価方法。

[請求項11] 請求項1～10のいずれか1項に記載の薬液投与による痛みの評価方法において、
前記測定電極(24)として双極電極を用い、前記実験動物の胸部皮膚(12c)に基準電極(26)を貼付する、
ことを特徴とする薬液投与による痛みの評価方法。

[請求項12] 身体の所定部位と、前記所定部位に刺激を与えた際に脊髄反射によって屈曲する骨格筋とを有する哺乳類の実験動物を準備する準備ステップと、

前記実験動物を吸入麻酔にて麻酔する麻酔ステップと、

麻酔された前記実験動物の前記骨格筋に測定電極（24）を留置する測定電極留置ステップと、

前記骨格筋の筋電位を前記測定電極（24）で測定しながら、麻酔された前記実験動物の前記所定部位に注射針（18）を穿刺する穿刺ステップと、

前記注射針（18）の穿刺による筋電反応が消えた後に、麻酔された前記実験動物に前記注射針（18）を介して薬液を投与する投与ステップと、

前記薬液の投与による筋電反応が生じてから消えるまでの前記筋電位の絶対値を積分したEMG強度の測定、及び前記薬液の投与による前記筋電反応の持続時間の測定の少なくとも一方を行う測定ステップと、を含み、

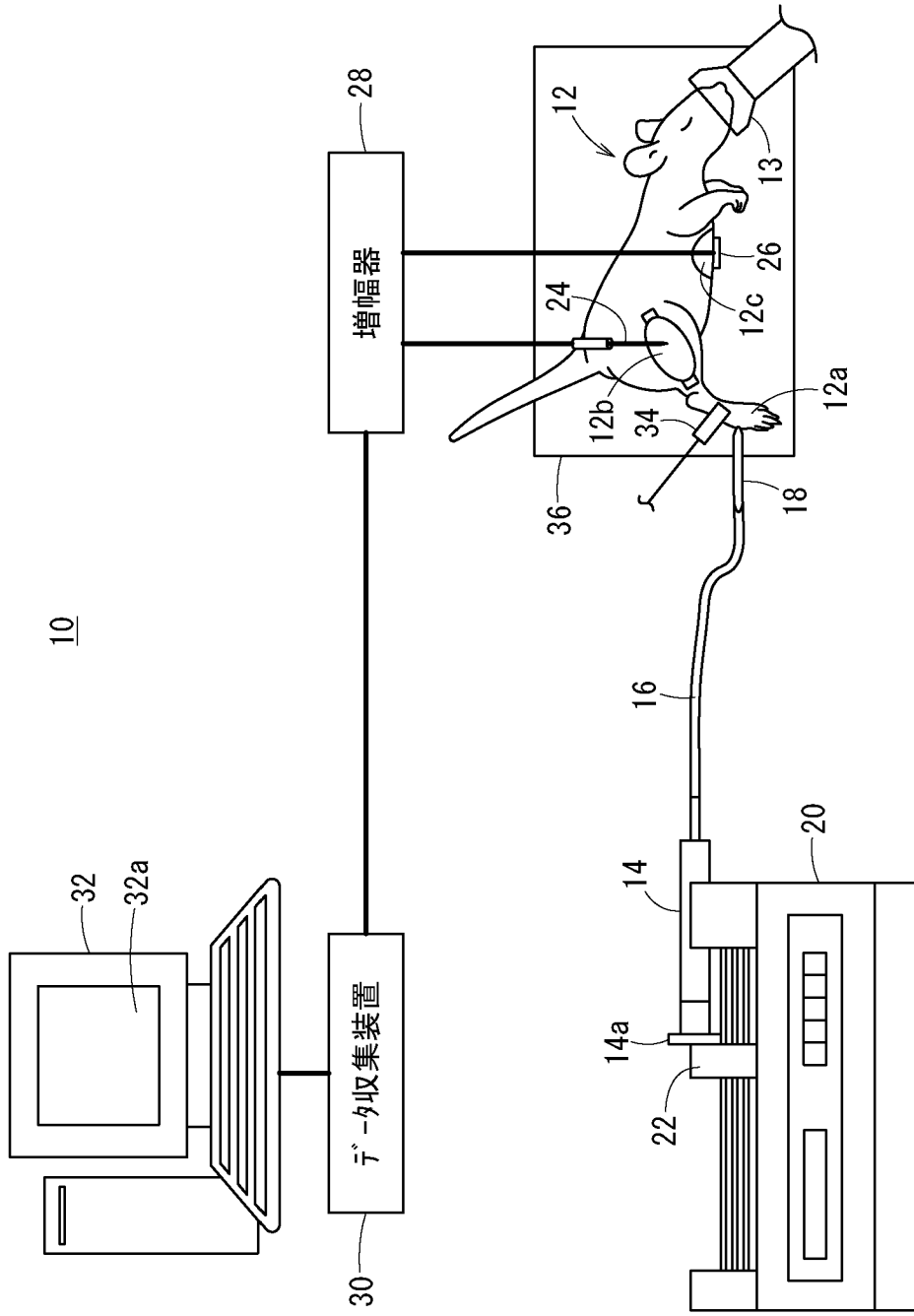
組成の異なる複数の薬液毎に、又は複数の投与条件毎に、前記穿刺ステップ、前記投与ステップ及び前記測定ステップを行い、

さらに、組成の異なる前記複数の薬液のうち、前記持続時間が最も短い、あるいは前記EMG強度が最も小さい薬液組成、又は前記複数の投与条件のうち、前記持続時間が最も短い、あるいは前記EMG強度が最も小さい投与条件を特定する特定ステップを含む、

ことを特徴とする薬液投与の選定方法。

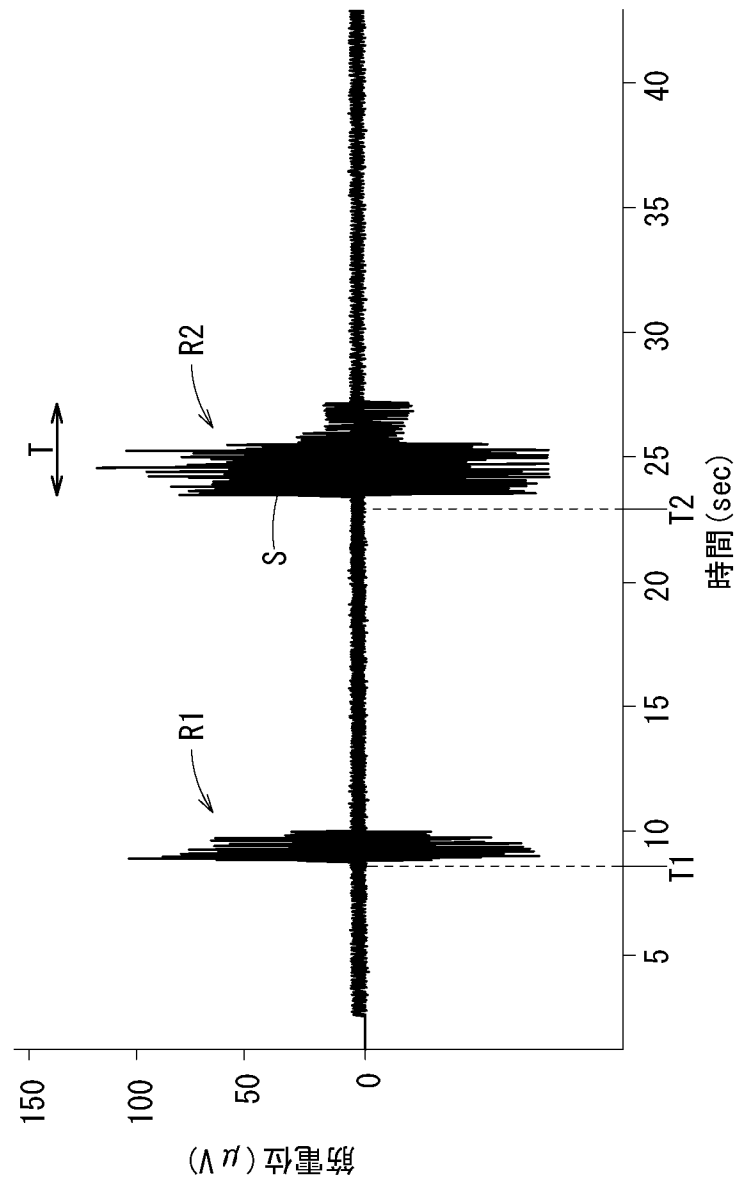
[図1]

FIG. 1



[図2]

FIG. 2



[図3]

FIG. 3A

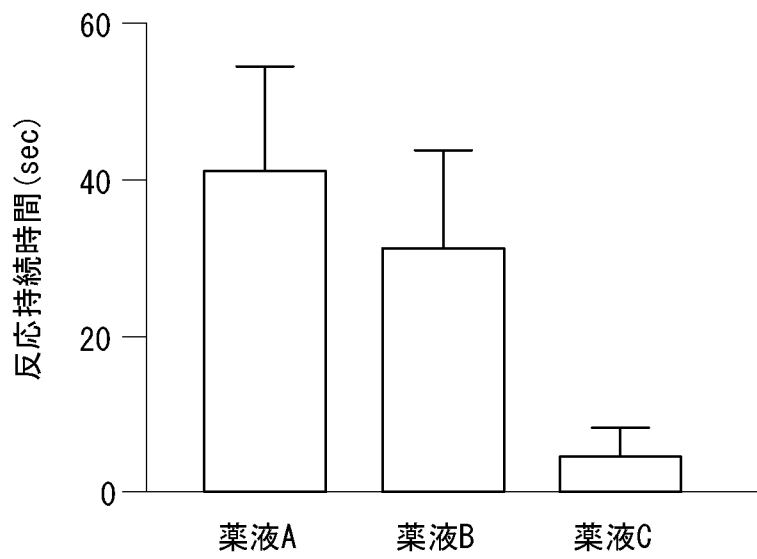
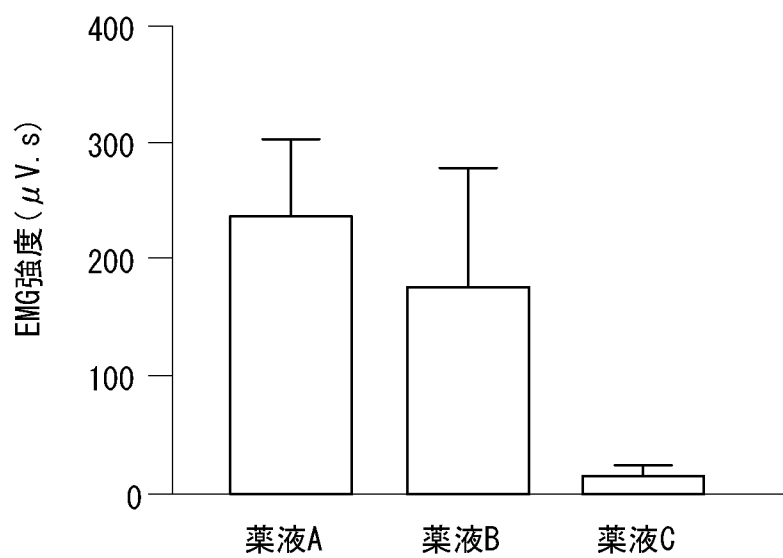
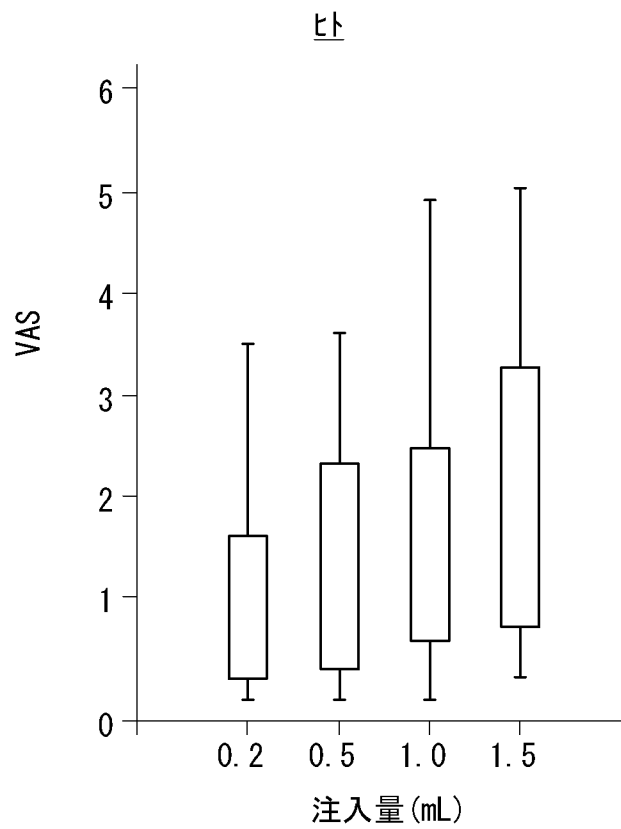


FIG. 3B



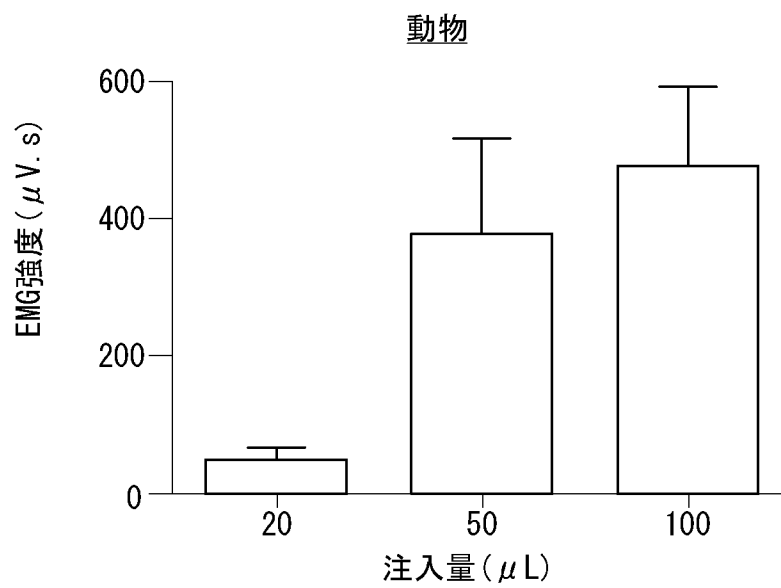
[図4]

FIG. 4A



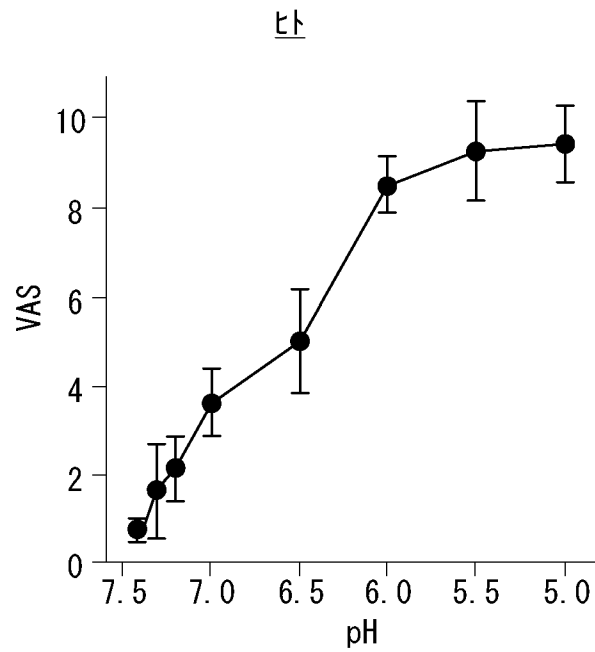
Jørgensen JT et al; Ann Pharmacother 30:729-732, 1996

FIG. 4B



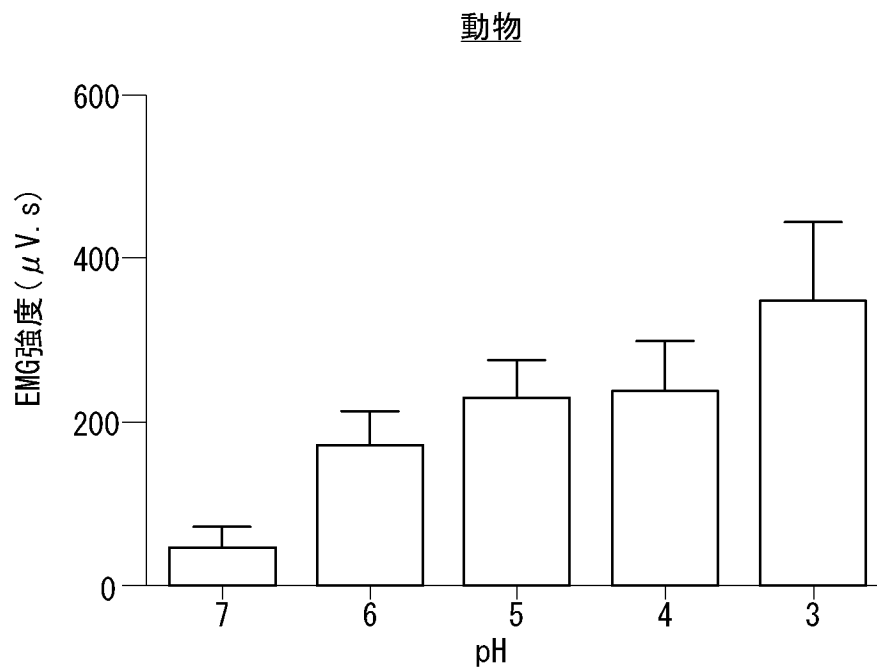
[図5]

FIG. 5A



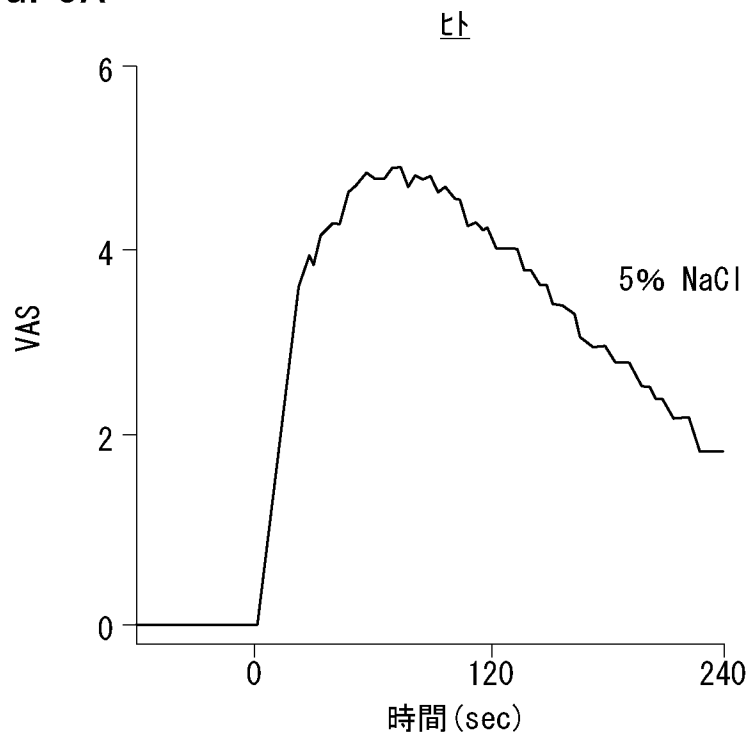
Ugawa, S et al; J Clin Invest 110:1185-1190, 2002

FIG. 5B



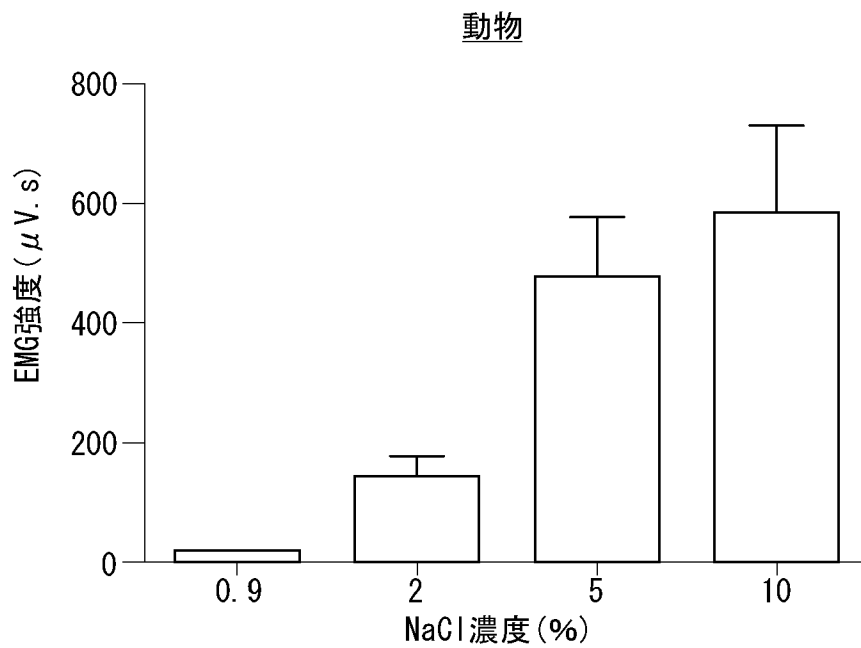
[図6]

FIG. 6A



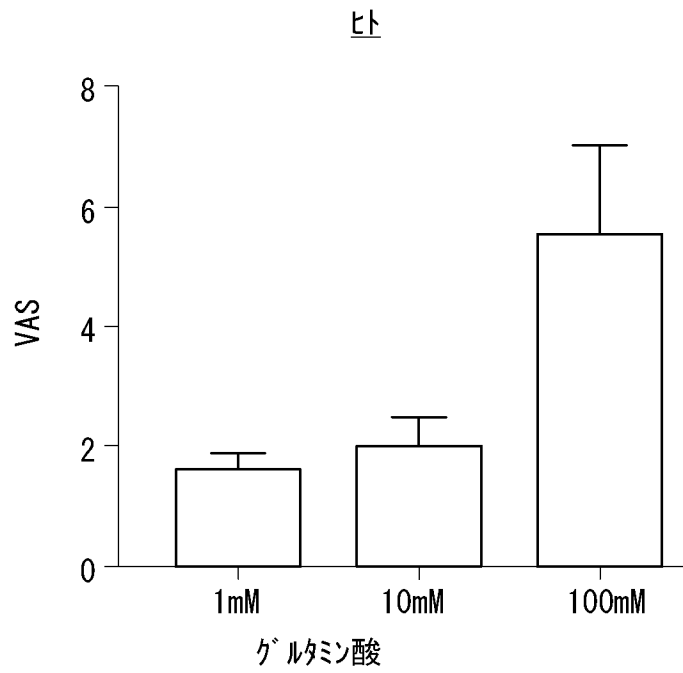
Henderson LA et al; Pain 120:286-296, 2006

FIG. 6B



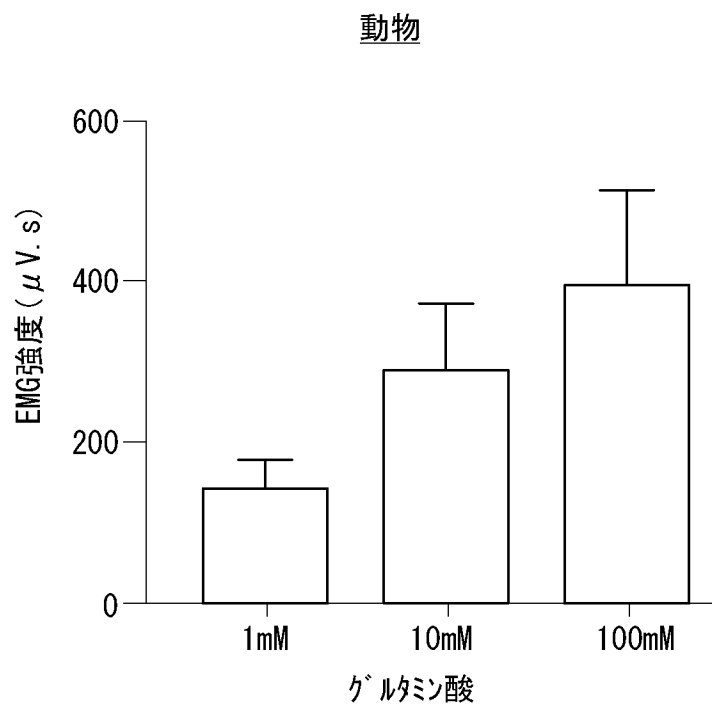
[図7]

FIG. 7A



Gazerani P et al; Pain 124:338-348, 2006

FIG. 7B



[図8]

FIG. 8A

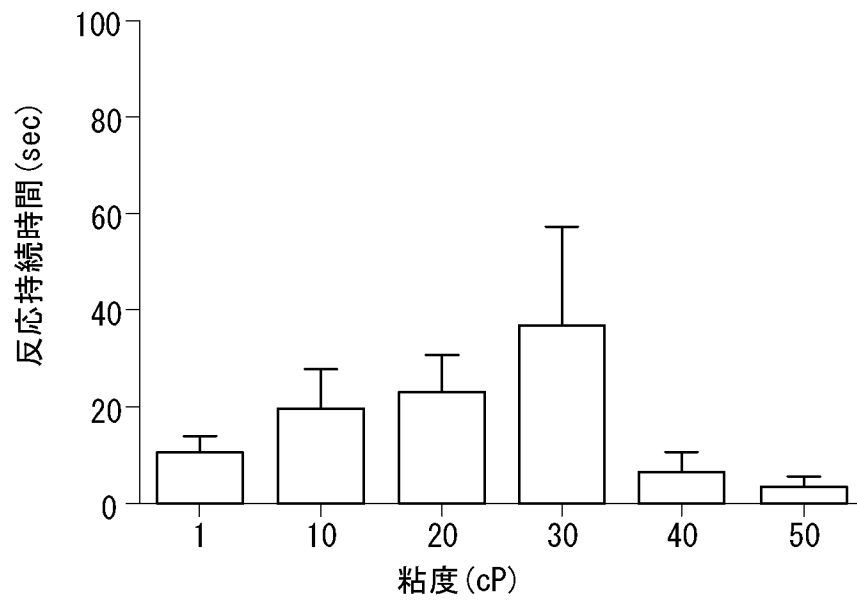
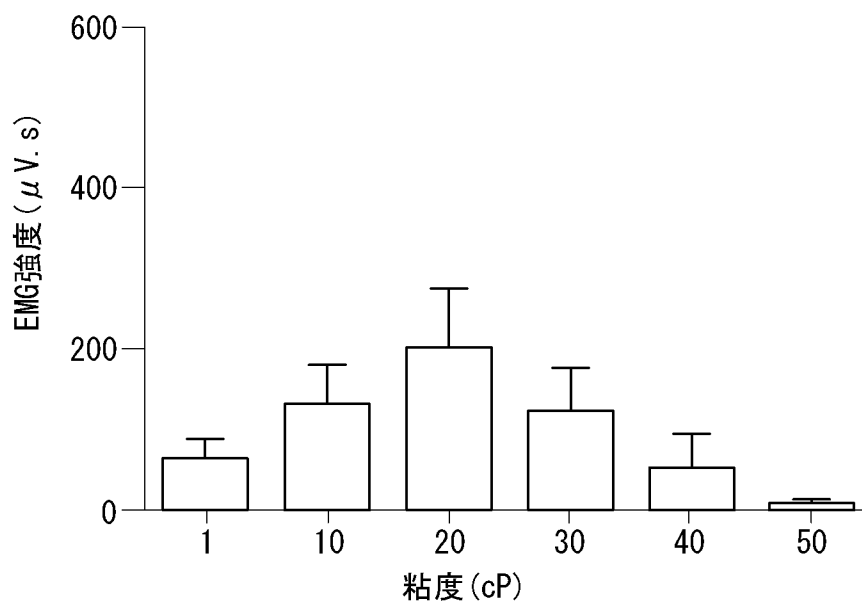


FIG. 8B



[図9]

FIG. 9A

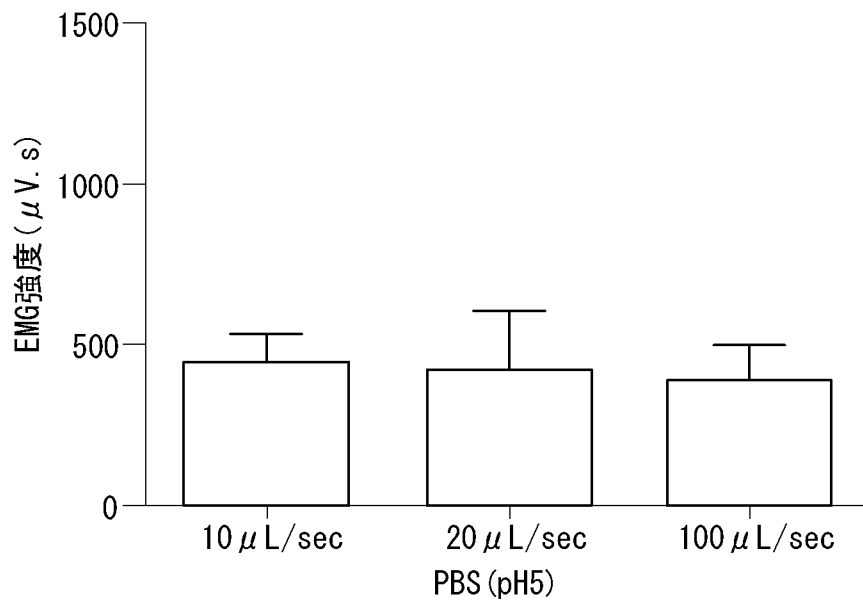
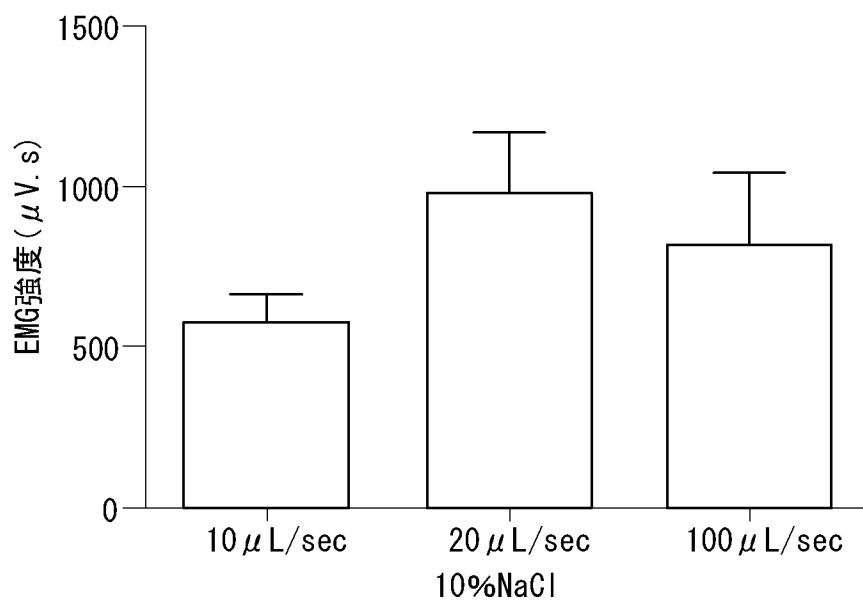
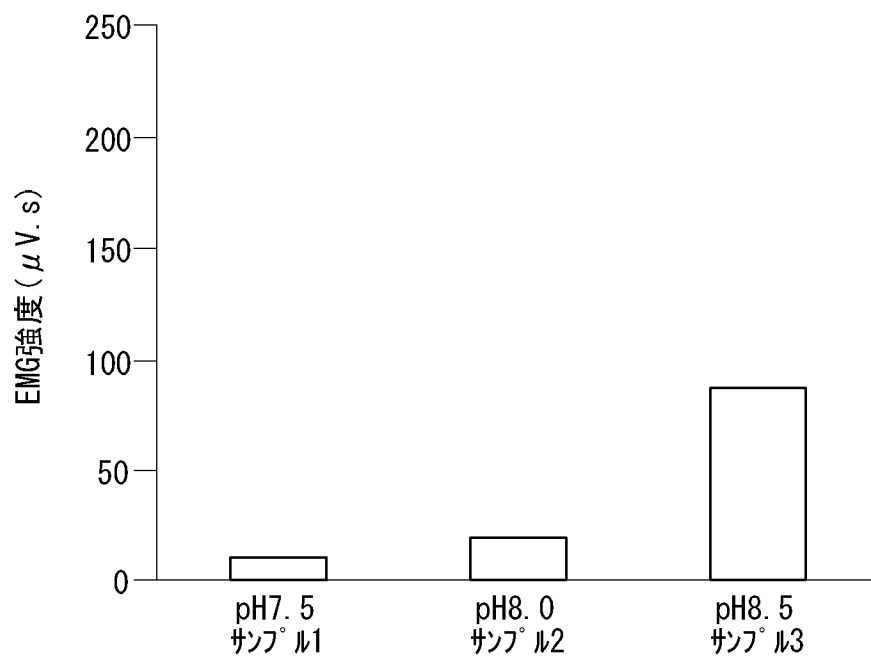


FIG. 9B



[図10]

FIG. 10



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2016/056741

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

G01N33/483(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

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	1996-2016
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2016	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2016

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII), PubMed

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	OKAMOTO, K. et al., Assessment of needle insertion pain with flexor reflex responses in anesthetized rats, PAIN RESEARCH, 2012, Vol.27/No.4, pp.215-225	1-12
Y	ANDO, R. & WATANABE, C., Characteristics of propofol-evoked vascular pain in anaesthetized rats, British Journal of Anaesthesia, 2005.07.01, Vol.95/No.3, pp.384-392	1-12
A	MASAUMI, S. & SENBA, E., Nitric oxide involvement in lipid emulsion-induced vascular pain in anesthetized rats, European Journal of Pharmacology, 2008.07.15, Vol.594, pp.64-69	1-12

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ 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
25 April 2016 (25.04.16)

Date of mailing of the international search report
10 May 2016 (10.05.16)

Name and mailing address of the ISA/
Japan Patent Office
3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku,
Tokyo 100-8915, Japan

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2016/056741

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2013/141351 A1 (Terumo Corp.), 26 September 2013 (26.09.2013), & EP 2829291 A1 & US 2015151048 A1	1-12

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

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

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

日本国実用新案公報	1922-1996年
日本国公開実用新案公報	1971-2016年
日本国実用新案登録公報	1996-2016年
日本国登録実用新案公報	1994-2016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 (JDreamIII)
PubMed

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
Y	OKAMOTO, K. et al., Assessment of needle insertion pain with flexor reflex responses in anesthetized rats, PAIN RESEARCH, 2012, Vol.27/No.4, pp.215-225	1-12
Y	ANDO, R. & WATANABE, C., Characteristics of propofol-evoked vascular pain in anaesthetized rats, British Journal of Anaesthesia, 2005.07.01, Vol.95/No.3, pp.384-392	1-12

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ 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

- | | |
|--|---|
| 「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

25.04.2016

国際調査報告の発送日

10.05.2016

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)

萩田 裕介

2 J

5704

電話番号 03-3581-1101 内線 3252

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
A	MASAUMI, S. & SENBA, E., Nitric oxide involvement in lipid emulsion-induced vascular pain in anesthetized rats, European Journal of Pharmacology, 2008.07.15, Vol.594, pp.64-69	1-12
A	WO 2013/141351 A1 (テルモ株式会社) 2013.09.26, & EP 2829291 A1 & US 2015151048 A1	1-12