明　細　書

発明の名称 ： 関節症治療剤

技術分野

[0001] 本発明は、環状ホスファチジン酸又はカルバ環状ホスファチジン酸を有効成分とする関節症治療剤に関する。

背景技術

[0002] 関節症には、変形性関節症、関節リウマチ、リウマチ熱などがあり、なかでも変形性関節症及び関節リウマチは患者数が多く、主要な関節症と考えられている。変形性関節症には、先天性あるいは二次性のものと、老化による関節軟骨の変形による一次性のものとがあり、一次性の変形性関節症は、老齢者人口の増加に伴い増加の傾向にある。変形性関節症と関節リウマチでは、病因、病態に大きな違いがあるが、何れも最終的には、関節軟骨の破壊により関節機能が阻害される点では共通している。変形性関節症などのリウマチ性疾患に対する従来の治療薬は、アスピリン、インドメタシンなどの鎮痛抗炎症剤であるが、これらの鎮痛抗炎症剤は、関節軟骨の破壊に対して抑制作用はなく、金製剤、免疫抑制剤、ステロイド剤などの治療薬にも、関節軟骨の破壊抑制作用は臨床的には認められていない。

[0003] 関節軟骨は軟骨細胞と軟骨マトリックスから構成されており、軟骨マトリックスは、軟骨細胞が産生する繊維性タンパク質であるコラーゲンと、プロテオグリカン(タンパク多糖複合体)がヒアルロン酸と結合し、高度な三次元構造を形成したマトリックスであつて、その中に多量の水分を保持することにより、正常な関節機能が維持されている。

[0004] 上記治療薬とは異なる変形性関節症の治療剤として、関節軟骨の保護および修復作用、関節内の潤滑作用が認められているヒアルロン酸の関節内注射が臨床適用されているが、侵襲性もあり、患者のＱＯＬは充分とはいえないのが現状である。

発明の概要

発明が解決しようとする課題

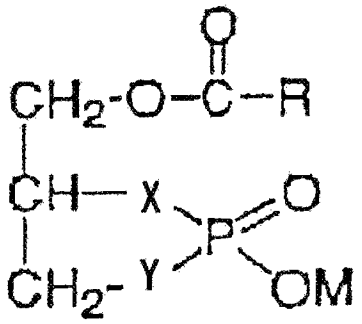
[0005] 本発明は、関節軟骨の破壊に対して抑制作用を有し、治療効果の高い関節症治療剤を提供することを課題とする。

課題を解決するための手段

[0006] 本発明者らは、関節軟骨細胞においてもヒアルロン酸産生を促進することで、関節軟骨の破壊を抑制できれば、変形性関節症などの有力な治療剤になり得ると考え検討した結果、変形性関節症患者由来の軟骨細胞において、環状ホスフアチジン酸及びその誘導体が、細胞内のヒアルロン酸産生を顕著に促進し、変形関節症モデル動物においても効果が認められることを見出し、本発明を完成するに至った。

[0007] すなわち、本発明によれば、下記式（１）で示される化合物を有効成分として含有する関節症治療剤が提供される。

[0008] [化1]



（1）

[0009] （式中、Ｒは、炭素数１～３０の直鎖状若しくは分岐状アルキル基、炭素数２～３０の直鎖状若しくは分岐状アルケニル基、又は炭素数２～３０の直鎖状若しくは分岐状アルキニル基であり、これらの基はシクロアルカン環又は芳香環を含んでいてもよい。Ｘ及びＹはそれぞれ独立に、酸素原子、又はメチレン基を示すが、Ｘ及びＹが同時にメチレン基になることはない。Ｍは、水素原子又はアルカリ金属原子である。）

[0010] 好ましくは、式（１）において、Ｘ及びＹが酸素原子である。

好ましくは、式（１）において、Ｘ又はＹの一方が酸素原子であり、他方がメチレン基である。

好ましくは、式（１）で示される化合物は、１－オレオイル環状ホスファチジン酸又は１－パルミトオレオイル環状ホスファチジン酸及びそれらの誘導体のカルバ環状ホスファチジン酸である。

[0011] 本発明によればさらに、上記式（１）で示される化合物を、関節症を伴う患者に投与することを含む、関節症の治療方法が提供される。

[0012] 本発明によればさらに、関節症の治療剤の製造のための、上記式（１）で示される化合物の使用が提供される。

発明の効果

[0013] 本発明によれば、関節軟骨の破壊を抑制し、治療効果の高い関節症治療剤を提供することができる。

図面の簡単な説明

[0014] [図1]図１は、変形性関節症患者由来の軟骨細胞における、ヒアルロン酸合成酵素遺伝子（ＨＡＳ１）の発現に対する環状ホスファチジン酸誘導体の作用を調べた結果を示す。

[図2]図２は、変形性関節症患者由来の軟骨細胞における、ヒアルロン酸合成酵素遺伝子（ＨＡＳ２）の発現に対する環状ホスファチジン酸誘導体の作用を調べた結果を示す。

[図3]図３は、変形性関節症患者由来の軟骨細胞における、ヒアルロン酸合成酵素遺伝子（ＨＡＳ３）の発現に対する環状ホスファチジン酸誘導体の作用を調べた結果を示す。

[図4]図４は、変形性関節症患者由来の軟骨細胞における、ヒアルロン酸分解酵素遺伝子（ＨＹＡＬ１）の発現に対する環状ホスファチジン酸誘導体の作用を調べた結果を示す。

[図5]図５は、変形性関節症患者由来の軟骨細胞における、ヒアルロン酸分解酵素遺伝子（ＨＹＡＬ２）の発現に対する環状ホスファチジン酸誘導体の作用を調べた結果を示す。

[図6]図６は、変形性関節症患者由来の軟骨細胞における、ヒアルロン酸産生に対する環状ホスファチジン酸誘導体の作用を調べた結果を示す。

[図7]図７は、変形性関節症患者由来の滑膜細胞における、ヒアルロン酸合成酵素遺伝子（ＨＡＳ１、ＨＡＳ２、ＨＡＳ３）の発現に対する環状ホスファチジン酸誘導体（試験化合物：ＳｃＰＡ）の作用を調べた結果を示す。

[図8]図８は、変形性関節症患者由来の滑膜細胞における、ヒアルロン酸分解酵素遺伝子（ＨＹＡＬ１、ＨＹＡＬ２）の発現に対する環状ホスファチジン酸誘導体の作用を調べた結果を示す。

[図9]図９は、疼痛評価(両後肢重量配分比)の推移を示す。平均値±標準誤差　n=6 、 第１群(媒体投与群)と比較して*,**；p＜0.05,p＜0.01で有意(Studentのt検定、Aspin-Welchのt検定)

[図10]図１０は、腫脹評価(両後肢関節腫脹比)の結果を示す。平均値±標準誤差　n=6　第１群(媒体投与群)と比較して*,**；p＜0.05,p＜0.01で有意(Studentのt検定・Aspin-Welchのt検定)

[図11]図１１は、大腿骨顆および脛骨顆の病理組織学評点を示す。

[図12]図１２は、代表例の病理組織画像を示す。Ａは媒体投与群（動物番号１０１）、右大腿骨内側　ＨＥ染色×２００　関節軟骨部　軟骨細胞の配列不整（矢印）、房状集簇形成（矢印）が認められる。Ｂは被験物質投与群（動物番号２０１）、右大腿骨内側　ＨＥ染色×２００　関節軟骨部　軟骨びらん（極軽度）を示す。Ｃは媒体投与群（動物番号１０１）、右大腿骨内側　ＳＯ染色×２００　関節軟骨部　プロテオグリカンの染色性低下（極軽度）を示す。Ｄは被験物質投与群（動物番号２０１）、右大腿骨内側　ＳＯ染色×２００　関節軟骨部　変化は認められない。

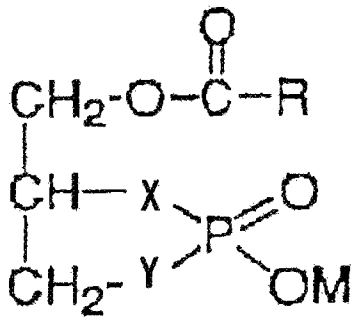
発明を実施するための形態

[0015] 以下、本発明について更に具体的に説明する。

本発明の関節症治療剤は、変形性関節症、関節リウマチ、リウマチ熱などの（特には、変形性関節症）の関節症の治療のために使用することができ、環状ホスファチジン酸又はカルバ環状ホスファチジン酸又はそれらの塩を有効成分として含む。環状ホスファチジン酸又はカルバ環状ホスファチジン酸又はその塩としては本発明の効果を示すものであれば特に限定されないが、

好ましくは、下記式（Ｉ）で示される化合物を使用することができる。

[0016] [化2]



（1）

[0017] （式中、Ｒは、炭素数１～３０の直鎖状若しくは分岐状アルキル基、炭素数２～３０の直鎖状若しくは分岐状アルケニル基、又は炭素数２～３０の直鎖状若しくは分岐状アルキニル基であり、これらの基はシクロアルカン環又は芳香環を含んでいてもよい。Ｘ及びＹはそれぞれ独立に、酸素原子、又はメチレン基を示すが、Ｘ及びＹが同時にメチレン基になることはない。Ｍは、水素原子又はアルカリ金属原子である。）

[0018] 式（Ｉ）において、置換基Ｒが示す炭素数1～30の直鎖状若しくは分岐状アルキル基の具体例としては、例えば、メチル基、エチル基、プロピル基、ブチル基、ペンチル基、ヘキシル基、ヘプチル基、オクチル基、ノニル基、デシル基、ウンデシル基、ドデシル基、トリデシル基、テトラデシル基、ペンタデシル基、ヘキサデシル基、ヘプタデシル基、オクタデシル基、ノナデシル基、エイコシル基などが挙げられる。

[0019] 置換基Ｒが示す炭素数２～３０の直鎖状若しくは分岐状アルケニル基の具体例としては、例えば、アリル基、ブテニル基、オクテニル基、デセニル基、ドデカジエニル基、ヘキサデカトリエニル基などが挙げられ、より具体的には、８－デセニル基、８－ウンデセニル基、８－ドデセニル基、８－トリデセニル基、８－テトラデセニル基、８－ペンタデセニル基、８－ヘキサデセニル基、８－ヘプタデセニル基、８－オクタデセニル基、８－イコセニル基、８－ドコセニル基、ヘプタデカ－８，１１－ジエニル基、ヘプタデカ－８，１１，１４－トリエニル基、ノナデカ－４，７，１０，１３－テトラエ

ニル基、ノナデカー４，７，１０，１３，１６ーペンタエニル基、ヘニコサー３，６，９，１２，１５，１８ーヘキサエニル基などが挙げられる。

[0020] 置換基Ｒが示す炭素数2～30の直鎖状若しくは分岐状アルキニル基の具体例としては、例えば、８ーデシニル基、８ーウンデシニル基、８ードデシニル基、８ートリデシニル基、８ーテトラデシニル基、８ーペンタデシニル基、８ーヘキサデシニル基、８ーヘプタデシニル基、８ーオクタデシニル基、８ーイコシニル基、８ードコシニル基、ヘプタデカー８，１１ージイニル基などが挙げられる。

[0021] 上記のアルキル基、アルケニル基又はアルキニル基に含有されうるシクロアルカン環の具体例としては、例えば、シクロプロパン環、シクロブタン環、シクロペンタン環、シクロヘキサン環、シクロオクタン環などが挙げられる。シクロアルカン環は、1個以上のヘテロ原子を含んでいてもよく、そのような例としては、例えば、オキシラン環、オキセタン環、テトラヒドロフラン環、Ｎーメチルプロリジン環などが挙げられる。

[0022] 上記のアルキル基、アルケニル基又はアルキニル基に含有されうる芳香環の具体例としては、例えば、ベンゼン環、ナフタレン環、ピリジン環、フラン環、チオフェン環などが挙げられる。

[0023] 従って、置換基Ｒがシクロアルカン環によって置換されたアルキル基である場合の具体例としては、例えば、シクロプロピルメチル基、シクロヘキシルエチル基、８，９ーメタノペンタデシル基などが挙げられる。

[0024] 置換基Ｒが芳香環によって置換されたアルキル基である場合の具体例としては、ベンジル基、フェネチル基、ｐーペンチルフェニルオクチル基などが挙げられる。

[0025] Ｒは、好ましくは、炭素数９～１７の直鎖状若しくは分岐状アルキル基、炭素数９～１７の直鎖状若しくは分岐状アルケニル基、又は炭素数９～１７の直鎖状若しくは分岐状アルキニル基である。Ｒは、さらに好ましくは、炭素数９、１１、１３、１５又は１７の直鎖状若しくは分岐状アルキル基、又は炭素数９、１１、１３、１５又は１７の直鎖状若しくは分岐状アルケニル

基である。Ｒは、特に好ましくは、炭素数９、１１、１３、１５又は１７の直鎖状若しくは分岐状アルケニル基である。

[0026] 一般式(１)で示される化合物中のＸ及びＹはそれぞれ独立に、酸素原子（－Ｏ－）又はメチレン基（－CH_2－）を示すが、Ｘ及びＹが同時にメチレン基になることはない。即ち、Ｘ及びＹの組み合わせは以下の３通りである。

（１）Ｘが酸素原子であり、Ｙが酸素原子である。

（２）Ｘが酸素原子であり、Ｙがメチレン基である。

（３）Ｘがメチレン基であり、Ｙが酸素原子である。

[0027] 式（Ｉ）で示される環状ホスファチジン酸誘導体中のＭは、水素原子又はアルカリ金属原子である。アルカリ金属原子としては、例えば、リチウム、ナトリウム、カリウムなどが挙げられ、ナトリウムが特に好ましい。

[0028] 本発明で用いられる式（１）で示される化合物の具体例としては、１位アシル基として、Ｒが炭素原子数１７のアルケニル基であるオレオイル基（Ｃ１８：１と略す）、 Ｒが炭素原子数１５のアルケニル基であるパルミトオレオイル基（Ｃ１６：１と略す）を有する環状ホスファチジン酸及びカルバ環状ホスファチジン酸誘導体が特に好ましい。

[0029] 式（Ｉ）の化合物はその置換基の種類に応じて、位置異性体、幾何異性体、互変異性体、又は光学異性体のような異性体が存在する場合があるが、全ての可能な異性体、並びに２種類以上の該異性体を任意の比率で含む混合物も本発明の範囲内のものである。

[0030] また、式（Ｉ）の化合物は、水あるいは各種溶媒との付加物（水和物又は溶媒和物）の形で存在することもあるが、これらの付加物も本発明の範囲内のものである。さらに、式（Ｉ）の化合物及びその塩の任意の結晶形も本発明の範囲内のものである。

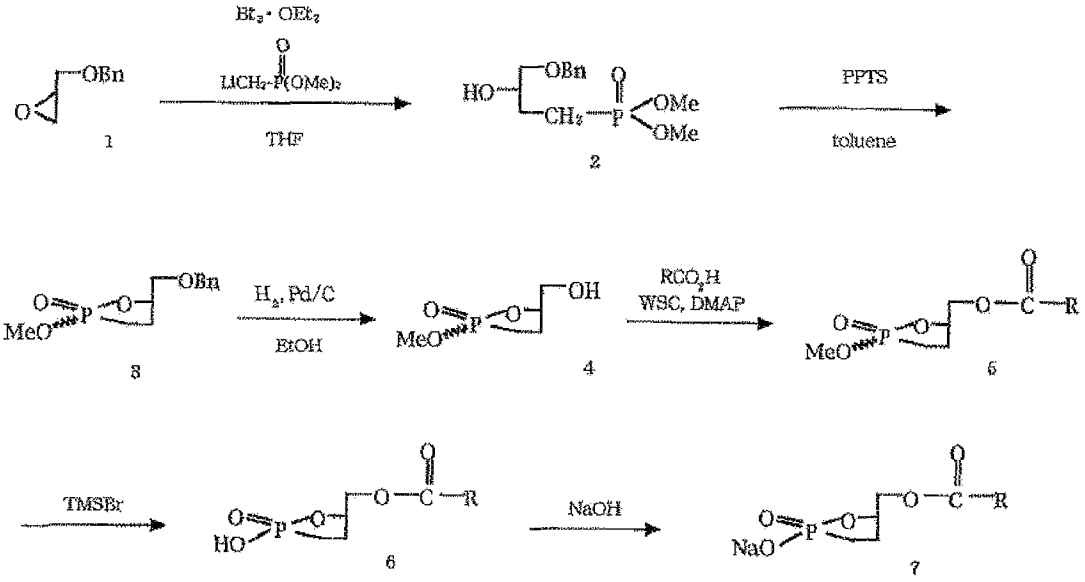
[0031] 一般式(１)で示される化合物のうちＸ及びＹが酸素原子である化合物は、例えば、特開平５－２３００８８号公報、特開平７－１４９７７２号公報、特開平７－２５８２７８号公報、特開平９－２５２３５号公報に記載の方法等に準じて化学的に合成することができる。

[0032] また、一般式(１)で示される化合物のうちＸ及びＹが酸素原子である化合物は、特開２００１－１７８４８９号公報に記載の方法に準じてリゾ型リン脂質にホスホリパーゼＤを作用させることによって合成することもできる。ここで用いるリゾ型リン脂質は、ホスホリパーゼＤを作用しうるリゾ型リン脂質であれば特に限定されない。リゾ型リン脂質は多くの種類が知られており、脂肪酸種が異なるもの、エーテル又はビニルエーテル結合をもった分子種などが知られており、これらは市販品として入手可能である。ホスホリパーゼＤとしては、キャベツや落花生などの高等植物由来のものやStreptomyces chromofuscus, Actinomadula sp.などの微生物由来のものが市販試薬として入手可能であるが、Actinomadula sp. No.362由来の酵素によって極めて選択的に環状ホスファチジン酸が合成される（特開平１１－３６７０３２号明細書）。リゾ型リン脂質とホスホリパーゼＤとの反応は、酵素が活性を発現できる条件であれば特に限定されないが、例えば、塩化カルシウムを含有する酢酸緩衝液（ｐＨ５～６程度）中で室温から加温下（好ましくは３７℃程度）で１から５時間程度反応させることにより行う。生成した環状ホスファチジン酸誘導体は、常法に準じて、抽出、カラムクロマトグラフィー、薄層クロマトグラフィー（ＴＬＣ）などにより精製することができる。

[0033] また、 一般式(１)で示される化合物のうちＸが酸素原子であり、Ｙがメチレン基である化合物は、文献記載の方法（Ｋｏｂａｙａｓｈｉ，Ｓ．，他，Ｔｅｔｒａｈｅｄｒｏｎ Ｌｅｔｔｅｒｓ ３４，４０４７－４０５０（１９９３））に準じて合成することができ、また国際公開ＷＯ２００２／０９４２８６号公報に記載の方法により合成することができる。具体的な合成経路の一例を以下に示す。

[0034]

[化3]



[0035] 上記においては、先ず、市販の(R)-ベンジルグリシジルエーテル(1)をBF_3・Et_2Oで活性化させ、メチルホスホン酸ジメチルエステルにn-BuLiを作用させて得られるリチオ体を反応させることでアルコール(2)を得る。

得られたアルコールを、トルエン中で過剰のp-トルエンスルホン酸のピリジニウム塩を用いて80℃で反応させることにより、環化体(3)を得る。この環化体を、水素雰囲気下で20% $Pd(OH)_2$-Cを用いて加水素分解し、脱ベンジル化を行う(4)。縮合剤として1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド塩酸塩を用いて、脂肪酸と反応させてカップリング体(5)を得る。次に、求核剤としてブロモトリメチルシランを用いて、メチル基だけを位置選択的に除去し、環状ホスホン酸(6)を得る。これをエーテルを用いて分液ロートに移しこみ、少量の0.02Nの水酸化ナトリウム水溶液を滴下して、分液操作を行い、ナトリウム塩(7)として目的化合物を抽出、精製する。

[0036] また、一般式(１)で示される化合物のうちＸがメチレン基であり、Ｙが酸素原子である化合物は、特開２００４－０１０５８２号公報又は国際公開Ｗ００３／１０４２４６号公報に記載の方法により合成することができる。

[0037] 本発明の関節症治療剤は、１又は２以上の製剤学的に許容される製剤用添加物と有効成分である式（１）で示される化合物とを含む医薬組成物の形態

で提供することが好ましい。

[0038] 本発明の関節症治療剤は、種々の形態で投与することができるが、好適な投与形態としては、経口投与でも非経口投与（例えば、静脈内、筋肉内、皮下又は皮内等への注射、直腸内投与、経粘膜投与など）でもよい。経口投与に適する医薬組成物としては、例えば、錠剤、顆粒剤、カプセル剤、散剤、溶液剤、懸濁剤、シロップ剤などを挙げることができ、非経口投与に適する医薬組成物としては、例えば、注射剤、点滴剤、坐剤、経皮吸収剤などを挙げることができるが、本発明の薬剤の剤形はこれらに限定されることはない。さらに、公知の技術によって持続性製剤とすることもできる。

[0039] 本発明の関節症治療剤の製造に用いられる製剤用添加物の種類は特に限定されず、当業者が適宜選択可能である。例えば、賦形剤、崩壊剤又は崩壊補助剤、結合剤、滑沢剤、コーティング剤、基剤、溶解剤又は溶解補助剤、分散剤、懸濁剤、乳化剤、緩衝剤、抗酸化剤、防腐剤、等張化剤、pH調節剤、溶解剤、安定化剤などを用いることができ、これらの目的で使用される個々の具体的成分は当業者に周知されている。

[0040] 経口投与用の製剤の調製に用いることができる製剤用添加物として、例えば、ブドウ糖、乳糖、D-マンニトール、デンプン、又は結晶セルロース等の賦形剤；カルボキシメチルセルロース、デンプン、又はカルボキシメチルセルロースカルシウム等の崩壊剤又は崩壊補助剤；ヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、ポリビニルピロリドン、又はゼラチン等の結合剤；ステアリン酸マグネシウム又はタルク等の滑沢剤；ヒドロキシプロピルメチルセルロース、白糖、ポリエチレングリコール又は酸化チタン等のコーティング剤；ワセリン、流動パラフィン、ポリエチレングリコール、ゼラチン、カオリン、グリセリン、精製水、又はハードファット等の基剤を用いることができる。

[0041] 注射あるいは点滴用の製剤の調製に用いることができる製剤用添加物としては、注射用蒸留水、生理食塩水、プロピレングリコール、界面活性剤等の水性あるいは用時溶解型注射剤を構成しうる溶解剤又は溶解補助剤；ブドウ

糖、塩化ナトリウム、D-マンニトール、グリセリン,等の等張化剤；無機酸、有機酸、無機塩基又は有機塩基等のpH調節剤等の製剤用添加物を用いることができる。

[0042] 本発明の関節症治療剤はヒトなどの哺乳動物に投与することができる。

本発明の関節症治療剤の投与量は患者の年齢、性別、体重、症状、及び投与経路などの条件に応じて適宜増減されるべきであるが、一般的には、成人一日あたりの有効成分の量として１μg／ｋｇから１，０００ｍｇ／ｋｇ程度の範囲であり、好ましくは１０μｇ／ｋｇから１００ｍｇ／ｋｇ程度の範囲である。上記投与量の薬剤は一日一回に投与してもよいし、数回（例えば、２～４回程度）に分けて投与してもよい。

[0043] 以下の実施例により本発明を具体的に説明するが、本発明は実施例によって限定されることはない。

実施例

[0044] 実施例１：

（１）方法

（１－１）関節軟骨細胞及び滑膜細胞の培養

変形性膝関節症の患者より人工膝関節置換術時に除去採取した関節硝子軟骨を用いた。関節軟骨片は洗浄後、プロナーゼ・コラゲナーゼ酵素処理により軟骨基質を分解、細胞を採取し培養、凍結保存した。また、滑膜細胞も採取した。本実施例ではそのような変形性関節症患者の関節軟骨細胞及び滑膜細胞を用い、形質変化を避けるために単層高密度にて培養し実験に用いた。培地はDMEM + 10%FBS+1%antibiotics/antifungusを用い、confluent後無血清培地に代え、実験を開始した。

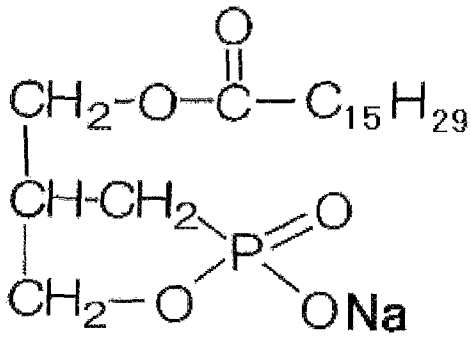
[0045] （１－２）環状ホスファチジン酸又はカルバ環状ホスファチジン酸（cPA）の添加

環状ホスファチジン酸又はカルバ環状ホスファチジン酸は、C16:1-cPA（cPA)および、native cPA(NcPA)を用いそれぞれ、濃度（０～５０ｎＭ）,時間(０～４８時間)にて、ヒアルロン酸（HA）産生、ヒアルロン酸（HA）合成酵素

(HAS1、HAS2及びHAS3)の発現、及びヒアルロン酸（HA）分解酵素（HYAL1及びHYAL2）について検討した。

[0046] C16:1-cPA（図中では、「cPA」と表記する)の化学構造は以下の通りである。

[化4]



[0047] また、native cPA(図中では、NcPAと表記する)は、以下の通り調製したものである（特願２０１１－１２６９０１の実施例１及び３を参照）。

大豆リン脂質（レシチン含量：７０％）１０ｇを０．３M塩化カルシウムを含有する１００ｍｌの１M酢酸バッファー（ｐＨ６．５）で溶解させた後、６０００単位のストレプトマイセス属由来のホスホリパーゼA2を添加し、４０℃で１８時間攪拌して反応させた。反応液をpＨ２．５に調整して酵素を失活させた後、１００ｍｌのクロロホルム、５０ｍｌのメタノールを添加して十分攪拌混合し脂質成分を抽出した。クロロホルム層を集め、ロータリーエバポレータで減圧乾固させた。固形分に１００ｍｌのアセトンを加えリン脂質を沈殿させ遊離脂肪酸を除去した。沈殿物５gを４０ｍｌのクロロホルムに溶解させ、１M酢酸バッファー（pＨ５．５）１０ｍｌを加え、更に１５００単位のアクチノマジュラ属由来のホスホリパーゼDを添加して４０℃で１８時間攪拌しながら反応を行った。反応液に２０ｍｌの３M塩化ナトリウム、２０ｍｌの０．１M　EDTA溶液を添加して４０℃で１時間攪拌を行った。更に２０ｍｌのメタノールを添加して十分攪拌した後、３０００回転、５分間遠心分離してクロロホルム層を集めた。この溶液をロータリーエバポレータで減圧乾固させ環状ホスファチジン酸ナトリウム塩３．８ｇを得た。収率はレシチン

含量７０％（１０g中７ｇ）から環状ホスファチジン酸Naを３．８ｇを得たので５４．３％であった。環状ホスファチジン酸ナトリウム塩の純度分析は、シリカゲルプレートを用い、クロロホルム：メタノール：酢酸：５％二亜硫酸ナトリウム（１００：４０：１２：５、V/V）で展開後、５％酢酸銅：８％燐酸：２％硫酸混合液に短時間浸漬し風乾後、１８０℃で約１０分加熱した後、生成したスポットをスキャナー（アトー社製）法によって行った。即ち、標準品(９７％純度品）をコントロールとして、薄層クロマトグラフのスポットをデンシトメーターにより測定し、面積比で定量した。上記工程で得られた生成物中環状ホスファチジン酸ナトリウム塩の純度は５４％であった。

[0048] 上記の環状ホスファチジン酸ナトリウム塩５００ｍｇを５ｍｌの１０％メタノールを含むクロロホルムに溶解させ、シリカゲルカラムにかけ、同一溶媒で展開、更に２０％メタノールを含むクロロホルムで展開し、１０ｍｌの画分に分取した。上記のTLC法によって環状ホスファチジン酸ナトリウム塩を含有する画分を確認して集め、ロータリーエバポレータで減圧乾固させ環状ホスファチジン酸ナトリウム塩の粉末３２０ｍｇを得た。本試料の環状ホスファチジン酸ナトリウム塩の純度は９５％であった。

[0049] （１－３）HA合成酵素及びHA分解酵素の発現の測定

試験２４時間前に軟骨細胞培養を無血清培地に代え、種々の濃度(0,5,10,25,50μM)のcPA又は N-cPAを添加した。同様に、試験２４時間前に骨膜細胞培養を無血清培地に代え、種々の濃度(0,10,25μM)のcPAを添加した。0,0.5,1,2,4時間後に細胞全RNAを回収、cDNA合成し、HAS1、HAS2、HAS3、HYL1、及びHYL2の発現定量をリアルタイムPCRにて行った。発現量はβアクチン（＝コントロール遺伝子）に対する相対発現量として求め、無添加コントロールあるいは添加前値を１として示した。

[0050] 具体的には、以下の通り、サンプル中の標的とコントロールのサイクル数の閾値（Ct：cycle number threshold）の差と、コントロールサンプルにおけるCtを比較するΔΔＣｔ法により発現量比を算定した。

1）各サンプルにおけるCtを用いて、ΔCtを算出

ΔCt = Ct(標的遺伝子) - Ct(コントロール遺伝子)

2) ΔΔCtを算出

ΔΔCt = ΔCt(対象サンプル) - ΔCt(コントロールサンプル)

3) 対象サンプルにおける標的遺伝子発現をノーマライズ

$2^{(-\Delta\Delta Ct)}$

4) コントロールサンプルにおけるノーマライズ後のレベルを１とし、標的遺伝子変化を算出

[0051] （１－４）ヒアルロン酸（HA）産生の測定

試験４８時間前に軟骨細胞培養を無血清培地に代え、種々の濃度(0,10,50nM)のcPA, N-cPAを添加した。培養上清を0,6,12,24,48時間後に採取した。ウシ鼻軟骨由来のHA結合蛋白質を用いたサンドウィッチELISA法(QnE Hyaluronic Acid(HA) ELISA Assay kit; Biotech Trading Partners, Inc)にて、HA産生を定量した。

[0052] （２）結果

（２－１）HA合成酵素及びHA分解酵素の発現の測定結果

軟骨細胞についてのHA合成酵素及びHA分解酵素の発現の測定結果を図１から図５に示す。図１から５に示すように、C16:1-cPA （cPA）はHAS2発現を濃度依存的に持続的に誘導した。HAS1,3は添加２時間後に一過性に発現が誘導されたが、４時間後には発現は低下した。NcPAも同様であった。HA分解酵素(HYL1,2,3)の発現には影響がなかった。上記の結果から、cPA及びNcPAはHA合成酵素を誘導することが示された。また、滑膜細胞について、HA合成酵素の発現の測定結果を図７に示し、HA分解酵素の発現の測定結果を図８に示す。

[0053] （２－２）ヒアルロン酸（HA）産生の測定結果

HA産生の測定結果を図６に示す。図６に示すように、C16:1-cPA （cPA）は軟骨細胞HA合成を計時的に促進させ細胞外へ放出した。４８時間後には50nM添加群は対照に比較し約３倍のHA増加を認めた。NcPAも同様の作用を示した。上記の結果から、C16:1-cPA （cPA）及びNcPAはOA関節軟骨細胞に対しHA産生を促進させることが示された。

[0054] （３）結論

式（１）で示される環状ホスファチジン酸又はカルバ環状ホスファチジン酸は皮膚線維芽細胞の場合と同様、ヒトOA関節軟骨細胞においてもHA合成酵素発現を誘導し、HA産生を促進することが確認された。

[0055] 実施例２：ウサギ変形性膝関節症に対するＳｃＰＡの薬効評価

（１）方法

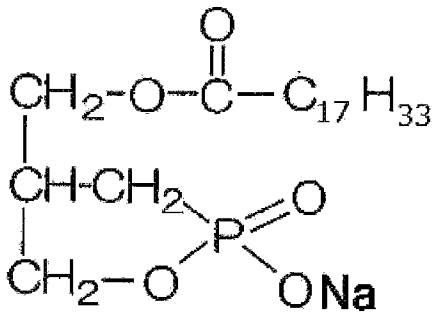
（１－１）使用動物及び飼育条件

11～12週齢の雄ウサギ（Kbs:NZW）１２羽を使用した。ウサギは、14.4～24.9℃で７時～１９時の照明時間（１２時間）にて連続換気で１羽／ケージで飼育した。飼料はＣＲ－３（日本クレア株式会社）（１５０ｇ／日）を使用し、飲料水は水道水を使用した。

[0056] （１－２）投与物質

（９Ｚ）－９－オクタデセン酸－（２－ヒドロキシ－２－オキシド－１，２－オキサホスホラン－４－イル）メチルエステルナトリウム塩：C18:1-cPA（以下、ＳｃＰＡ）を使用した。

[化5]



[0057] 媒体は、生理食塩水を使用した。

[0058] （１－３）変形性関節症モデルの作製

深麻酔下のウサギの右後肢膝関節周囲を電気バリカンで剃毛し、イソジンで消毒した。メスで右後肢内側の外皮を切開し、さらに膝蓋靭帯の内側と関節包との境目を切開した後、内側側副靭帯を切断した。切断後、関節包を大きく展開し、内側半月板を露出した後に全摘出した。半月板の摘出後、関節

包の周囲組織及び表皮を縫合した。縫合の際には抗生物質（ビクシリン、明治製菓(株)）を含む生理食塩水（500 mg(力価)／20 mL ）で術部を洗浄した。

[0059] 外科的処置当日（day0）は絶食し、給水は自由摂水とした。覚醒の確認は、動物が頭部を自発的に動かす状態をもって覚醒とした。覚醒を確認するまでの間、当該動物の体温の低下を防ぐためにタオルで体幹を覆うことで保温し、うっ血を防ぐために体位交換も適宜に行った。処置後5日目(Day5)までは感染予防のため、抗生剤（ビクシリン；3単位/kg）を1日1回筋肉内投与した。

[0060] モデル作製処理後、体重が均一になるよう１群６羽の２群に分け、媒体投与群（動物番号１０１～１０６）と、被験物質（ＳｃＰＡ）投与群（動物番号２０１～２０６）とした。

[0061] （１－４）被験物質および媒体の関節腔内投与

被験物質及び媒体の投与は以下の通り行った。

投与経路：関節腔内投与

投与部位：右後肢(処置肢)

投与回数：Day7、11、14、18、21、25、28、32、35および39

投与用量：被験物質：10μg/rabbit（容量0.2mL）

媒体：0.2mL/rabbit

投与方法：1.0mLのシリンジ(テルモ株式会社)と27Gの注射針(テルモ株式会社)で行った。

[0062] （１－５）疼痛評価(両後肢重量配分比)

測定回数：処置前、処置1、2、3、4、5および6週間後に計7回の頻度で行った。

測定方法：左右後肢に負荷する体重をそれぞれ片肢ずつ体重計を用いて測定することにより、処置肢(右後肢)の配分比を下記の式より求めた。

処置肢(右後肢)重量配分比(%)＝〔右後肢(kg)/(右後肢(kg)+ 左後肢(kg))〕×100

[0063] （１－６）腫脹評価(両後肢関節腫脹比)

測定回数：処置6週間後に行った。

測定方法：左右後肢の関節部位で最も幅のある箇所をデジタルノギスを用いて測定し、変形性関節症により誘発される関節部の腫脹を下記の式より求めた。

処置肢(右後肢)腫脹比(%)＝〔（右後肢(mm)-左後肢(mm)）/(左後肢(mm)+ 左後肢(mm))〕×100

[0064] （１－７）生体材料採取(Day42)および採取後の処理

深麻酔下の動物に対し四肢を切開することにより放血致死させる。放血致死後、処置肢(右後肢)の膝関節部位の大腿骨顆部および頚骨顆部を摘出し、10%中性緩衝ホルマリン液で固定した。

[0065] （１－８）病理組織標本の作製および病理組織学的評価

１０％中性緩衝ホルマリン溶液に浸漬固定した大腿骨、頚骨をEDTA脱灰した。脱灰終了後、以下の有色の箇所を常法に従いパラフィン包埋後、4μmに薄切し、ヘマトキシリン・エオジン(HE)染色およびサフラニンO（プロテオグリカン）染色を行い、病理組織学的検査を光学顕微鏡(OLYMPUS（株)、型式:BX51TF)で行った。病理組織標本における軟骨変性の程度は、以下の表１に記載の評価基準（Kikuchi T, Yoneda H et al: Osteoarthritis cartilage, 4; 99～(1996)）に従って評価した。すなわち、表層の消失、軟骨びらん、粗造化/亀裂、プロテオグリカン染色性（サフラニンO染色性）低下、軟骨細胞配列不整、軟骨細胞消失、軟骨下骨露出、軟骨細胞房状集簇の8項目を5段階評価(0～+4)し、各項目の評点の総和を総合評点とした。なお、表１の評価基準において具体的な基準の無い所見については、以下の表２に記載の評価基準（石黒直樹ら；Journal of Surgery,29:112～(2010)）に従って評価した。

[0066]

[表1]

Observation / Score	1	2	3	4
Loss of superficial layer	<sight	Moderate	Focally severe	Extensive severe
Erosion of cartilage	<Detectable	Moderate	Focally severe	Extensive severe
Fibrillation and/or fissures	<Noticeable (<1very mall)	Moderate (1 small)	Marked (2 small or 1 medium)	Extensive (3 small, 2 medium or 1
Loss of proteoglycan	<Paler stain than control	Moderate loss of safraniophilia	Marked loss of safraniophilia	Total loss of safraniophilia
Disorganization of chondrocyte	Noticeable	Moderate, with	Marked loss of	No recognizable
Loss of chndrocyte	<Noticeable Decrease in cells	Moderate decrease in cells	Marked decrease in cells	Very extensive decrease in cells
Exposure of subchondral bone	<Focal Exposure of bone	Moderate Exposure of bone	Fairly extensive exposure of bone	Very extensive exposure of bone
Cluster formation [a)]	<3-4 small, or 1-2	5-6 small, 3-4	7 or more small, 5-	7 or more medium

a) Small: 2-4 cells, Medium: 5-8 cells, Large: 9 or more cells

[0067]

[表2]

所見	評点	基準の詳細
軟骨びらん	0	変化なし
	1	表層から中間層に限局した病変が評価部位の幅の1/3以下にみられる
	2	表層から中間層に限局した病変が1/3～2/3に、または深層に波及した病変が評価部位の幅の1/3以下にみられる
	3	表層から中間層に限局した病変が2/3以上に、または深層に波及した病変が1/3～2/3にみられる
	4	表層から中間層に限局した病変が1に、または深層に波及した病変が2/3以上にみられる
粗造化/亀裂	0	変化なし
	1	表層から中間層に限局した病変が評価部位の幅の1/3以下にみられる
	2	表層から中間層に限局した病変が1/3～2/3に、または深層に波及した病変が評価部位の幅の1/3以下にみられる
	3	表層から中間層に限局した病変が2/3以上に、または深層に波及した病変が1/3～2/3にみられる
	4	表層から中間層に限局した病変が1に、または深層に波及した病変が2/3以上にみられる
表層の消失	0	変化なし
	1	病変の発現領域が評価部位の1/4以下を占める
	2	病変の発現領域が評価部位の1/4～2/4を占める
	3	病変の発現領域が評価部位の2/4～3/4を占める
	4	病変の発現領域が評価部位の3/4以上を占める
プロテオグリカン染色性低下	0	変化なし
	1	病変の発現領域が評価部位の1/4以下を占める
	2	病変の発現領域が評価部位の1/4～2/4を占める
	3	病変の発現領域が評価部位の2/4～3/4を占める
	4	病変の発現領域が評価部位の3/4以上を占める
軟骨細胞配列不整	0	変化なし
	1	病変の発現領域が評価部位の1/4以下を占める
	2	病変の発現領域が評価部位の1/4～2/4を占める
	3	病変の発現領域が評価部位の2/4～3/4を占める
	4	病変の発現領域が評価部位の3/4以上を占める
軟骨細胞消失	0	変化なし
	1	病変の発現領域が評価部位の1/8以下を占める
	2	病変の発現領域が評価部位の1/8～1/3を占める
	3	病変の発現領域が評価部位の1/3～2/3を占める
	4	病変の発現領域が評価部位の2/3以上を占める
軟骨下骨露出	0	変化なし
	1	病変の発現領域が評価部位の1/8以下を占める
	2	病変の発現領域が評価部位の1/8～1/3を占める
	3	病変の発現領域が評価部位の1/3～2/3を占める
	4	病変の発現領域が評価部位の2/3以上を占める
房状集簇形成	0	変化なし
	1	病変の発現領域が評価部位の1/8以下を占める
	2	病変の発現領域が評価部位の1/8～1/3を占める
	3	病変の発現領域が評価部位の1/3～2/3を占める
	4	病変の発現領域が評価部位の2/3以上を占める

[0068] （１－９）データの処理および統計解析

両後肢重量配分比および両後肢関節腫脹比について群平均値(mean)とその標準誤差(SE)を算出後、被験物質投与群と媒体投与群の間でF検定を行い、分散に違いがなければStudentのt検定で、分散に違いがあればAspin-Welchのt検定で、病理組織学的検査における評価項目の総合評点については群平均値(mean)とその標準誤差(SE)を算出後、Mann-WhitneyのU検定で2群間の平均値の差を検定した。なお、両側5および1%を有意水準とした。

[0069] （２）結果

（２－１）疼痛評価(両後肢重量配分比)

表３および図９に、モデル作製(Day0)から生体材料採取日(Day42)までの両後肢重量配分比の推移を示す。媒体投与群はDay14まで処置の外科的侵襲からの回復が認められたが、それ以降は経日的に変形性関節症が誘発され、それに伴った疼痛から処置肢(右後肢)にかける体重の比率は減少しており、生体材料採取日(Day42)には28.0%の低値を示した。一方、被験物質投与群はDay14までは、媒体投与群と同様に処置の外科的侵襲からの回復が認められ、それ以降は媒体投与群と比較し処置肢(右後肢)に負荷する重量の比率は生体材料採取日(Day42)まで高値を示し、Day42の測定においては、有意な差が認められた(p＝0.0053)。

[0070]

[表3]

表３　疼痛評価(両後肢重量配分比)

群名	動物番号	項目	Day0	Day7	Day14	Day21	Day28	Day35	Day42
媒体投与群	101	右後肢(g)	630	350	550	290	450	440	340
		左後肢(g)	500	390	700	750	650	650	910
		重量配分比(%)	56	47	44	28	41	40	27
	102	右後肢(g)	550	240	160	320	100	130	80
		左後肢(g)	500	500	160	320	300	800	550
		重量配分比(%)	52	32	50	50	25	14	13
	103	右後肢(g)	470	420	370	490	520	300	470
		左後肢(g)	510	700	670	740	720	580	720
		重量配分比(%)	48	38	36	40	42	34	39
	104	右後肢(g)	390	300	200	380	480	510	290
		左後肢(g)	460	640	500	600	550	750	930
		重量配分比(%)	46	32	29	39	47	40	24
	105	右後肢(g)	540	270	600	410	290	370	370
		左後肢(g)	460	610	500	610	480	350	870
		重量配分比(%)	54	31	55	40	38	51	30
	106	右後肢(g)	380	50	450	450	590	380	490
		左後肢(g)	460	340	500	680	740	760	900
		重量配分比(%)	45	13	47	40	44	33	35
	平均		50.3	32.1	43.3	39.4	39.4	35.6	28.0
	標準誤差		1.77	4.60	3.94	2.87	3.14	5.07	3.83
被験物質投与群	201	右後肢(g)	660	660	520	380	600	350	440
		左後肢(g)	610	1010	770	710	700	650	620
		重量配分比(%)	52	40	40	35	46	35	42
	202	右後肢(g)	320	160	200	370	150	350	510
		左後肢(g)	400	410	400	440	290	800	700
		重量配分比(%)	44	28	33	46	34	30	42
	203	右後肢(g)	410	140	320	720	390	380	630
		左後肢(g)	550	900	640	350	260	470	380
		重量配分比(%)	43	13	33	67	60	45	62
	204	右後肢(g)	490	520	630	250	660	630	660
		左後肢(g)	460	750	810	580	750	1030	820
		重量配分比(%)	52	41	44	30	47	38	45
	205	右後肢(g)	270	430	380	450	600	560	520
		左後肢(g)	260	880	700	760	710	570	840
		重量配分比(%)	51	33	35	37	46	50	38
	206	右後肢(g)	350	460	610	440	780	510	610
		左後肢(g)	310	750	600	580	800	870	580
		重量配分比(%)	53	38	50	43	49	37	51
	平均		49.1	32.1	39.4	43.0	47.0	39.1	46.7
	標準誤差		1.79	4.21	2.78	5.36	3.38	2.82	3.61
	P Volum		0.6486	0.9960	0.4310	0.5641	0.1295	0.5602	0.0053**

(%)

[0071] （２－２）腫脹評価(両後肢関節腫脹比)

表４および図１０に、生体材料採取日(Day42)の両後肢の関節腫脹比を示す。動物個体の関節幅を測定し群間の差を検討したところ、被験物質投与群が媒体投与群と比較し、有意に腫脹を抑制していた(p＝0.0164)。

[0072]

[表4]

表 4　腫脹評価(両後肢関節腫脹比)

群名	動物番号	項目	4月19日 Day42
媒体投与群	101	右後肢(mm)	24.45
		左後肢(mm)	23.98
		腫脹比(%)	1.96
	102	右後肢(mm)	25.86
		左後肢(mm)	20.31
		腫脹比(%)	27.33
	103	右後肢(mm)	23.08
		左後肢(mm)	21.20
		腫脹比(%)	8.87
	104	右後肢(mm)	24.37
		左後肢(mm)	22.31
		腫脹比(%)	9.23
	105	右後肢(mm)	24.96
		左後肢(mm)	23.00
		腫脹比(%)	8.52
	106	右後肢(mm)	25.44
		左後肢(mm)	22.06
		腫脹比(%)	15.32
	平均		11.9
	標準誤差		3.54
被験物質投与群	201	右後肢(mm)	24.17
		左後肢(mm)	24.60
		腫脹比(%)	-1.75
	202	右後肢(mm)	23.75
		左後肢(mm)	23.38
		腫脹比(%)	1.58
	203	右後肢(mm)	22.30
		左後肢(mm)	21.50
		腫脹比(%)	3.72
	204	右後肢(mm)	21.63
		左後肢(mm)	22.88
		腫脹比(%)	-5.46
	205	右後肢(mm)	24.74
		左後肢(mm)	23.21
		腫脹比(%)	6.59
	206	右後肢(mm)	21.36
		左後肢(mm)	21.79
		腫脹比(%)	-1.97
	平均		0.5
	標準誤差		1.78
	P Volum		0.0164*

(%)

[0073] （２－３）病理組織学的評価

病理組織学的検査の要約を表５及び６並びに図１１に示し、代表例の病理組織画像を図１２に示す。

媒体投与群および被験物質投与群の両群において、大腿骨外側顆および脛骨外側顆には、変形性関節症モデル作製に由来した障害はほぼ認められなかった。

[0074] 大腿骨内側顆では媒体投与群で、関節軟骨表層の消失、プロテオグリカン染色性低下、軟骨細胞配列不整、軟骨細胞消失、房状集簇形成が6例中全例にみられ、軟骨びらんは6例中5例にみられた。特に房状集簇形成は全例で高いグレード(平均値=2.50±0.43)であった。各所見の病理組織学的評点は9、21、17、11、8、20(平均値=14.33±2.33)であり、全例の関節軟骨に軽度から重度の変化が認められた。一方、被験物質投与群の大腿骨内側顆においては、房状集簇形成が6例中全例にみられ、軟骨表層の消失、軟骨びらん、軟骨細胞配列不整は6例中5例にみられた。病理組織学評点は5、6、10、3、20、6(平均値=8.33±2.51)であり、媒体投与群の同部位の変化と比較し6例中4例で低下傾向がみられ、病理組織学評点においても低値を示した(p＝0.0649)。

[0075] 脛骨内側顆では媒体投与群で、関節軟骨表層の消失、軟骨粗造化/亀裂、軟骨細胞配列不整が6例中全例にみられ、プロテオグリカン染色性の低下が6例中5例にみられた。病理組織学評点は8、27、14、5、3、18(平均値=12.50±3.69)であり、6例中4例の関節軟骨に軽度から重度の変化が認められた。被験物質投与群においては、軟骨粗造化/亀裂が6例中全例にみられ、軟骨表層の消失、プロテオグリカン染色性の低下が6例中5例にみられた。病理組織学評点は4、16、6、1、27、9(平均値=10.50±3.91)であった。

[0076]

[0077]

[表5]

病理組織学的所見（大腿骨内側顆）

試験群	媒体投与群								被験物質投与群								
動物番号	101	102	103	104	105	106	平均	標準誤差	201	202	203	204	205	206	平均	標準誤差	P Volum
表層の消失	1	4	2	1	1	2	1.83	0.48	1	1	1	0	3	1	1.17	0.40	
軟骨びらん	1	3	3	1	0	3	1.83	0.54	1	1	1	0	3	1	1.17	0.40	
粗造化／亀裂	0	0	2	0	0	3	0.83	0.54	0	1	0	0	3	0	0.67	0.49	
プロテオグリカン染色性低下	1	4	2	2	1	2	2.00	0.45	0	1	2	0	3	1	1.17	0.48	
軟骨細胞配列不整	2	4	3	2	1	3	2.50	0.43	1	0	1	1	1	1	0.83	0.17	
軟骨細胞消失	1	2	1	1	1	1	1.17	0.17	0	0	1	1	3	0	0.83	0.48	
軟骨下骨露出	0	0	0	0	0	2	0.33	0.33	0	0	0	0	2	0	0.33	0.33	
房状集簇形成	3	4	4	4	4	4	3.83	0.17	2	2	4	1	2	2	2.17	0.40	
病理組織学的評点	9	21	17	11	8	20	14.33	2.33	5	6	10	3	20	6	8.33	2.51	0.0649

所見のグレード：0；なし、1；極軽度、2；軽度、3；中等度、4；重度0

病理組織学的所見（大腿骨外側顆）

試験群	媒体投与群						被験物質投与群					
動物番号	101	102	103	104	105	106	201	202	203	204	205	206
表層の消失	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0
軟骨びらん	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0
粗造化／亀裂	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
プロテオグリカン染色性低下	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
軟骨細胞配列不整	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
軟骨細胞消失	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
軟骨下骨露出	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
房状集簇形成	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
病理組織学的評点	0	8	0	0	0	0	0	0	2	0	2	0

所見のグレード：0；なし、1；極軽度、2；軽度、3；中等度、4；重度

[表6]

病理組織学的所見（脛骨内側顆）

試験群	媒体投与群								被験物質投与群								
動物番号	101	102	103	104	105	106	平均	標準誤差	201	202	203	204	205	206	平均	標準誤差	P Volum
表層の消失	1	3	2	1	1	3	1.83	0.40	1	3	1	0	4	3	2.00	0.63	
軟骨びらん	1	3	2	0	0	3	1.50	0.56	0	2	1	0	3	1	1.17	0.48	
粗造化／亀裂	2	3	1	1	1	3	1.83	0.40	2	1	1	1	3	1	1.50	0.34	
プロテオグリカン染色性低下	1	4	2	1	0	2	1.67	0.56	1	4	1	0	4	1	1.83	0.70	
軟骨細胞配列不整	2	4	2	1	1	2	2.00	0.45	0	2	1	0	4	1	1.33	0.61	
軟骨細胞消失	1	3	1	0	0	1	1.00	0.45	0	0	0	0	3	1	0.67	0.49	
軟骨下骨露出	0	3	0	0	0	0	0.50	0.50	0	0	0	0	3	0	0.50	0.50	
房状集簇形成	0	4	4	1	0	4	2.17	0.83	0	4	1	0	3	1	1.50	0.67	
病理組織学的評点	8	27	14	5	3	18	12.50	3.69	4	16	6	1	27	9	10.50	3.91	0.6991

所見のグレード：0；なし、1；極軽度、2；軽度、3；中等度、4；重度0

病理組織学的所見（脛骨外側顆）

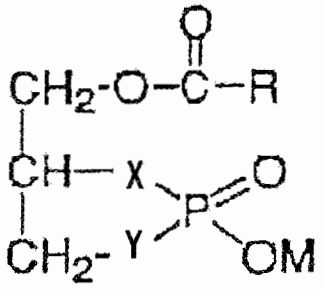
試験群	媒体投与群						被験物質投与群					
動物番号	101	102	103	104	105	106	201	202	203	204	205	206
表層の消失	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
軟骨びらん	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
粗造化／亀裂	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
プロテオグリカン染色性低下	0	4	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0
軟骨細胞配列不整	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
軟骨細胞消失	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
軟骨下骨露出	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
房状集簇形成	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
病理組織学的評点	0	15	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0

所見のグレード：0；なし、1；極軽度、2；軽度、3；中等度、4；重度

請求の範囲

［請求項1］ 下記式（１）で示される化合物を有効成分として含有する関節症治療剤。

［化1］



（1）

（式中、Ｒは、炭素数１～３０の直鎖状若しくは分岐状アルキル基、炭素数２～３０の直鎖状若しくは分岐状アルケニル基、又は炭素数２～３０の直鎖状若しくは分岐状アルキニル基であり、これらの基はシクロアルカン環又は芳香環を含んでいてもよい。Ｘ及びＹはそれぞれ独立に、酸素原子、又はメチレン基を示すが、Ｘ及びＹが同時にメチレン基になることはない。Ｍは、水素原子又はアルカリ金属原子である。）

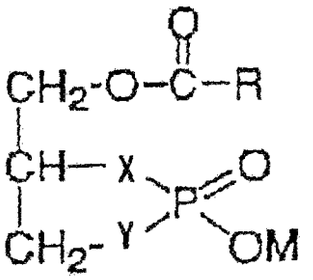
［請求項2］ 式（１）において、Ｘ及びＹが酸素原子である、請求項１に記載の関節症治療剤。

［請求項3］ 式（１）において、Ｘ又はＹの一方が酸素原子であり、他方がメチレン基である、請求項１又は２に記載の関節症治療剤。

［請求項4］ 式（１）で示される化合物が、１－オレオイル環状ホスファチジン酸又は１－パルミトオレオイル環状ホスファチジン酸及びそれらの誘導体のカルバ環状ホスファチジン酸である、請求項１から３の何れか1項に記載の関節症治療剤。

［請求項5］ 下記式（１）で示される化合物を、関節症を伴う患者に投与することを含む、関節症の治療方法。

[化2]



(1)

(式中、Ｒは、炭素数１～３０の直鎖状若しくは分岐状アルキル基、炭素数２～３０の直鎖状若しくは分岐状アルケニル基、又は炭素数２～３０の直鎖状若しくは分岐状アルキニル基であり、これらの基はシクロアルカン環又は芳香環を含んでいてもよい。Ｘ及びＹはそれぞれ独立に、酸素原子、又はメチレン基を示すが、Ｘ及びＹが同時にメチレン基になることはない。Ｍは、水素原子又はアルカリ金属原子である。)