

博士論文要約

令和4年9月修了 獣医学研究科 共同獣医学専攻

氏 名 田原 春菜

論文題目 点眼剤開発のための眼局所における遺伝毒性評価法の開発及びその有用性に関する研究

(A study for establishment and utilization of genotoxicity test methods on the ocular surface for the development of ophthalmic drugs)

医薬品開発では一般毒性試験や遺伝毒性試験、生殖発生毒性試験などの非臨床安全性試験を開発段階に応じて実施しなければならない。その中で、遺伝毒性試験はヒトに対する発がんのリスクと次世代の遺伝子疾患のリスクを予測するため、特に重要な毒性試験の一つであり、遺伝毒性試験の結果は医薬品開発の継続の可否に大きく影響する。遺伝毒性試験の標準的組合せとして1種以上の *in vivo* 試験を実施する必要がある。*In vivo* 遺伝毒性評価系として、骨髓細胞を用いる小核試験や肝臓を用いるコメットアッセイなど、経口投与や静脈内投与による全身投与での試験が広く実施されている。一方で、点眼剤は眼局所に高濃度で曝露されることから、全身投与での遺伝毒性試験とは異なる方法でリスク評価を求められる場合がある。しかしながら、点眼後の眼局所における *in vivo* 遺伝毒性評価系はほとんど報告されておらず、点眼剤開発においてしばしば課題となっている。この課題を解決するために、本研究では点眼後の眼局所における遺伝毒性評価系の確立を目的として、点眼後のウサギ及びラットの角膜を用いた *in vivo* 遺伝毒性試験系を検討した。加えて、医薬品開発の初期段階で簡易に *in vivo* 角膜遺伝毒性試験の結果を予測するために、*in vitro* 代替法試験も検討した。

第1章では不定期DNA合成 (unscheduled DNA synthesis, 以下、UDS) 試験に着目し、既知の遺伝毒性物質である 1,1'-ジメチル-4,4'-ビピリジニウムジクロリド (以下、パラコート)、アクリジンオレンジ、臭化エチジウム (以下、EtBr)、アクリルアミド及び 4-ニトロキノリン 1-オキシド (以下、4-NQO) をウサギに単回点眼し、投与後2時間に採取した角膜上皮を用いて *in vivo* 角膜 UDS 試験を検討した。その結果、陰性対照と比較してパラコート、アクリジンオレンジ、EtBr 及び 4-NQO の4化合物において角膜上皮における UDS の増加を検出することができた。これにより、点眼後の眼局所での遺伝毒性を検出する試験系を初めて作成した。

第2章では放射性標識体を使用する *in vivo* 角膜 UDS 試験に代わる簡便な評価系としてコメットアッセイの有用性を検討した。パラコート、EtBr、メチルメタンスルホン酸 (以下、MMS)、アクリルアミド及び 4-NQO をウサ

ぎに単回点眼し、投与後 2 時間に採取した角膜上皮細胞を用いて、*in vivo* 角膜コメットアッセイを検討した。その結果、陰性対照と比較して EtBr, MMS 及び 4-NQO の 3 化合物において DNA 損傷の増加を検出することができた。また、上記 3 化合物を用いて単回点眼後のウサギ角膜上皮細胞における DNA 損傷の経時的な評価により、*in vivo* 角膜コメットアッセイの角膜採取時間は投与後 0.5～6 時間が適切であることを明らかにした。本検討により、*in vivo* 角膜 UDS 試験よりも簡便な試験系として *in vivo* 角膜コメットアッセイを見出し、本試験系を確立した。

第 3 章では 3Rs の観点から、一般毒性試験に組み込める評価系の確立を目的として、点眼後の眼局所における γ H2AX を指標とした遺伝毒性評価系を検討した。ドキソルビンとラットに単回点眼し、角膜上皮を用いて免疫組織化学染色を検討した。その結果、角膜上皮での定常的な γ H2AX の発現が示唆され、DNA 損傷が誘発する条件であるにもかかわらず、 γ H2AX の発現変動をとらえることが出来なかった。

第 4 章では医薬品開発の初期段階で簡易に *in vivo* 角膜遺伝毒性試験の結果を予測するために、三次元多層培養モデルの一つである三次元角膜モデルの有用性を検討した。点眼を模倣した 1 分間の短時間曝露で上記の遺伝毒性物質のコメットアッセイを実施した。その結果、短時間曝露の条件下でも DNA 損傷の増加が認められること、三次元角膜モデルが *in vivo* を精度よく予測できる試験系であることを示した。

第 5 章では、本研究により開発した遺伝毒性試験の特徴を整理し、点眼剤開発での活用法を提案した。本研究で確立した *in vivo* 試験法は一般的な点眼剤濃度で遺伝毒性を検出できること、*in vitro* 及び *in vivo* 試験法は医薬品開発の各段階で活用可能であること、及び医薬品の製造販売承認申請に使用可能であったことから、一連の研究の有用性を示した。

本研究により、点眼剤開発における遺伝毒性評価の課題であった点眼後の眼局所の *in vivo* 遺伝毒性評価系として *in vivo* 角膜 UDS 試験及び *in vivo* 角膜コメットアッセイを確立した。これら試験法は点眼剤開発において点眼後の眼局所の *in vivo* 遺伝毒性を評価する試験系としての有用性が示された。また三次元角膜モデルを使用したコメットアッセイ法は点眼後の眼局所の遺伝毒性試験の代替法として有用であり、動物福祉の観点からも医薬品開発に寄与できる。