	たはら はるな
氏　　名	**田　原　春　菜**
本籍（国籍）	日　本　国
学位の種類	博士（獣医学）
学位記番号	獣論博第１号
学位授与年月日	令和４年９月２６日
学位授与の要件	学位規則第５条第２項該当　論文提出による博士
研究科及び専攻	獣医学研究科　共同獣医学専攻
学位論文題目	**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**
学位審査委員	主査　教　授　　佐　藤　洋
	副査　教　授　　佐　藤　至
	副査　教　授　　古　市　達　也
	副査　准教授　　佐　々　木　一　昭
	副査　准教授　　鈴　木　和　彦

論文の内容の要旨

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，骨髄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 をウサギに単回点眼し，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 γH2AX を指標とした遺伝毒性評価系を検討した。ドキソルビシンを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 γH2AX 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，γH2AX 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。

論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

医薬品開発で実施される遺伝毒性試験はヒトに対する発がんリスクと次世代の遺伝子疾患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。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，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。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検討した。

第 1 章では不定期 DNA 合成（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，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。

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 をウサギに単回点眼し，*in vivo* 角膜コメットアッセイを検討した。その結果，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，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。

第 3 章では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 γH2AX を指標とした遺伝毒性評価系を検討した。ドキソルビシンを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した結果，角膜上皮での定常的な γH2AX の発現がみられ，DNA 損傷を誘発する条件にもかかわらず，γH2AX の発現変動をとらえることは出来なかった。

第 4 章では簡易に *in vivo* 角膜遺伝毒性試験結果を予測するために，三次元角膜モデルを検討した。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，本条件下でも DNA 損傷の増加が認められ，*in vivo* を精度よく予測できる試験系であることを明らかにした。

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。

本研究により，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によるコメットアッセイ法は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。

以上について，審査委員会全員一致で本論文が岩手大学大学院獣医学研究科の学位論文として充分価値があると認めた。

学位論文の基礎となる学術論文

1．著　者　名　Tahara, H., Sadamoto, K., Yamagiwa, Y., Nemoto, S., Kurata, M.
発　行　年　2019
題　　目　Investigation of comet assays under conditions mimicking ocular instillation administration in a three-dimensional reconstructed human corneal epithelial model
学術雑誌名　Cutaneous and Ocular Toxicology
（巻・号・頁）　38・4・375-383

2．著　者　名　Tahara, H., Nemoto, S., Yamagiwa, Y., Haranosono, Y., Kurata, M.
発　行　年　2021
題　　目　Investigation of *in vivo* unscheduled DNA synthesis in rabbit corneas following instillation of genotoxic agents
学術雑誌名　Cutaneous and Ocular Toxicology
（巻・号・頁）　40・1・26-36

3．著　者　名　Tahara, H., Yamagiwa, Y., Haranosono, Y., Kurata, M.
発　行　年　2021
題　　目　*In vivo* comet assay in rabbit corneal epithelial cells following ocular instillation with genotoxic compounds
学術雑誌名　Genes and Environment
（巻・号・頁）　43・　・11

4．著　者　名　Tahara, H., Yamagiwa, Y., Haranosono, Y., Kurata, M.
発　行　年　2022
題　　目　Time-course changes in DNA damage of corneal epithelial

cells in rabbits following ocular instillation with genotoxic compounds

学術雑誌名　Genes and Environment

（巻・号・頁）　44・　・14

既発表学術論文

1．著　者　名　Shibai-Ogata, A., Tahara H., Yamamoto, Y., Fujita, M., Satoh, H., Yuasa, A., Hioki, T., Kasahara, T.

発　行　年　2014

題　　目　An automated new technique for scoring the *in vivo* micronucleus assay with image analysis

学術雑誌名　Mutagenesis

（巻・号・頁）　29・1・63–71

2．著　者　名　Fujita, M., Yamamoto, Y., Tahara, H., Kasahara, T., Jimbo, Y., Hioki, T.

発　行　年　2014

題　　目　Development of a prediction method for skin sensitization using novel cysteine and lysine derivatives

学術雑誌名　Journal of Pharmacological and Toxicological Methods

（巻・号・頁）　70・1・94-105

3．著　者　名　Yamamoto, Y., Tahara, H., Usami, R., Kasahara, T., Jimbo, Y., Hioki, T., Fujita, M.

発　行　年　2015

題　　目　A novel in chemico method to detect skin sensitizers in highly diluted reaction conditions

学術雑誌名　Journal of Applied Toxicology

（巻・号・頁）　35・11・1348-1360

4．著　者　名　Tahara, H., Yamamoto, Y., Matsuda, S., Yoshizawa, H., Fujita, M., Hioki, T., Kasahara, T.

発　行　年　2017

題　　目　Chemically induced strong cellular hypertrophy often reduces the accuracy of cytotoxicity measurements obtained using the

ATP assay

学術雑誌名　The Journal of Toxicological Sciences

（巻・号・頁）　42・2・205-221

5．著　者　名　Tahara, H., Matsuda, S., Yamamoto, Y., Yoshizawa, H., Fujita, M., Katsuoka, Y., Kasahara, T.

発　行　年　2017

題　　目　High-content image analysis (HCIA) assay has the highest correlation with direct counting cell suspension compared to the ATP, WST-8 and Alamar blue assays for measurement of cytotoxicity

学術雑誌名　Journal of Pharmacological and Toxicological Methods

（巻・号・頁）　88・Pt 1・92-99

6．著　者　名　Yamagiwa, Y., Masatsugu, M., Tahara, H., Yamada, K., Haranosono, Y., Kurata, M., Satoh H.

発　行　年　2021

題　　目　Orbital malignant schwannoma and embryonal rhabdomyosarcoma in rats caused by leakage of locally injected nickel subsulfide to the orbit

学術雑誌名　Journal of Toxicologic Pathology

（巻・号・頁）　34・2・151-156