

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

2022年9月

岩手大学大学院

獣医学研究科

田原 春菜

目次

| | |
|--|-----------|
| 序論..... | 1 |
| 第1章 点眼後のウサギ角膜上皮を用いた UDS 試験法の検討..... | 7 |
| 第1節 緒言..... | 7 |
| 第2節 材料及び方法..... | 8 |
| 第1項 動物..... | 8 |
| 第2項 被験物質..... | 8 |
| 第3項 投与..... | 8 |
| 1) 群構成..... | 9 |
| 2) 投与方法..... | 11 |
| 第4項 UDS 試験..... | 12 |
| 1) オートラジオグラフィー標本作成..... | 12 |
| 2) オートラジオグラフィー標本による細胞観察..... | 13 |
| 第5項 統計解析..... | 13 |
| 第3節 結果..... | 14 |
| 1) 実験1..... | 14 |
| 2) 実験2..... | 15 |
| 3) 実験3..... | 16 |
| 第4節 考察..... | 17 |
| 第2章 点眼後の角膜上皮細胞を用いたコメットアッセイ法の検討..... | 20 |
| 第1節 緒言..... | 20 |
| 第2節 <i>In vivo</i> 角膜コメットアッセイの検討..... | 21 |
| 第1項 材料と方法..... | 21 |
| 1) 動物..... | 21 |
| 2) 被験物質..... | 21 |
| 3) 投与..... | 22 |
| 4) コメットアッセイ..... | 24 |
| 5) 病理組織学的検査..... | 25 |
| 6) 統計解析..... | 26 |
| 第2項 結果..... | 26 |
| 1) 前眼部観察..... | 26 |
| 2) 角膜上皮の病理組織学的検査..... | 26 |
| 3) コメットアッセイ..... | 26 |
| 第3節 <i>In vivo</i> 角膜コメットアッセイの経時的変化..... | 27 |
| 第1項 材料と方法..... | 27 |
| 1) 動物..... | 27 |
| 2) 被験物質..... | 27 |
| 3) 投与..... | 27 |
| 4) コメットアッセイ..... | 28 |
| 5) 病理組織学的検査..... | 28 |
| 6) 統計解析..... | 29 |
| 第2項 結果..... | 29 |
| 1) 前眼部観察..... | 29 |
| 2) 角膜の病理組織学的検査..... | 29 |

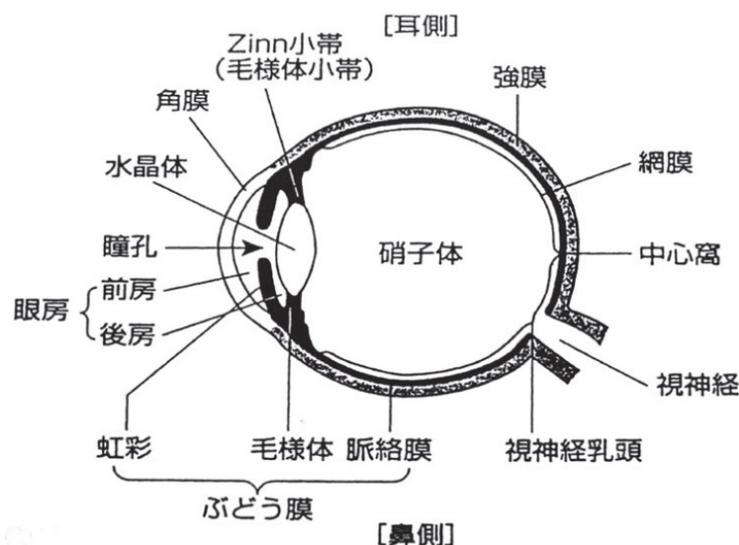
| | |
|---|-----------|
| 3) コメットアッセイ | 30 |
| 第4節 考察 | 30 |
| 第3章 γH2AX を指標とした角膜上皮の二本鎖切断評価系の検討 | 35 |
| 第1節 緒言 | 35 |
| 第2節 材料と方法 | 36 |
| 第1項 動物 | 36 |
| 第2項 被験物質 | 36 |
| 第3項 投与 | 36 |
| 1) 群構成 | 36 |
| 2) 投与方法 | 37 |
| 第4項 免疫組織化学的検査 | 37 |
| 第5項 コメットアッセイ | 38 |
| 第3節 結果 | 38 |
| 1) 前眼部観察 | 38 |
| 2) 免疫組織化学染色 | 38 |
| 3) コメットアッセイ | 38 |
| 第4節 考察 | 39 |
| 第4章 三次元角膜モデルを使用したコメットアッセイの検討 | 41 |
| 第1節 緒言 | 41 |
| 第2節 材料と方法 | 42 |
| 第1項 細胞 | 42 |
| 第2項 被験物質 | 42 |
| 第3項 被験物質の調製及び曝露 | 43 |
| 1) 三次元角膜モデル | 43 |
| 2) HCE-T 細胞 | 44 |
| 第4項 コメットアッセイ | 44 |
| 第5項 細胞毒性試験 | 45 |
| 1) 三次元角膜モデル | 45 |
| 2) HCE-T 細胞 | 45 |
| 第6項 統計解析 | 45 |
| 第3節 結果 | 46 |
| 1) 三次元角膜モデル | 46 |
| 2) HCE-T 細胞 | 46 |
| 第4節 考察 | 46 |
| 第5章 総合考察 | 50 |
| 第6章 結論 | 54 |
| 謝辞 | 56 |
| 引用文献 | 57 |
| 図表 | 69 |

略語表

| | |
|---------------------------|---|
| 4-NQO | 4-Nitroquinoline 1-oxide 4-ニトロキノリン1-オキシド |
| DMSO | Dimethyl sulfoxide ジメチルスルホキシド |
| Dox | Doxorubicin ドキソルビシン |
| EtBr | Ethidium bromide 臭化エチジウム |
| HCE-T 細胞 | Human corneal epithelial cells-transformed SV40 不死化ヒト角膜上皮細胞 |
| HE | Hematoxylin and eosin ヘマトキシリン及びエオジン |
| HLCs | Heavily labeled cells DNA 複製期の細胞 |
| IACUC | Institutional Animal Care and Use Committee 動物実験倫理委員会 |
| ICH | International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use 医薬品規制調和国際会議 |
| <i>In vivo</i> 角膜 UDS 試験 | ウサギの角膜上皮を用いた <i>in vivo</i> UDS 試験 |
| <i>In vivo</i> 角膜コメットアッセイ | ウサギの角膜上皮細胞を用いた <i>in vivo</i> コメットアッセイ |
| MMS | Methyl methanesulfonate メチルメタンスルホン酸 |
| OECD | Organisation for Economic Co-operation and Development 経済協力開発機構 |
| PCNA | Proliferating cell nuclear antigen 増殖性細胞核抗原 |
| SD | Standard deviation 標準偏差 |
| SLCs | Sparsely labeled cells UDS を示す細胞 |
| STE 試験 | Short Time Exposure test 短時間曝露法 |
| T _{max} | 血漿または組織濃度が最大値に達する時間 |
| UDS | Unscheduled DNA synthesis 不定期 DNA 合成 |
| UV | Ultraviolet 紫外線 |
| 三次元角膜モデル | 三次元培養角膜上皮モデル |
| パラコート | 1,1'-Dimethyl-4,4'-bipyridinium dichloride 1,1'-ジメチル-4,4'-ビピリジニウムジクロリド |

序論

ヒトは外部情報の約 80%を視覚から取得するため、眼は生活の質を維持するための特に重要な感覚器官である。下図に示すように、眼は主に角膜、結膜、前房、虹彩、水晶体、硝子体、網膜、及び視神経などの組織から構成されている。角膜は眼の前面をおおう透明な無血管組織で、角膜固有の湾曲性により光を屈折させて、光を眼球内に透過させている。その表面は涙液でおおわれており、角膜は涙液や房水から栄養や酸素を受け取っている。結膜は眼瞼と眼球をつなぐ組織であり、眼瞼と眼球の動きをサポートする働きをしている。虹彩は瞳孔の大きさを変えることで、眼内に入る光の量を調節している。水晶体は透明な組織でレンズの役割を担っており、屈折率を調節することで網膜上に焦点を結んでいる。硝子体は水晶体と網膜の間に位置するゲル状の透明な組織で、眼球形状を内側から維持する役割を果たしている。網膜は 10 層構造をしており、眼に入ってきた光信号を電気的信号に変換し、視神経を通じて脳の視覚野に伝達している。網膜には視細胞と呼ばれる桿体と錐体があり、桿体は明暗視を、錐体は色覚視をつかさどっている [久世, 2018]。このように眼は複雑化した機能を有する多くの組織によって構成されている。また、眼は外部に露出しているため、UV 等の外部刺激を受けやすく、ウイルス感染やコンタクトレンズによる障害、加齢等の様々な要因によって眼疾患を引き起こすことが知られている。主な眼の疾患としては、緑内障、白内障、ドライアイ、及び結膜炎などが知られている。これらの眼疾患の治療のためや、診断、眼の不快感を除去するために日常的に点眼剤が用いられる。



ヒト眼球の水平断面図 [久世, 2018]

点眼後の点眼剤は涙液によって希釈され、約 50%の薬剤が一時的に眼表面に曝露される[Tojo, 1989; Ueda et al., 2010]。その後、大部分の薬剤は鼻涙管を通して急速に排出される[本瀬, 1984]。さらに、結膜囊には約 7 μ L の涙液が貯留しているが、ヒトでは毎分約 16%, ウサギでは毎分約 7% の涙液が入れ替わることが知られている[Lee and Robinson, 1986]。加えて、角膜上皮および結膜上皮は細胞間結合を形成しているため、薬物の吸収を制限している[Kompella et al., 2010; Cholkar et al., 2014; Kim et al., 2014]。以上のことから、点眼剤は眼表面に高濃度曝露されるものの、その曝露時間は非常に短いといった特徴がある。

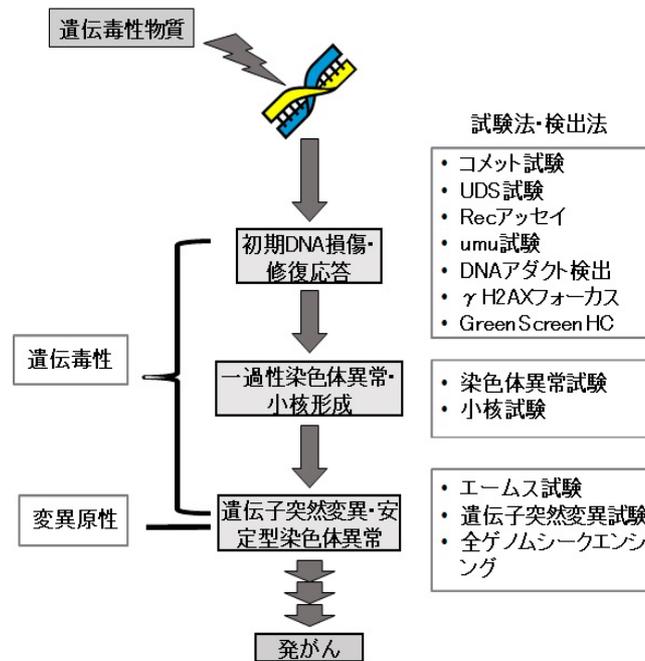
点眼剤を含む医薬品開発には安全性や有効性を評価するために様々な試験が必要であり、大きく分けて下記の 5 つの段階が必要である。まずは基礎研究として、標的分子の探索、新規化合物の合成、化合物のスクリーニング、及び製剤化検討を実施する。一般的には 2~3 年程度の期間を要する。次いで非臨床試験として、薬理試験、薬物動態試験、及び安全性試験を実施し、動物での有効性及び安全性を確認している (3~5 年)。その後、臨床試験を実施し、ヒトへの安全性及び有効性を確認する (3~7 年)。臨床試験には第 I 相、第 II 相、第 III 相試験が存在し、第 I 相では比較的少数の健康な人が対象となり、第 II 相では少数の患者、第 III 相では多数の患者が対象になる。薬の有効性・安全性・品質が証明された後、承認を得るための申請を行い、日本では医薬品医療機器総合機構にて審査される (1~2 年)。その後、承認された薬のみが製造・販売の許可を得る。発売後も、医薬品の有効性や安全性を確認するために、市販後調査や試験が実施されている。



医薬品開発の流れ

医薬品の製造販売承認のための非臨床安全性評価には、通常、安全薬理試験、急性毒性試験、反復投与毒性試験、生殖発生毒性試験、遺伝毒性試験及びがん原性試験などが含まれ、これらを臨床試験や製造販売承認申請までの各ステージに応じて実施する必要があることが医薬品規制調和国際会議 (International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for

る。突然変異を有する物質のことを変異原性物質と呼び、突然変異が体細胞に生じればがん化の引き金となり、生殖細胞に起これば次世代につながる遺伝病の原因となりうる。これらの遺伝毒性や変異原性を検出する試験として Ames 試験や染色体異常試験、コメットアッセイなど様々な試験法が開発されている [本間, 2018]。



遺伝毒性・変異原性及びその試験法 [本間, 2019]

医薬品の遺伝毒性試験に関する ICH S2(R1)ガイドラインには、遺伝毒性試験の標準的組合せとして以下の2種類のオプションの内いずれか1種類を実施する必要があることが述べられている [ICH, 2011]。オプション1は2種の *in vitro* 試験（主に Ames 試験及び哺乳類細胞を使用した *in vitro* 染色体異常試験）及び1種の *in vivo* 試験（主に *in vivo* 小核試験）、オプション2は1種の *in vitro* 試験（主に Ames 試験）及び2種の *in vivo* 試験（主に *in vivo* 小核試験及びもう1種）の各々3試験を実施する必要がある。*In vitro* 遺伝毒性試験は一般的には遺伝毒性のポテンシャルを評価する方法である。一方で、遺伝毒性の評価に薬物動態などの要素を加味した試験法を加えることが望ましいことから、*in vivo* 試験が標準的組合せに加えられている。加えて、オプション1において哺乳類細胞を使用した *in vitro* 試験が陽性の場合、*in vitro* フォローアップ試験または2種目の *in vivo* 試験を実施することが推奨されている。*In vitro* フォローアップ試験に関しては、哺乳類細胞を用いた *in vitro* 試験の陽性結果の妥当性を欠くことを示すことが出来る場合に有用である。例

えば、*in vivo* では妥当とされないまたは閾値が想定される間接的な作用機序の証拠（DNA 合成阻害、高濃度のみで産生される活性酸素種）があげられる。しかしながら、*in vitro* 試験の陽性結果に関して妥当性がないと判断しうる十分な証拠がない場合、または作用機序に関する情報がない場合には、2 種目の *in vivo* 試験が要求される [ICH, 2011]。

In vivo 遺伝毒性試験として、一般的に骨髄または末梢血由来の赤血球を用いた小核試験が実施されている [ICH, 2011; Hayashi, 2016]。また 2 種目の *in vivo* 遺伝毒性試験としては、他に適切な方法がない限り曝露及び代謝能の観点から肝細胞を用いたコメットアッセイが推奨されている [Brendler-Schwaab et al., 2005; ICH, 2011]。その他にもげっ歯類の肝細胞を用いた小核試験 [Suzuki et al., 2009]、骨髄細胞を用いた染色体異常試験 [Tice et al., 1994]、及び肝細胞を用いた不定期 DNA 合成（*unscheduled DNA synthesis*, 以下、UDS）試験 [Butterworth et al., 1987; Madle et al., 1994] などの *in vivo* 遺伝毒性評価系が報告されている。加えて、突然変異誘発性を評価する試験として、トランスジェニック動物を用いた遺伝子突然変異試験 [Heddle et al., 2000; Marchetti et al., 2018] 及び末梢血を用いた *pig-a* アッセイ [Kimoto et al., 2013; Olsen et al., 2017] 等が開発されている。また、これらの *in vivo* 遺伝毒性試験は主に化合物を経口または静脈内投与し、血流を介して全身曝露後の組織（骨髄や肝臓など）の遺伝毒性を評価している。これらの *in vivo* 試験では、適切に曝露されていることを示すため、血中濃度（トキシコキネティクス）の評価も必要である。

しかしながら、上記は経口投与をはじめとする全身薬での評価方法であり、点眼剤のような局所適用の医薬品では異なるアプローチが必要となる場合がある。すなわち、局所適用の医薬品は投与部位（塗布剤では皮膚、点眼剤では角膜など）に直接薬剤が投与されるため、全身投与後の評価組織の曝露レベルと比較すると局所適用後の投与部位の曝露レベルの方が高いことがある。そのため一般的に実施される全身投与後の遺伝毒性試験では、局所適用の医薬品の遺伝毒性を評価するには曝露レベルが不十分な場合があり、その場合は局所適用の医薬品評価のための別の遺伝毒性試験が望ましい。これまで局所投与による遺伝毒性試験として、経皮投与後のマウスの皮膚を用いたコメットアッセイや小核試験が報告されている [Haesen S et al., 1993; Toyozumi et al., 2011]。しかしながら、点眼後の眼表面の遺伝毒性試験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。

そこで、本研究では点眼剤開発における遺伝毒性評価の課題を解決するために、点眼後の眼局所の遺伝毒性評価系を確立し、その有用性を検証した。第1章ではウサギに既知の遺伝毒性物質を点眼し、点眼後に最も高濃度で曝露される角膜上皮における遺伝毒性の検出の可否を評価するために、遺伝毒性試験としての実績の多いUDS試験について検討した。第2章ではUDS試験より簡便な方法としてコメットアッセイの有用性を検証するために、点眼後のウサギ角膜上皮細胞を用いたコメットアッセイを検討した。さらにDNA損傷の経時的な変化を評価し、評価系を確立した。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、二本鎖切断を検出する系である γ H2AXを指標とした遺伝毒性評価の角膜への応用を検討した。第4章では代替法や再生医療等の観点から近年着目されている角膜の組織構造に類似した三次元培養角膜上皮モデル（以下、三次元角膜モデル）を使用し、点眼を模倣した条件でのコメットアッセイについて検討した。第5章では、本研究により開発した遺伝毒性評価系の点眼剤開発での活用法に関して提案した。なお、本研究では1章から4章までの実験において、既知の遺伝毒性物質として、DNA損傷の作用機序の異なる8化合物を用いた。活性酸素種生成剤として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、CAS No. 1910-42-5） [Blanco-Ayala et al., 2014] 及び過酸化水素（CAS No. 7722-84-1） [Ray and Husain, 2002], DNAインターカレート剤としてアクリジンオレンジ（CAS No. 10127-02-3）及び臭化エチジウム（以下、EtBr, CAS No. 1239-45-8） [Wilson and Jones, 1981], DNA付加体形成剤の4-ニトロキノリン1-オキシド（以下、4-NQO, CAS No. 56-57-5） [Purohit and Basu, 2000] 及びアクリルアミド（CAS No. 79-06-1） [Besaratina and Pfeifer, 2007], アルキル化剤としてメチルメタンスルホン酸（以下、MMS, CAS No. 66-27-3） [Beranek, 1990], 並びにトポイソメラーゼII阻害剤としてドキソルビシン（以下、Dox, CAS No. 25316-40-9） [Yang et al., 2014] を検討した。

第1章 点眼後のウサギ角膜上皮を用いた UDS 試験法の検討

第1節 緒言

UDS 試験は、DNA 損傷を修復するために行われた DNA 合成を検出する遺伝毒性試験の一つである。すなわち、修復 DNA 合成の際に評価組織における DNA へのトリチウム標識チミジンの取り込みをオートラジオグラフィーで測定することにより遺伝毒性を評価する [Furihata and Matsushima, 2008]。1997 年に経済協力開発機構 (Organisation for Economic Co-operation and Development, 以下, OECD) によって哺乳類肝細胞を用いる *in vivo* UDS 試験のガイドライン (OECD TG 486) が採択された [OECD, 1997]。UDS 試験は主に肝臓を用いて実施されているが、全身投与後の腎臓及び胃等を使用した試験も報告されている [Furihata et al., 1985; Korr et al., 2001]。一方で、局所投与での UDS 試験として、経皮投与後 2 時間のマウス皮膚を用いた方法が報告されている [Mori et al., 1999]。このことから、同じ局所投与である点眼でも UDS 試験が応用できることが示唆された。また、1987 年に Nuss らは、紫外線 (以下, UV) 照射後のウサギ角膜上皮において UDS を検出できることを報告した [Nuss et al., 1987]。すなわち Nuss らの報告は、角膜で遺伝毒性が引き起こされることを示唆している。しかしながら、組織からの消失が早い点眼後の眼局所における遺伝毒性は、その誘発・検出を含めてほとんど知見がない。

以上の背景から、第 1 章では点眼後に最も高濃度で曝露される角膜を用いて、眼局所での遺伝毒性の誘発及び検出を UDS 試験により検討した。具体的には、既知の遺伝毒性物質を動物に単回点眼し、角膜上皮を回収して UDS を検出した。使用動物は、点眼毒性試験で一般的に使用されており [Kurata et al., 2016]、上述の UV 照射後の角膜上皮で UDS が認められたことから [Nuss et al., 1987]、ウサギを選択した。なお、遺伝毒性試験では評価物質に性差が認められていない場合は一般的に雄性動物を用いることから [ICH, 2011]、本検討では性差の無い化学物質を用いたため、雄を選択した。また、Mori らの報告により経皮投与後の皮膚を用いた UDS 試験では、投与後 2 時間で UDS の増加が検出されていることから [Mori et al., 1999]、角膜採取時間は点眼後 2 時間に設定した。

第2節 材料及び方法

第1項 動物

雄性の日本白色種ウサギ (Kbs:JW) を北山ラベス株式会社 (長野, 日本) から購入し, 実験には 3 kg 以上のウサギ (15 週齢以上) を用いた。動物は 20°C~26°C, 40%~75%の相対湿度及び 12 時間の明暗サイクル条件下によって飼育した。また, 実験動物用飼料 (RC4, オリエンタル酵母工業株式会社, 東京, 日本) の給餌及び水の自由摂取により飼育した。実験は財団法人 食品薬品安全センター秦野研究所 (神奈川, 日本) で実施し, 全ての実験手順は試験施設の動物実験に関する実施規程を遵守した。また, 全ての実験は, 試験施設の動物実験倫理委員会 (Institutional Animal Care and Use Committee, 以下, IACUC) の審査を受け, 承認された実験計画書 (動物実験申請番号 310006A, 1100293A, 3100013A, 1100316A, 1160074A, 3160005A) に従って実施した。

第2項 被験物質

パラコート, アクリジンオレンジ, EtBr, アクリルアミド及び 4-NQO を被験物質として使用した。パラコートは東京化成工業株式会社 (東京, 日本) から購入し, それ以外の化合物は富士フィルム和光純薬株式会社 (大阪, 日本) から購入した。

陰性対照として生理食塩液 (日本薬局方 生理食塩液, 光製薬株式会社, 東京, 日本) 及び一般的な点眼剤の基剤としてホウ酸系バッファーを調製し用いた。また, 媒体対照としてジメチルスルホキシド (以下, DMSO, 富士フィルム和光純薬株式会社) を用いた。

第3項 投与

実験 1~実験 3 の 3 回に分けて実施した。

1) 群構成

(1) 実験 1

| 投与物質 | 投与眼 | 投与 | 動物数 |
|---------------|-----|-------------------|-----|
| 陰性対照 (生理食塩液) | 両眼 | 単回点眼 (50 µL/眼) | 2 |
| 0.15%パラコート | | | 2 |
| 0.75%パラコート | | | 2 |
| 3.75%パラコート | | | 2 |
| 0.1%アクリジンオレンジ | | | 2 |
| 0.5%アクリジンオレンジ | | | 2 |
| 2.5%アクリジンオレンジ | | | 2 |
| 0.25% EtBr | | | 2 |
| 0.5% EtBr | | | 2 |
| 1% EtBr | | | 2 |
| 陽性対照 | | | 両眼 |

パラコート、アクリジンオレンジ及び EtBr は、注射用水（日本薬局方 注射用水，光製薬株式会社）に溶解させた。パラコートは初代ラット肝細胞を用いた *in vitro* UDS 試験で 5 mM (約 0.13%) の濃度で UDS の増加が認められたことから [Tseng et al., 1995]，本検討ではその近似濃度である 0.15% を低用量として設定し，公比 5 で中用量を 0.75%，高用量を 3.75% とした。アクリジンオレンジは 2.5% が水への溶解限度値であったことから，2.5% を高用量として設定し，公比 5 で中用量を 0.5%，低用量を 0.1% とした。EtBr は 1% が水への溶解限度値であったことから，1% を高用量として設定し，公比 2 で中用量を 0.5%，低用量を 0.25% とした。

(2) 実験 2

| 投与物質 | 投与眼 | 投与 | 動物数 |
|---------------|-----|---------------------------|-----|
| 陰性対照 (生理食塩液) | 両眼 | 単回点眼 (50 μ L/眼) | 2 |
| 媒体対照 (DMSO) | | | 2 |
| 5%パラコート | | | 2 |
| 10%パラコート | | | 2 |
| 20%パラコート | | | 2 |
| 40%パラコート | | | 2 |
| 2.5%アクリジンオレンジ | | | 2 |
| 5%アクリジンオレンジ | | | 2 |
| 陽性対照 | 両眼 | 1 J/cm ² UV 照射 | 1 |

実験 1 において、パラコート及びアクリジンオレンジ投与群では UDS の有意な増加が認められなかったため、これらの被験物質をより高濃度で投与した。パラコートは、40%を高用量として設定し、公比 2 で計 4 用量 (5%, 10%, 20%及び 40%) となるように、注射用水に溶解させた。アクリジンオレンジは DMSO への溶解限度値が 5%であったことから、5%を高用量として設定し、公比 2 で低用量を 2.5%とした。

(3) 実験 3

| 投与物質 | 投与眼 | 投与 | 動物数 |
|-------------------|-----|------------------------|-----|
| 陰性対照 (一般的な点眼剤の基剤) | 両眼 | 単回点眼 (50 μ L/眼) | 2 |
| 媒体対照 (DMSO) | | | 2 |
| 3%アクリルアミド | | | 2 |
| 2% 4-NQO | | | 2 |
| 陽性対照 (5% EtBr) | | | 1 |

実験 1 及び実験 2 で用いた遺伝毒性物質とは異なる遺伝毒性の作用機序を有するアクリルアミド及び 4-NQO についても検討した。アクリルアミドは Hep G2 細胞を用いた *in vitro* コメットアッセイで 2.5 mM (約 0.018%) の濃度で DNA 損傷の増加が認められている [Lamy et al., 2008]。また、先だって実施したサルの眼刺激性試験では 10%アクリルアミドは軽度な眼刺激性が認められ、

3%では眼刺激性が認められなかった。これらのことから、投与可能な上限濃度として 3%を選択し、注射用水で溶解させた。4-NQO はマウスの皮膚を用いた *in vivo* コメットアッセイで 0.1%の用量で DNA 損傷の増加が認められていることから [Toyoizumi et al., 2011], その 20 倍高い 2%を設定し、DMSO に溶解させた。

2) 投与方法

投与前に Heine alpha 検眼鏡 (Heine Optotechnik, ギルヒング, ドイツ) を用いてウサギの両眼を観察し、角膜、虹彩及び結膜に異常がないことを確認した。

実験 1 及び実験 2 においては各投与液の眼刺激性が不明なため、点眼前にケタミン (ケタラール®筋注用 500 mg, 第一三共株式会社, 東京, 日本) 及びキシラジン (セラクター®2%注射液, バイエルメディカル株式会社, 東京, 日本) を 4:1 の割合に混合し、ウサギの背部筋肉または臀部へ混合液を筋肉内注射 (5 mL/匹) することにより、全身麻酔を施した。パラコート, アクリジンオレンジ及び EtBr の各投与液をウサギに 1 眼あたり 50 µL の投与量で両眼に単回点眼した。陰性対照として生理食塩液を同様に点眼した。投与後は眼表面の乾燥を防止するため、サージカルテープを眼瞼に貼り、閉眼させた。

実験 3 では 4-NQO の投与前に、塩酸メドミジン (ドミツール®, 日本全薬工業株式会社, 福島, 日本), ミダゾラム (ドルミカム®注射液 10 mg, アステラス製薬株式会社, 東京, 日本) 及び酒石酸ブトルファノール (ベトルファール®, Meiji Seika ファルマ株式会社, 東京, 日本) の混合液 (5:4:1 の割合に混合) を調製し、ウサギの背部または臀部に筋肉内注射 (1.2 mL/kg) し、全身麻酔を施した。2% 4-NQO をウサギに 1 眼あたり 50 µL の投与量で両眼に単回点眼し、媒体対照として DMSO を同様に投与した。投与後は眼表面の乾燥を防止するため、サージカルテープを眼瞼に貼り、閉眼させた。

実験 3 において 3%アクリルアミドは眼刺激性がみられなかったため、非麻酔下の動物に投与した。3%アクリルアミドをウサギに 1 眼あたり 50 µL の投与量で両眼に単回点眼し、眼瞼を 1 秒間閉眼させた。陰性対照として一般的な点眼剤の基剤を同様に投与した。

陽性対照として実験 1 及び実験 2 では UV 照射群を設けた。照射前に、ウサギをペントバルビ

タールナトリウム(ソムノペンチル[®], 共立製薬株式会社, 東京, 日本)の静脈内投与(30~45 mg/kg)によって全身麻酔を施し, 腹臥位に安定させた。ウサギの頭部の両側に UV-C センサー (UD-25, 株式会社トプコン, 東京, 日本)を接続した紫外線強度計 (UVR-2, 株式会社トプコン)を設置した。Nuss らの論文を参考にして [Nuss et al., 1987], 両眼の角膜に UV ランプ(ピーク波長 254 nm)を 1 J/cm² (約 2000 μW/cm², 約 500 秒間)となるように照射した。実験 1 において 1% EtBr は UDS の有意な増加を示したことから, 実験 3 ではその 5 倍高く水への溶解限度値である 5% EtBr を陽性対照として設定し, 非麻酔下のウサギに 1 眼あたり 50 μL の投与量で両眼に単回点眼した。

被験物質投与群及び陰性対照群及び媒体対照群は 1 群当たり 2 匹のウサギ (4 眼/群) を使用し, 陽性対照群は 1 匹のウサギ (2 眼/群) を使用した。

第 4 項 UDS 試験

1) オートラジオグラフィー標本作成

UV 照射群を除いて, 投与後 2 時間に両眼の角膜及び結膜を肉眼的に観察した。その後, ペントバルビタールナトリウムの静脈内への過剰投与によりウサギを安楽死させた。UV 照射群は照射後すぐに安楽死させた。

安楽死後のウサギから両眼の眼球を摘出し, 角膜を採取した。採取した角膜は, 37 MBq/mL のトリチウム標識チミジン (比放射能: 3027~3108 GBq/mmol) (PerkinElmer, Inc., ウェルズリー, マサチューセッツ州, アメリカ合衆国) を 1/100 量混合 (最終濃度: 370 kBq/mL) した MEM 培地 (日水製薬株式会社, 東京, 日本) 中に浸し, CO₂ インキュベーター内 (約 5% CO₂, 約 37°C) で 4 時間培養した。培養後の角膜を, 0.01 mol/L リン酸緩衝液で洗浄し, 2%パラホルムアルデヒド及び 1.25%グルタルアルデヒドを混合した 0.1 mol/L リン酸緩衝液で 3 時間固定した。角膜を 6 × 2 mm 程度となるようにトリミングし, 0.1 mol/L リン酸緩衝液で一晩以上洗浄した。その後, 2% 酸化オスミウムを混合した 0.1 mol/L リン酸緩衝液で後固定し, 段階的アルコールを用いて組織を脱水後, エポキシ系樹脂に 2 日間包埋し, 約 1.5 μm の厚さの組織切片を作製した。約 40°C に加温した蒸留水に 1 : 5 となるようにオートラジオグラフィー用原子核乳剤 (Type NTB, Eastman Kodak, ロチェスター, ニューヨーク州, アメリカ合衆国) を溶解して, 組織スライドを浸し, 暗

箱中に保管して冷蔵庫内（約 3°C~7°C）で 10 日間露出した。約 18°C に冷却した現像液（Kodak Dektol, Eastman Kodak）で現像し、定着液（Kodak fixer, Eastman Kodak）で定着後、水洗、乾燥してトルイジンブルー染色を行った。

2) オートラジオグラフィー標本による細胞観察

陰性対照群の 4 眼の角膜上皮において光学顕微鏡を用いて手動計数した。明らかに DNA 複製期と判断される細胞（10 個以上の核グレインを有する細胞）80 細胞（20 細胞/眼 × 4 眼）の核グレイン数を計数した。これら核グレイン数の平均値及び標準偏差（standard deviation, 以下, SD）を算出し、平均-2SD（小数点以下を切り上げ）以上の核グレイン数を持つ細胞を HLCs（heavily labeled cells）とした。

次いで、明らかにバックグラウンドと判断される細胞（4 個以下の核グレインを有する細胞）800 細胞（200 細胞/眼 × 4 眼）の核グレイン数を計数し、平均値及び SD を算出して平均+2SD（小数点以下を切り捨て）以下の核グレイン数をバックグラウンドグレイン数とした。

したがって、UDS を示す細胞（sparsely labeled cells, 以下, SLCs）は、バックグラウンドグレイン数より多く、HLCs より少ない核グレインを有する細胞とした。

上記の基準に基づき、実験 1 及び実験 2 では 1 眼につき 500 細胞あたりの SLCs 数を計数し、実験 3 では 1 眼につき 1000 細胞あたりの SLCs 数を計数した。なお、角膜上皮の全ての層で広範囲に病理組織学的所見が認められた場合は、そのサンプルは SLCs の観察から除外した。

第 5 項 統計解析

SLCs（%）の平均値及び SD を求めた。各データは正規分布であることを仮定した。実験 1 及び実験 2 では、陰性対照または媒体対照群と各被験物質投与群の間で、Dunnett の多重比較検定を実施した [Butterworth et al., 1987]。対照群として実験 1 の被験物質投与群及び実験 2 のパラコート投与群では陰性対照群を用い、実験 2 のアクリジンオレンジ投与群では媒体対照群を用いた。実験 3 では F 検定を実施し、その後陰性対照または媒体対照群と各被験物質投与群の間で、Student の t 検定または Welch の t 検定を実施した。対照群としてアクリルアミド投与群では陰性対照群

を用い、4-NQO 投与群では媒体対照群を用いた。なお、有意水準は片側 5%とした。統計解析は JMP（バージョン 13.2.1, SAS Institute Japan Ltd., 東京, 日本）を用いて実施した。

第3節 結果

1) 実験 1

(1) 前眼部観察

陰性対照及び被験物質投与群のいずれの動物においても、投与後に角膜及び結膜の肉眼的変化は認められなかった。

(2) 病理組織学的検査

結果を Table 1-1 に、代表的な病理組織像を Figure 1-1 a)～e)に示す。

陰性対照群、パラコート及び EtBr 投与群では、角膜上皮に病理組織学的変化は認められなかった。アクリジンオレンジ投与群では、0.5%及び 2.5%の用量で角膜上皮細胞の細胞質の軽度な淡明化及び角膜上皮細胞のごく軽度な空胞変性が認められ、2.5%の用量で角膜上皮表層細胞のごく軽度な剥離が認められた。0.1%の用量では、角膜上皮に病理組織学的変化は認められなかった。陽性対照群では、角膜上皮の表層部に中等度の変性/壊死が認められた。全ての群で SLCs の観察が可能な程度の病理組織学的変化であったため、全例を観察した。

(3) UDS 試験

結果を Figure 1-2 a)に、代表的な UDS 像を Figure 1-3 a)～c)に示す。

陰性対照群において 10 個以上の核グレインを有する 80 細胞の平均グレイン数は 22.6 個、SD は 5.4、 $\text{平均値} - 2\text{SD}$ は 11.8 であることから、1 細胞あたり 12 個以上の核グレインを有する細胞を HLCs とした。4 個以下の核グレインを有する 800 細胞の平均グレイン数は 1.2 個、SD は 0.5、 $\text{平均値} + 2\text{SD}$ は 2.2 であることから、1 細胞あたり 2 個以下の核グレインを有する細胞をバックグラウンドグレイン数とした。したがって、SLCs は 1 細胞あたり 3～11 個の核グレインを有する細胞と定義した。

陰性対照群では $1.3\% \pm 0.4\%$ の SLCs が観察された。陽性対照群では 24.4% の SLCs が観察され、陽性対照の適切性が確認できた。パラコート及びアクリジンオレンジ投与群では、陰性対照群と比較していずれの用量においても SLCs の有意な増加は認められなかった。EtBr 投与群では、0.25%～1% の全ての用量で陰性対照群と比較して SLCs が有意に増加し、用量依存性も認められた。

2) 実験 2

(1) 前眼部観察

40%パラコート投与群において涙液の貯留が顕著に認められた。それ以外の陰性対照、媒体対照及び被験物質投与群においては、投与後に角膜及び結膜の肉眼的変化は認められなかった。

(2) 病理組織学的検査

結果を Table 1-2 に、代表的な病理組織像を Figure 1-1 f)～h) に示す。

陰性対照及び媒体対照群では、角膜上皮に病理組織学的変化は認められなかった。パラコート投与群において、5%の用量では病理組織学的変化は認められなかったが、10%～40%の用量で角膜上皮細胞のごく軽度な肥大が認められ、20%及び 40%の用量では角膜上皮表層細胞のごく軽度な変性/壊死が認められた。アクリジンオレンジ投与群では、2.5%及び 5%の用量でごく軽度～軽度の角膜上皮細胞の細胞質の淡明化、角膜上皮細胞の空胞変性及び角膜上皮表層細胞の変性/壊死が認められた。また、陽性対照群で、角膜上皮の表層部に中等度の変性/壊死が認められた。全ての群で SLCs の観察が可能な程度の病理組織学的変化であったため、全例を観察した。

(3) UDS 試験

結果を Figure 1-2 b) に、代表的な UDS 像を Figure 1-3 d)～f) に示す。

陰性対照群において 10 個以上の核グレインを有する 80 細胞の平均グレイン数は 22.6 個、SD は 5.8、 $\text{平均値} - 2\text{SD}$ は 11.0 であることから、1 細胞あたり 11 個以上の核グレインを有する細胞を HLCs とした。4 個以下の核グレインを有する 800 細胞の平均グレイン数は 1.2 個、SD は 0.4、 $\text{平均値} + 2\text{SD}$ は 2.0 であることから、1 細胞あたり 2 個以下をバックグラウンドグレイン数とし

た。したがって、SLCs は 1 細胞あたり 3~10 個の核グレインを有する細胞と定義した。

陰性対照群では $1.5\% \pm 0.3\%$ 、媒体対照群では $1.6\% \pm 0.6\%$ 、陽性対照群では 20.9% の SLCs が観察された。パラコート投与群では、10%~40% の用量で陰性対照群と比較して有意に SLCs が増加し、用量依存性も認められた。アクリジンオレンジ投与群では、5% の用量で媒体対照群と比較して有意に SLCs が増加した。

3) 実験 3

(1) 前眼部観察

陰性対照、陽性対照及び 3% アクリルアミド投与群では投与後に角膜及び結膜の肉眼的変化は認められなかった。一方、2% 4-NQO 投与群では、軽度な角膜の肥厚及び結膜の浮腫が認められ、媒体対照群では軽度な結膜浮腫が認められた。

(2) 病理組織学的検査

結果を Table 1-3 に、代表的な病理組織像を Figure 1-1 i)~k) に示す。

陰性対照、媒体対照、陽性対照及び 3% アクリルアミド投与群では、いずれの動物においても角膜上皮に病理組織学的変化は認められなかった。

2% 4-NQO 投与群では、角膜上皮にごく軽度または中等度の変性/壊死、ごく軽度の核の腫大及び軽度の核小体の増加が認められた。また、1 眼で中等度の角膜上皮の剥離が認められたことから、SLCs の観察は困難だと判断し、該当サンプルを除いた 3 眼において SLCs の観察を実施した。

(3) UDS 試験

結果を Figure 1-2 c) に、代表的な UDS 像を Figure 1-3 g)~i) に示す。

陰性対照群において 10 個以上の核グレインを有する細胞 80 細胞の平均グレイン数は 21.0 個、SD は 5.9 であり、 $\text{平均値} - 2\text{SD}$ は 9.2 であることから、1 細胞あたり 10 個以上の核グレインを有する細胞を HLCs とした。4 個以下の核グレインを有する細胞 800 細胞の平均グレイン数は 1.2 個、SD が 0.5 であり、 $\text{平均値} + 2\text{SD}$ が 2.2 であることから、1 細胞あたり 2 個以下をバックグラウ

ンドグレイン数とした。したがって、SLCsは1細胞あたり3~9個の核グレインを有する細胞と定義した。

陰性対照群では $0.9\% \pm 0.2\%$ 、媒体対照群では $0.8\% \pm 0.1\%$ 、及び陽性対照群では4.9%のSLCsが観察された。3%アクリルアミド投与群では、陰性対照群と比較してSLCsの統計学的に有意な差は認められなかった。2%4-NQO投与群では、媒体対照群と比較して有意なSLCsの増加が認められた。

第4節 考察

OECD TG 486では、UDSの測定法として核に分布する銀粒子である核粒子、及び核と等面積の細胞質に分布する銀粒子として細胞質粒子数を測定し、核粒子数から細胞質粒子数を差し引くことによって正味核粒子数を計算するとある [OECD, 1997]。本検討において、細胞質内に認められたグレインはわずかであるため、核粒子数に影響を与えないと判断したため、正味核粒子数は測定しなかった。また、SLCsのグレイン数の範囲を算出する基準として、外れ値の一定数を除外する方法があるが（例えば15個以上のグレイン数を有する細胞はHLCsなど）、*in vivo* 角膜UDS試験は本検討が初めてであり、事前情報が無く設定が困難であった。そこで、データのばらつき(SD)から基準を算出することが適切と考え、HLCsとバックグラウンドの各々について平均値 $\pm 2SD$ の範囲を設定した。以上のことから、ガイドラインとは測定方法が異なるものの、本基準を基にSLCsの測定を実施した。

Nussらの論文では254 nmのUVを $0.5\sim 1 \text{ J/cm}^2$ 照射したウサギの角膜上皮で約19%のSLCsが認められている [Nuss et al., 1987]。本検討において、陽性対照として同様にウサギの角膜に 1 J/cm^2 のUV（ピーク波長：254 nm）を照射したところ、実験1~実験3を通して約20%~24%のSLCsが認められたことから、Nussらの結果を再現できていると判断した。よってUDS試験は角膜の遺伝毒性を検出できる評価系であることを確認した。

本検討では活性酸素種生成剤、DNAインターカレート剤及びDNA付加体形成剤の3種類の遺伝毒性物質を用いて、点眼後のウサギの角膜上皮における遺伝毒性をUDS試験により評価した。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化合物でSLCsの有意な増加

が認められ、一部の化合物では用量反応性も認められた。活性酸素種生成剤のパラコートは、ヒト胎児肺細胞を用いた *in vitro* UDS 試験、及び腹腔内投与後のマウスの骨髄細胞または末梢血細胞を用いた *in vivo* 小核試験で遺伝毒性を検出した [Tanaka and Amano, 1985; Melchiorri et al., 1998]。DNA インターカレート剤のアクリジンオレンジ及び EtBr は、ヒト及びげっ歯類の初代肝細胞を用いた *in vitro* UDS 試験、並びに腹腔内投与後のマウスの脾臓細胞を用いた *in vivo* 小核試験で遺伝毒性を検出した [Benning et al., 1994; Schehrer et al., 2000]。DNA 付加体形成剤の 4-NQO は、ラットの初代肝細胞を用いた *in vitro* UDS 試験、腹腔内投与後のラットの骨髄細胞を用いた *in vivo* 小核試験、及び経皮投与後のマウスの皮膚細胞を用いた *in vivo* コメットアッセイで遺伝毒性を検出した [Oshiro et al., 1987; Fiedler et al., 2010; Toyozumi et al., 2011]。上述のように、これらの化合物は他の組織を用いた *in vivo* 試験または *in vitro* 試験で遺伝毒性が検出されており、本検討においてもこれらの化合物の遺伝毒性を検出することができた。

本試験において、遺伝毒性物質を投与後 2 時間の角膜で遺伝毒性が生じ、UDS 試験がそれを検出できることが明らかとなった。一般的に角膜中の薬物濃度は、単回点眼後 0.25~0.5 時間で最も高くなることが知られている [Fujita et al., 2008; Patel et al., 2013; Iyer et al., 2015]。また、*in vitro* コメットアッセイにおいて、比較的短時間（15~60 分）の遺伝毒性物質の曝露でも DNA 損傷が検出されている [Wu et al., 2011; Ye et al., 2011; Sakaki et al., 2015]。さらに、アルキル化剤を用いた *in vitro* コメットアッセイでは、一本鎖 DNA 切断の修復は曝露後 1~4 時間で起きている [Fortini et al., 1996]。これらの報告は、DNA 損傷が遺伝毒性物質を曝露後比較的短期間で発生し、数時間後に修復されることを意味している。今回の実験では、遺伝毒性物質を単回点眼してから 2 時間後に角膜を採取しており、角膜採取のタイミングは DNA 損傷及び UDS が誘導されているタイミングであると考えられる。これらの理由から、本実験条件における投与後 2 時間の組織採取のタイミングは、薬物曝露及び修復のタイミングの観点から適切であると判断した。

一方で、DNA 付加体形成剤のアクリルアミド投与群では、投与可能な上限濃度を点眼したが SLCs の増加は認められなかった。アクリルアミドはシトクロム P450 2E1 によって代謝され、その代謝物であるグリシドアミドが DNA 付加体を形成することが知られている [Besaratnia and Pfeifer, 2007]。しかしながら、角膜における薬物代謝酵素の mRNA レベルは、肝臓と比較すると

著しく低い [Zhang et al., 2008]。したがって、角膜上皮ではアクリルアミドはほとんど代謝されず、DNA 損傷を誘発しなかった可能性がある。

本検討では一部の化合物において病理組織学的変化が認められた。*In vitro* UDS 試験では、細胞毒性により核グレイン量を増加させることが報告されている [Madle et al., 1994]。また、OECD TG 486 では、UDS の有意義な評価をするために形態学的に正常な細胞を十分に含むようにする必要があり、明らかな細胞毒性（濃縮した核、放射性標識の低下など）の徴候が無いか顕微鏡下で評価する必要があると記載されている [OECD, 1997]。本検討では、パラコート、アクリジンオレンジ及び4-NQO 投与群で角膜上皮に病理組織学的変化が認められたものの、病理所見が認められた細胞は限定的で、ほとんどの細胞は形態学的に正常であった。したがって、本検討では形態学的に正常な細胞を測定することでUDS を評価できていると判断した。

本章の結論として、UDS 試験は、既知の遺伝毒性物質（パラコート、アクリジンオレンジ、EtBr 及び4-NQO）を単回点眼後のウサギの角膜上皮においてDNA 損傷を検出できることを見出した。点眼後の眼局所での遺伝毒性反応を評価した方法は、調べた限り初めての報告である。本検討結果は点眼後の角膜上皮を用いたUDS 試験が点眼剤開発における眼表面での遺伝毒性の *in vivo* 評価のための有用なツールの1つに成り得ることを示唆している。

第2章 点眼後の角膜上皮細胞を用いたコメットアッセイ法の検討

第1節 緒言

第1章では、点眼後の眼局所の遺伝毒性を評価するために、ウサギの角膜上皮を用いた *in vivo* UDS 試験（以下、*in vivo* 角膜 UDS 試験）を実施し、複数の作用機序の遺伝毒性物質における UDS の増加を検出することができた。しかしながら、UDS 試験はトリチウム標識チミジンのような放射性同位体を用いるため実施施設が限定され、利便性の面で課題がある。そこで、放射性同位体を使用せずに簡便に遺伝毒性を検出できる方法としてコメットアッセイに注目した。

コメットアッセイは、細胞をアルカリ条件下で電気泳動することにより、DNA との直接相互作用、アルカリ不安定部位または DNA 除去修復によって生じる一過性の DNA 鎖切断を検出できる [Singh et al., 1988; Anderson et al., 1998]。電気泳動によって移動する DNA 量は、個々の細胞の DNA 損傷のレベルを示す。コメットアッセイは 1984 年に Ostling らによって二本鎖切断を検出する方法として、中性付近で電気泳動する方法が報告された [Ostling and Johanson, 1984]。その後、1998 年に Singh らによってアルカリ条件下で電気泳動する方法（アルカリコメットアッセイ）が報告され [Singh et al., 1988]、本方法が広く実施されている。2016 年には哺乳類の *in vivo* アルカリコメットアッセイのガイドライン（OECD TG 489）が採択された [OECD, 2016]。コメットアッセイは主に肝臓を用いて実施することが多いが、胃、空腸、腎臓、肺、膀胱及び皮膚等を用いた試験も報告されている [Sasaki et al., 1998; Brendler-Schwaab et al., 2005; Toyoizmi et al., 2011; Kraynak et al., 2015]。眼局所に関してはヒト角膜上皮細胞などの培養細胞を用いた *in vitro* 試験がいくつか報告されているが [Wu et al., 2011; Ye et al., 2011; Sakaki et al., 2015]、点眼後の眼局所における *in vivo* コメットアッセイは報告されていない。一方で、ウサギの眼球を用いた初代角膜上皮細胞を使用した *in vitro* コメットアッセイが報告されていることから [Rogers et al., 2004]、眼球から角膜上皮細胞を採取する技術を利用できると考えた。

また、組織採取時間に関して、OECD TG 489 では血漿または組織濃度が最大値に達する時間（以下、 T_{max} ）などの薬物動態のデータから決定する必要があると記載されている [OECD, 2016]。薬物動態のデータがない場合は、反復投与の最終投与後 2~6 時間、または単回投与後の 2~6 時間

及び 16～26 時間に組織を採取することが推奨されている [OECD, 2016]。肝臓や胃などを使用した *in vivo* コメットアッセイでは、全身投与後 3 時間（及び 24 時間）に組織を採取することが多い [Brendler-Schwaab et al., 2005]。しかしながら、点眼では点眼剤が眼表面に直接曝露されるため、眼組織中の T_{max} は経口投与後の血液中の T_{max} よりも早い場合がある。そのため、眼表面の遺伝毒性を評価するために、適切な採取時間を設定する必要があると考えた。

以上のことから、第 2 章では *in vivo* 角膜 UDS 試験に代わる点眼後の眼局所の遺伝毒性評価系としてコメットアッセイの有用性を検討した。初めに、第 1 章の *in vivo* 角膜 UDS 試験において角膜上皮の遺伝毒性を検出できた投与後 2 時間の条件で、コメットアッセイが DNA 損傷を検出できるかどうかを検討した（以下、*in vivo* 角膜コメットアッセイ）。次に、適切な角膜採取時間を決定するために、点眼後の角膜における DNA 損傷を経時的に評価した。動物種は *in vivo* 角膜 UDS 試験でも使用した雄性のウサギを選択した。

第 2 節 *In vivo* 角膜コメットアッセイの検討

第 1 項 材料と方法

1) 動物

雄性の日本白色種ウサギ（Kbs:JW）を北山ラベス株式会社から購入し、11～12 週齢のウサギを実験に用いた。動物は 19°C～25°C、40%～70%の相対湿度及び 12 時間の明暗サイクル条件下によって飼育した。また、実験動物用飼料（ラボ R ストック、日本農産工業株式会社、神奈川、日本）の制限給餌（100 g/日）及び水の自由摂取より飼育した。本実験は千寿製薬株式会社（大阪、日本）で実施し、全ての実験手順は試験施設の動物実験に関する実施規程を遵守した。また、全ての実験は試験施設の IACUC の審査を受け、承認された実験計画書（動物実験申請番号 20191025-01）に従って実施した。

2) 被験物質

第 1 章で検討した EtBr、パラコート、アクリルアミド及び 4-NQO を被験物質として使用した。加えて *in vivo* アルカリコメットアッセイで陽性対照物質として使用されている MMS も検討した。

全ての試薬は富士フィルム和光純薬株式会社から購入した。なお、第1章で検討したアクリジンオレンジは EtBr と同じ遺伝毒性の作用機序を示すため、本検討からは除外した。

陰性対照として生理食塩液（株式会社大塚製薬工場，徳島，日本）及び 5% DMSO を含む生理食塩液（5% DMSO）を用いた。

3) 投与

(1) 群構成

実験 1～実験 3 の 3 回に分けて実施した。

a) 実験 1

| 投与物質 | 投与眼 | 投与 | 動物数 |
|-------------|-----|-------------------|-----|
| 陰性対照（生理食塩液） | 両眼 | 単回点眼 (50 µL/眼) | 2 |
| 1%パラコート | | | 2 |
| 5%パラコート | | | 2 |
| 0.25% EtBr | | | 2 |
| 1% EtBr | 右眼 | | 4 |

パラコート及び EtBr を生理食塩液で溶解させた。パラコートは *in vivo* 角膜 UDS 試験において角膜上皮に病理組織学的変化がみられなかった 5%を高用量として、公比 5 で 2 用量設定した。EtBr は *in vivo* 角膜 UDS 試験で、5%の用量で角膜上皮に病理組織学的変化が認められなかった。一方で、眼刺激性を評価した結果、ウサギに 1% EtBr を単回点眼するとごく軽度な眼刺激性が認められたため、1%を高用量として公比 4 で 2 用量設定した。

b) 実験 2

| 投与物質 | 投与眼 | 投与 | 動物数 |
|-------------|-----|-------------------|-----|
| 陰性対照（生理食塩液） | 両眼 | 単回点眼 (50 µL/眼) | 2 |
| 0.6% MMS | | | 2 |
| 3% MMS | | | 2 |
| 0.6%アクリルアミド | | | 2 |
| 3%アクリルアミド | | | 2 |

MMS 及びアクリルアミドを生理食塩液で溶解させた。MMS は眼刺激が認められなかった 3% を高用量として、公比 5 で 2 用量設定した。アクリルアミドは *in vivo* 角膜 UDS 試験において、角膜上皮に病理組織学的変化がみられなかった 3% を高用量として、公比 5 で 2 用量設定した。

c) 実験 3

| 投与物質 | 投与眼 | 投与 | 動物数 |
|----------------|-----|------------------------|-----|
| 陰性対照 (5% DMSO) | 右眼 | 単回点眼 (50 μ L/眼) | 4 |
| 0.2% 4-NQO | | | 4 |
| 1% 4-NQO | | | 4 |

5% DMSO を用いて 4-NQO の懸濁液を調製した。4-NQO は *in vivo* 角膜 UDS 試験において、2% の用量で角膜上皮にごく軽度または中等度の変性/壊死が認められた。そこで、5% DMSO 中での分散性が高く、点眼可能な用量である 1% を高用量として、公比 5 で 2 用量設定した。なお、ウサギを用いた眼刺激性を評価した結果、30% DMSO は投与直後に閉瞼等の眼刺激性が認められ、5% DMSO はごく軽度な眼刺激性が認められたため 4-NQO の溶媒として 5% DMSO を選択した。

(2) 投与方法

投与前に肉眼的または細隙灯顕微鏡 (SL130, カールツァイスメディテック, イェーナ, ドイツ) を用いてウサギの両眼を観察し、虹彩、角膜及び前房に異常がないことを確認した。

ウサギに 1 眼あたり 50 μ L の投与量で単回点眼し、投与後すぐに強制的に数回瞬目させた。1% EtBr, 0.2% 及び 1% 4-NQO 並びに陰性対照の 5% DMSO はごく軽度な眼刺激性がみられたため、動物倫理的の観点から、これらの投与液は 4 匹のウサギの片眼 (右眼) に投与した (4 眼/群)。それ以外の被験物質及び陰性対照の生理食塩液は眼刺激性がみられなかったため、2 匹のウサギの両眼に投与した (4 眼/群)。3 眼をコメットアッセイに使用し、残りの 1 眼を病理組織学的検査に使用した。

4) コメットアッセイ

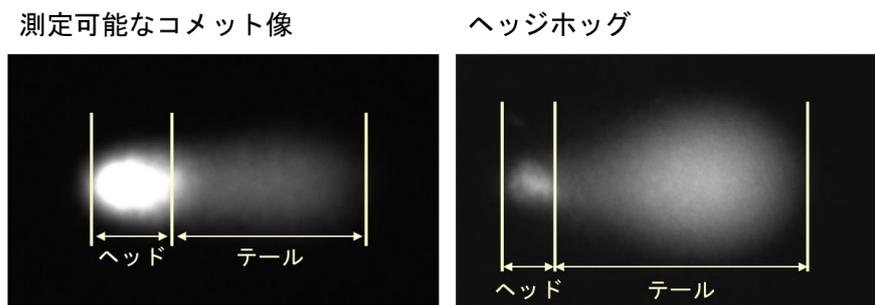
投与後 30 分に肉眼的または細隙灯顕微鏡を用い、ウサギの結膜、虹彩及び角膜を観察した。角膜上皮障害に関してはフルオレセイン（フローレス眼検査用試験紙 0.7mg, あゆみ製薬株式会社, 東京, 日本）で染色することにより眼刺激性を評価した。

投与後 2 時間に、チオペンタールナトリウム（ラボナール®注射用, ニプロ ES ファーマ株式会社, 大阪, 日本）をウサギの耳静脈内へ過剰投与することにより安楽死させた。安楽死後のウサギから眼球を摘出し、角膜を採取した。採取した角膜を、1.2 unit/mL の Dispase II (Roche Diagnostics GmbH, マンハイム, ドイツ) を混合した 10%ウシ血清含有 MEM 培地中に浸し、4°C で一晩静置した。一晩処理した角膜を新しい培地中に移し、ゴルフ刀を用いて角膜上皮細胞を剥離した。採取した角膜上皮細胞を 140 × g で 5 分間遠心分離した。上清を除去後、0.25%トリプシン（サーモフィッシャーサイエンティフィック株式会社, 東京, 日本）を加え、37°C で 10 分間処理した。その後、70 μm ポアサイズのセルストレーナーに通し凝集した細胞を除去後、140 × g で 5 分間遠心分離した。上清を除去後、PBS で再懸濁し、約 2 × 10⁵ 細胞/mL の細胞懸濁液を調製した。

約 85°C で融解させた 1% 低融点アガロース (LMAgrose, Trevigen, Inc., ゲイザースバーグ, メリーランド州, アメリカ合衆国) を約 45°C に冷却した後に、270 μL のアガロースに調製した細胞懸濁液を 30 μL 加え、混合した。その後、30 μL の混合液をコメットアッセイ用 20 ウェルスライド (CometSlide HT, Trevigen, Inc.) の各ウェルに添加し、アガロースが固まるまで 4°C で静置した。冷却した lysis solution [25 mM 塩化ナトリウム, 100 mM エチレンジアミン四酢酸二ナトリウム二水和物 (EDTA·2Na), 10 mM トリス (ヒドロキシメチル) アミノメタン (Tris) 及び 1% (v/v) ポリエチレングリコールモノ-*p*-イソオクチルフェニルエーテル, pH 10] にスライドを浸し、4°C で 1 時間静置した。その後、スライドを alkaline unwinding solution (200 mM 水酸化ナトリウム及び 1 mM EDTA, pH > 13) に浸し、室温で 20 分間静置した。冷却した同溶液を用い、1 V/cm で 30 分間電気泳動した。電気泳動後のスライドを超純水で 2 回洗浄後、70%エタノールに 10 分間浸した。その後、アガロースゲルを乾燥させ、観察まで室温で遮光保存した。観察時に Tris-EDTA バッファー (pH 7.5) を用いて 1 : 1000 の割合で希釈した SYBR Green I solution (サーモフィッシャーサイエンティフィック株式会社) をスライドの各ウェルに添加し、4°C で 30 分間染色した。そ

の後、ProLong Gold（サーモフィッシャーサイエンティフィック株式会社）及びカバーガラスを用いて封入した。

コメット像は蛍光顕微鏡（BX51, オリンパス株式会社, 東京, 日本）（NIBA フィルター; excitation 460~495 nm, emission 510~550 nm 及び対物レンズ; 10 倍）及び CCD カメラ（scA1300-32fm, Basler AG, アーレンスブルク, ドイツ）を用いて観察した。測定には Comet assay IV ソフトウェア（バージョン 4.3.2, Perspective Instrument Ltd, サフォーク, イギリス）を用いた。まず、1 眼につき 100 細胞あたりのヘッジホッグ数を計数した。ヘッジホッグは小さい、または存在しないヘッドと拡散した大きなテールからなる細胞と定義されている（下図参照） [OECD, 2016]。次いで、1 眼あたり測定可能な 100 細胞のコメット（隣接している細胞と干渉せずに、ヘッドとテールが明確に定められるもの）について Comet assay IV ソフトウェアを用いて DNA 損傷の指標である % tail DNA [コメットの全輝度（ヘッド+テール）に対するテールの輝度の割合に相当] を算出した。1 群（300 細胞/群）あたりの % tail DNA 値及びヘッジホッグ数の平均値及び SD を算出した。



測定可能なコメット像及びヘッジホッグ

5) 病理組織学的検査

摘出した眼球（1 眼/群）を 1%ホルムアルデヒド及び 2.5%グルタルアルデヒドを混合した 0.1 mol/L リン酸緩衝液で 4°C で一晩固定し、10%中性緩衝ホルマリン液で後固定した。段階的アルコールを用いて組織を脱水し、パラフィンに包埋した。その後、厚さ約 3 μm の組織切片を作成し、ヘマトキシリン及びエオジン（以下、HE）で染色した。病理組織像は、BX51 顕微鏡、DP74 デジタルカメラ（オリンパス株式会社）及び cellSens Standard イメージングソフトウェア（バージョン 2.3, オリンパス株式会社）を使用して撮影した。

6) 統計解析

各データは正規分布であることを仮定して統計解析をした。陰性対照群と各被験物質群との間で、Dunnett の多重比較検定を実施した [Uno et al., 2015; 日本製薬工業会, 2015]。なお、有意水準は片側 5%とした。統計解析は JMP (バージョン 13.2.1) を用いて実施した。

第 2 項 結果

1) 前眼部観察

投与後 30 分にウサギの眼を観察した結果、1% EtBr, 3% MMS, 0.6%アクリルアミド, 0.2% 4-NQO 及び投与群の各 1 眼で角膜にごく軽度なフルオレセイン染色斑が認められた。また、1% EtBr 投与眼でごく軽度な角膜混濁が認められた。それ以外の個体では被験物質投与に起因した変化は認められなかった。

2) 角膜上皮の病理組織学的検査

代表的な HE 染色像を Figure 2-1 に示す。角膜上皮の病理組織学的検査において、いずれも被験物質投与に起因した変化は認められなかった。

3) コメットアッセイ

代表的なコメット像を Figure 2-2 に示す。また、Table 2-1 に% tail DNA の平均値及びヘッジホッグの頻度を示す。陰性対照群と比較して EtBr, MMS 及び 4-NQO 投与群では% tail DNA 値の統計学的に有意な増加が認められ、その値は用量の増加に伴って増加した。パラコート及びアクリルアミド投与群では、% tail DNA 値の有意な増加は認められなかった。1% EtBr, 3% MMS 及び 1% 4-NQO 投与群では、陰性対照群と比較してヘッジホッグ数のわずかな増加が認められたが、それ以外の投与群ではヘッジホッグはわずかに認められるのみだった。

第3節 *In vivo* 角膜コメットアッセイの経時的変化

第1項 材料と方法

1) 動物

雄性の日本白色種ウサギ (Kbs:JW) を北山ラベス株式会社から購入し、11~15 週齢のウサギを実験に用いた。動物は 19°C~25°C, 40%~70%の相対湿度及び 12 時間の明暗サイクル条件下によって飼育した。また、実験動物用飼料 (LRC4, オリエンタル酵母工業株式会社) の制限給餌 (100 g/日) 及び水の自由摂取により飼育した。本実験は千寿製薬株式会社で実施し、全ての実験手順は試験施設の動物実験に関する実施規程を遵守した。また、実験に先立って実験計画は試験施設の IACUC の審査を受け、承認された (動物実験申請番号 20210423-01)。

2) 被験物質

第2節の *in vivo* 角膜コメットアッセイで DNA 損傷の増加が認められた EtBr, MMS 及び 4-NQO を被験物質として使用した。EtBr はナカライテスク株式会社 (京都, 日本) から購入した。

3) 投与

(1) 群構成

| 投与物質 | | 投与 | 角膜採取時点 | 動物数 | 試験 |
|--------|----------|-------------------|--------|-----|--------------|
| 右眼 | 左眼 | | | | |
| 生理食塩液 | 1% EtBr | 単回点眼 (50 µL/眼) | 0.5 時間 | 3 | コメット アッセイ |
| 3% MMS | 1% 4-NQO | | | 3 | |
| 生理食塩液 | 1% EtBr | | 2 時間 | 3 | |
| 3% MMS | 1% 4-NQO | | | 3 | |
| 生理食塩液 | 1% EtBr | | 4 時間 | 3 | |
| 3% MMS | 1% 4-NQO | | | 3 | |
| 生理食塩液 | 1% EtBr | | 6 時間 | 3 | |
| 3% MMS | 1% 4-NQO | | | 3 | |
| 生理食塩液 | 1% EtBr | | 24 時間 | 3 | |
| 3% MMS | 1% 4-NQO | | | 3 | |

| 投与物質 | | 投与 | 角膜採取時点 | 動物数 | 試験 |
|--------|----------|------------------------|--------|-----|--------------|
| 右眼 | 左眼 | | | | |
| 生理食塩液 | 1% EtBr | 単回点眼 (50 μ L/眼) | 24 時間 | 1 | 病理組織 学的検査 |
| 3% MMS | 1% 4-NQO | | | 1 | |

EtBr 及び MMS はそれぞれ 1% または 3% になるように生理食塩液に溶解させた。4-NQO は 5% DMSO を用いて 1% 懸濁液を調製した。これらは第 2 節の *in vivo* 角膜コメットアッセイにおいて、有意な DNA 損傷が認められた用量を設定した。

(2) 投与方法

投与前に肉眼的にまたは細隙灯顕微鏡を用いてウサギの両眼を観察し、結膜、虹彩及び角膜に異常がないことを確認した。

ウサギの右眼に生理食塩液または 3% MMS を 1 眼あたり 50 μ L の投与量で投与し、反対眼（左眼）に 1% EtBr または 1% 4-NQO を同様に投与した。各時点 3 眼に投与した。また病理組織学的検査用にウサギに同様に各投与液を 1 眼に投与した。投与後すぐにウサギを強制的に数回瞬目させた。

4) コメットアッセイ

投与後 0.5, 2, 4, 6 及び 24 時間にチオペンタールナトリウムをウサギの耳静脈内へ過剰投与することにより安楽死させた。安楽死後のウサギから眼球を摘出し、角膜を採取した。

コメットアッセイは第 2 節 第 1 項 4) の方法に従い実施した。1 眼につき 150 細胞あたりのヘッジホッグ数を計数した。次いで、1 眼あたり測定可能な 150 細胞のコメットについて、Comet assay IV ソフトウェアを用いて % tail DNA 値を算出した。1 群（450 個/群）あたりの % tail DNA 値及びヘッジホッグ数の平均値及び SD を算出した。

5) 病理組織学的検査

投与後 24 時間に肉眼的または細隙灯顕微鏡を用い、ウサギの結膜、虹彩及び角膜を観察した。

角膜上皮障害に関してはフルオレセインで染色することにより眼刺激性を評価した。

眼科検査後、ウサギをチオペンタールナトリウムの過剰投与により安楽死させた。安楽死後、摘出した眼球（1眼/群）を第2節第1項5)に従い、HE染色標本を作製した。病理組織像は、BX53顕微鏡（オリンパス株式会社）、DP74デジタルカメラ及びcellSens Standardイメージングソフトウェアを使用して撮影した。

6) 統計解析

各データは正規分布であることを仮定した。% tail DNA 値及びヘッジホッグ数に関して、角膜採取時点ごとにF検定を実施し、その後陰性対照群と各被験物質群との間で、Studentのt検定またはWelchのt検定を実施した。なお、有意水準は片側5%とした。統計解析はJMP（バージョン15.1.0）を用いて実施した。

第2項 結果

1) 前眼部観察

投与後24時間の前眼部観察において1% EtBr、3% MMS及び陰性対照群では、被験物質投与に起因した変化は認められなかった。1% 4-NQOではごく軽度な結膜浮腫、虹彩充血及びごく軽度な角膜フルオレセイン染色斑がみられた。

2) 角膜の病理組織学的検査

投与後24時間後の角膜上皮の病理組織学的所見をTable 2-2に示す。また、代表的なHE染色像をFigure 2-3に示す。陰性対照及び1% EtBr投与群では、角膜上皮の病理組織学的変化は認められなかった。3% MMS投与群では、角膜上皮に病理組織学的変化は認められなかったが、角膜輪部にごく軽度な炎症性細胞の浸潤が認められた。1% 4-NQO投与群では、角膜上皮に中等度の変性/壊死が観察され、角膜輪部及び間質にごく軽度な炎症性細胞の浸潤が認められた。

3) コメットアッセイ

% tail DNA 値及びヘッジホッグの経時変化を Table 2-3 に示す。陰性対照群では、% tail DNA の平均値は、全ての角膜採取時点で約 10%であった。1% EtBr 投与群では、陰性対照群と比較して投与後 0.5, 2, 4 及び 6 時間で統計学的に有意な% tail DNA 値の増加が認められた。% tail DNA 値は投与後 0.5 及び 2 時間で約 30%であり、4 時間で最高値 (約 55%) に達し、その後 6 時間でわずかに減少した。投与後 24 時間では陰性対照群とほぼ同程度の値を示した。3% MMS 及び 1% 4-NQO 投与群では、陰性対照群と比較して、全ての採取時点で% tail DNA 値の統計学的に有意な増加が認められた。% tail DNA 値は 0.5 時間で最も高く、その後時間とともに徐々に減少した。しかし、投与後 24 時間でも依然として% tail DNA 値の高値が認められた。

全ての被験物質投与群で% tail DNA 値の増加とともにヘッジホッグ頻度の増加が観察された。EtBr 及び 4-NQO 投与群では、陰性対照群と比較して、それぞれ 4 時間、または 24 時間で有意にヘッジホッグ数が増加した。MMS 投与群では、4, 6 及び 24 時間で統計学的に有意な増加がみられた。

第 4 節 考察

第 2 章では *in vivo* 角膜 UDS 試験に代わる簡便な眼局所の *in vivo* 遺伝毒性評価系確立のために、コメットアッセイの有用性を検討した。さらに適切な角膜採取時間を設定するために DNA 損傷の経時的な変化を評価した。

初めに点眼後 2 時間のウサギ角膜上皮細胞を用いたコメットアッセイを検討した。陰性対照群である生理食塩液投与群の% tail DNA 値は 7.3%及び 8.8%を示した。また、5% DMSO 投与群では 7.9%を示し、その値は生理食塩液投与群の値とほぼ同程度であった。*In vivo* コメットアッセイの JaCVAM 国際検証試験では、経口投与後の陰性対照群の% tail DNA 値は、肝臓と胃でそれぞれ 1%~8%または 1%~20%の範囲内に設定されている [Uno et al., 2015]。また、経皮投与後のマウスの皮膚を用いた *in vivo* コメットアッセイでは、陰性対照群の値は 12.3%~15.5%を示した [Toyoizumi et al., 2011]。以上のことから、本検討における陰性対照群の% tail DNA 値は、既報の *in vivo* コメットアッセイの陰性対照群の値とほぼ同程度であった。よって、本検討における実験操作は妥当

である判断した。

実験結果の妥当性を検討するために投与後 2 時間のコメットアッセイにおける % tail DNA 値とヘッジホッグの値を検証した。陰性対照群と比較して EtBr, MMS 及び 4-NQO 投与群において統計学的に有意な % tail DNA 値の増加が認められた。これらの被験物質の高用量群である 1% EtBr, 3% MMS 及び 1% 4-NQO 投与群ではヘッジホッグ数のわずかな増加も認められた。ヘッジホッグは重篤な損傷を受けた細胞であると考えられるが、その原因は不明である。一方で、ヘッジホッグは修復可能な DNA 損傷の可能性があるため、細胞毒性の指標と見なすべきではないと報告されている [Lorenzo et al., 2013]。さらに、OECD TG 489 では、細胞毒性の指標として臓器や組織の病理組織学的変化を使用することが提案されている [OECD, 2016]。本検討では、いずれの化合物においても投与後 2 時間の角膜上皮に病理組織学的変化は認められなかった。これらの理由から、本検討において EtBr, MMS 及び 4-NQO 投与群で認められた % tail DNA 値の増加は、細胞毒性によるものではなく DNA 損傷に起因する変化であると判断した。

本検討において EtBr, MMS 及び 4-NQO の 3 化合物は DNA 損傷の有意な増加が認められ、第 1 章の *in vivo* 角膜 UDS 試験の結果と一致した。アクリルアミド及びパラコート投与群においては、*in vivo* 角膜 UDS 試験の結果と同様に、本検討においても DNA 損傷を誘発しなかった。パラコートは NADPH-シトクロム P450 還元酵素によって還元され、生成したフリーラジカルが DNA 損傷を引き起こす [Ali et al., 1996; Blanco-Ayala et al., 2014]。一方で、角膜上皮には抗酸化物質が豊富に含まれていることから [Chen et al., 2009]、パラコートによるラジカル生成は抗酸化物質によって抑制され、本実験の用量では眼表面での DNA 損傷が抑制されたと考えられる。以上のことから、コメットアッセイは点眼後の眼局所の DNA 損傷を検出可能であり、*in vivo* 角膜 UDS 試験に代わる簡便な方法として有用であると考えられた。

次に、*in vivo* 角膜コメットアッセイの確立に向け、適切な組織採取時間を検討するために、点眼後の角膜上皮細胞の DNA 損傷を投与後 24 時間まで経時的に評価した。陰性対照群と比較して全ての被験物質 (EtBr, MMS 及び 4-NQO) 投与群において、% tail DNA 値の統計学的に有意な増加が投与後 0.5~6 時間で認められた。また、単回点眼後の角膜中の T_{max} は一般的に 0.25~0.5 時間である [Fujita et al., 2008; Patel et al., 2013; Iyer et al., 2015]。以上のことから、点眼後の角膜にお

ける一般的な T_{max} も考慮し、角膜採取時間は点眼後 0.5~6 時間の任意の 1 時点が適切であり、OECD TG 489 に記載されている全身投与後 2~6 時間と同じ時間もしくはより早い時間で採取した方が良いことが明らかとなった。

DNA 損傷の推移を確認すると、MMS 及び 4-NQO 投与群では投与後 0.5 時間で % tail DNA 値のピークが認められた。この 2 化合物においては上述の点眼後の角膜における一般的な T_{max} と一致した。投与後 24 時間では、MMS 及び 4-NQO は有意な増加が認められたが、これらを含むすべての化合物でピーク値と比較すると % tail DNA 値の低下が認められた。MMS は DNA メチル化を引き起こし、メチル化された DNA は塩基除去修復によって修復されることが知られている [Wyatt and Pittman, 2006]。また、4-NQO は DNA 付加体を形成し、付加体を形成した DNA はヌクレオチド除去修復によって修復される [Balajee and Bohr, 2000]。これらの除去修復の過程で DNA 一本鎖切断が引き起こされ [Wyatt and Pittman, 2006]、アルカリコメットアッセイでは DNA 移動度の増加として一本鎖切断を検出する。本検討では MMS 及び 4-NQO の投与によって投与後 0.5 時間から % tail DNA 値が増加したため、MMS 及び 4-NQO による DNA メチル化及び DNA 付加体形成の直後に DNA 修復応答が開始したと考えられる。また、*in vitro* コメットアッセイの論文では、培養細胞に MMS を 4 時間曝露後、化合物を除去して新しい培地に置き換え、さらに培養後の細胞を用いて評価している [Bankoglu et al., 2021]。本論文では、MMS の 4 時間曝露後に最も高い DNA 損傷の値が検出され、その後経時的に DNA 損傷の値が減少した。本論文の結果は、本検討の結果と同様の傾向を示した。

EtBr 投与群では % tail DNA 値のピークは他の 2 化合物よりも遅く、4 時間でピークに達した。本結果は上述の点眼後の角膜における一般的な T_{max} とは一致しなかったが、組織中の化合物濃度は測定していないため、実際の EtBr 投与後の角膜における T_{max} は不明である。EtBr は DNA 塩基対の間にインターカレートし、その後の除去修復の過程を阻害することによって DNA 鎖にニックを引き起こす可能性がある [Berman and Young, 1981]。さらに、インターカレート剤は、DNA 及び RNA ポリメラーゼと DNA との結合を競合的に阻害し、それによって DNA 複製や翻訳を阻害する [Berman and Young, 1981]。したがって、EtBr は DNA 修復期及び複製期の 2 段階で DNA 損傷を引き起こした可能性が考えられる。また、インターカレート剤は DNA メチル化剤や DNA 付

加体形成剤とは異なり，DNA への結合は可逆的である。すなわち，EtBr は 1 分子で複数の DNA 損傷を引き起こすことが可能であり，DNA 損傷が修復する前に別の部位に DNA 損傷を引き起こすと DNA 損傷が徐々に蓄積し，ピークが遅くなる可能性も考えられる。以上のことから，DNA 損傷のピークが異なったのは DNA 損傷の作用機序の違いによるものと考えられる。これにより，組織の採取時間は組織中の T_{max} だけでなく，遺伝毒性の作用機序とそれに続く DNA 修復も考慮する必要があることを明らかにした。

投与後 24 時間の病理組織学的検査の結果，1% 4-NQO 投与群では角膜上皮の変性/壊死が認められた。細胞浸潤，アポトーシスまたは壊死などの病理組織学的変化が認められると，コメットアッセイにおける DNA 移動度が増加することが知られている [OECD, 2016]。しかしながら，本検討では投与後 24 時間の % tail DNA 値は 0.5 時間の値と比較して 1/3 程度にまで減少し，投与後 24 時間のヘッジホッグ数もほとんど増加しなかった。一部の研究では遺伝毒性の評価組織にアポトーシスまたは壊死が存在するにもかかわらず DNA 移動度の増加は認められなかった。そのため，重篤な損傷を受けた細胞がサンプル処理または電気泳動中に失われた可能性があるとして述べている [Burlinson et al., 2007]。本検討においても，4-NQO によって DNA 損傷を受けた細胞は DNA 修復または細胞死を進行させ，その中で重篤な損傷を受けた細胞は，Dispase II 処理やトリプシン処理の過程で失われ，結果として % tail DNA 値やヘッジホッグの値が見かけ上は増加しなかったと考えられた。これらのことから，本検討結果はコメットアッセイにおける病理組織学的検査の重要性を改めて示している。さらに，4-NQO 投与後 2 時間で DNA 損傷は認められたが，病理組織学的所見は認められていない。以上のことより，病理組織学的変化はコメットアッセイの結果に影響を及ぼすことが考えられるため，細胞毒性の観点からも病理組織学的変化を引き起こす前の投与後 0.5～6 時間の組織採取時間は妥当である。

既知の遺伝毒性物質を単回点眼し，投与後 2 時間のウサギの角膜上皮細胞における DNA 損傷をコメットアッセイにより検出することができた。これにより，*in vivo* 角膜コメットアッセイは *in vivo* 角膜 UDS 試験の代わりとして簡便な試験法であることが示された。次いで，*in vivo* 角膜コメットアッセイの確立に向け，適切な角膜採取時間を検討するために，単回点眼後の角膜上皮細胞における経時的な DNA 損傷のレベルを評価した。その結果，3 化合物において比較的高い % tail

DNA 値が 0.5~6 時間で維持していたため、*in vivo* 角膜コメットアッセイにおいて角膜採取時間は投与後 0.5~6 時間が適切であることが示された。以上のことから、本検討により *in vivo* 角膜コメットアッセイを確立したと判断した。コメットアッセイは UDS 試験と同様に点眼後の眼局所の遺伝毒性を検出することが可能であり、点眼剤開発における *in vivo* 遺伝子毒性評価のための有用なツールの 1 つに成り得ると考えられた。

第3章 γ H2AX を指標とした角膜上皮の二本鎖切断評価系の検討

第1節 緒言

医薬品開発においては動物倫理，特に 3Rs に配慮した試験デザイン及び試験パッケージが求められている。第2章で検討した *in vivo* 角膜コメットアッセイは角膜全てを必要とするため，一般毒性試験（例えば反復点眼毒性試験）への組み込みが困難である。また，コメットアッセイは細胞を化学固定せずに電気泳動する必要があるため，動物の安楽死後は可能な限り早く組織を処理しなければならず，操作の煩雑性から同時処理できる化合物数に限度があり，スループット性に課題がある。そのため，近年遺伝毒性試験の分野で注目されている γ H2AX に着目した。

DNA 損傷の中でも DNA 二本鎖切断は細胞死につながる重篤な DNA 損傷の一つであり，DNA 二本鎖切断が生じると，ヒストンタンパク質の一種である H2AX の 139 番目のセリン残基がリン酸化されることが知られている [Rogakou et al., 1998; Mah et al., 2010]。このリン酸化されたヒストン H2AX のことを γ H2AX と呼び，DNA 二本鎖切断の鋭敏なマーカーとして用いられている。 γ H2AX を指標とした遺伝毒性評価として，遺伝毒性物質を経口または腹腔内投与後のマウスの肝臓，胃，骨髄及び腎臓等の臓器における γ H2AX 量を液体クロマトグラフ質量分析計 (LC/MS/MS) で検出する方法や [Matsuda et al., 2018]，遺伝毒性物質を飲水投与または経口投与後のラットの膀胱または胃における免疫組織化学染色法などが報告されている [Toyoda et al., 2013; Okabe et al., 2019]。免疫組織化学染色法で検出できる γ H2AX は Foci と呼ばれる点状のシグナルを示し，各 DNA 二本鎖切断が 1 つの γ H2AX Foci に対応することが明らかとなっている。また， γ H2AX Foci に基づく DNA 二本鎖切断検出は，他の DNA 二本鎖切断を検出する方法よりも感度が高いと報告されている [Mah et al., 2010]。これらのことから， γ H2AX はホルマリン固定後の組織を用いて遺伝毒性を検出することができ，検出感度の高い方法であるため，眼刺激性試験や反復点眼毒性試験で病理組織学的検査に用いた組織を使用して評価できると考えた。

以上のことから，第3章では 3Rs の観点から，眼刺激性試験や反復点眼毒性試験に組み込める遺伝毒性の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 の検出を検討した。本検討では，遺伝毒性物質を点眼後の角膜上皮を用いて抗 γ H2AX 抗体を使用した免疫組織化学染色

を実施した。トポイソメラーゼ II 阻害剤である Dox を腹腔内投与後のラットの肝臓及び腎臓で γ H2AX の増加が認められていることから [Plappert-Helbig et al., 2018], 上記報告を参考にして Dox を使用し、動物種はラットを選択した。

第 2 節 材料と方法

第 1 項 動物

雄性の F344 ラットを日本チャールスリバー株式会社（神奈川，日本）から購入し，6～7 週齢のラットを実験に用いた。動物は 19°C～25°C，40%～70%の相対湿度及び 12 時間の明暗サイクル条件下によって飼育した。また，実験動物用飼料（CRF-1，オリエンタル酵母工業株式会社）及び水の自由に摂取により飼育した。本実験は千寿製薬株式会社で実施し，全ての実験手順は試験施設の動物実験に関する実施規程を遵守した。また，全ての実験は，試験施設の IACUC の審査を受け，承認された実験計画書（動物実験申請番号 20190529-01）に基づいて実施した。

第 2 項 被験物質

Dox は東京化成工業株式会社から購入した。陰性対照として生理食塩液を用いた。

第 3 項 投与

1) 群構成

| 投与物質 | | 投与 | 組織採取時点 | 動物数 | 試験 |
|----------|-------|------------------------|--------|-----|---------------|
| 右眼 | 左眼 | | | | |
| 0.5% Dox | 生理食塩液 | 単回点眼 (10 μ L/眼) | 0.5 時間 | 2 | γ H2AX |
| 0.5% Dox | 生理食塩液 | | 2 時間 | 2 | |
| 0.5% Dox | 生理食塩液 | | 4 時間 | 2 | |
| 0.5% Dox | 生理食塩液 | | 0.5 時間 | 1 | コメットアッセイ |

Dox を生理食塩液で溶解した。3%が生理食塩液への溶解限度値であったが，粘性が高く投与が困難であったため，投与可能な上限濃度として 0.5%を設定した。

2) 投与方法

投与前にラットの両眼を肉眼的に観察し、角膜に異常がないことを確認した。

Dox は眼刺激性が不明なため、投与前にケタミン及びキシラジンの混合液 (3:1) を腹腔内投与 (1 mL/kg) して導入麻酔し、その後セボフルラン (セボフルラン吸入麻酔液「マイラン」、マイラン製薬株式会社, 東京, 日本) による吸入麻酔で維持した。ラットの眼を強制的に開眼し、ラットの右眼に 0.5% Dox を、左眼に陰性対照として生理食塩液を 1 眼あたり 10 μ L ずつ単回点眼した。投与後、ラットを強制的に瞬目させ、眼球表面の乾燥を防止するためサージカルテープで眼球を覆った。免疫組織化学染色用に各時点 2 眼に投与し、コメットアッセイ用に 1 眼に投与した。

第 4 項 免疫組織化学的検査

投与後 0.5, 2 及び 4 時間に、セボフルラン吸入麻酔下のラットを開腹して腹大動脈及び後大静脈を切断し、安楽死させた。安楽死後のラットの眼球を摘出し、10%中性緩衝ホルマリン液で 1 日間固定した。その後、段階的アルコールを使用して組織を脱水し、パラフィンに包埋した。また、 γ H2AX 免疫組織化学的評価の陽性対照として、無処置のラットの精巣を採取した。採取した精巣を改良ダビットソン液で 1 日間固定後、10%中性緩衝ホルマリン液で再固定し、同様にパラフィンに包埋した。

パラフィンプロックを薄切し、自動染色装置 (Leica BOND RX, Leica Biosystems, ヴェツラー, ドイツ) を用いて染色した。BOND Epitope Retrieval 2 (pH 9.0) (Leica Biosystems) を用いて 100°C で 20 分間賦活化処理し、一次抗体の Phospho-Histone H2A.X (Ser139) (20E3) Rabbit mAb (Cell Signaling Technology, Inc., ダンバース, マサチューセッツ州, アメリカ合衆国) を 1:500 の割合で希釈し、室温で 30 分間反応させた。その後、二次抗体の BOND Polymer Refine Detection (Leica Biosystems) を室温で 15 分間反応させ、BOND DAB Enhancer (Leica Biosystems) により検出した。また、共染色としてヘマトキシリンで染色した。作製した免疫組織化学染色標本を、BX51 顕微鏡を用いて観察した。

第5項 コメットアッセイ

投与後 0.5 時間に、第 4 項と同様の方法でセボルフラン吸入麻酔下のラットを放血させることにより安楽死させた。安楽死後、ラットの眼球を摘出し、第 2 章 第 2 節 第 1 項 4) の方法に従いコメットアッセイを実施した。1 眼あたり測定可能な 100 細胞のコメット像を Comet assay IV ソフトウェアを用いて % tail DNA 値を算出した。

第3節 結果

1) 前眼部観察

投与後に被験物質投与に起因した変化は認められなかった。

2) 免疫組織化学染色

代表的な角膜上皮及び精巢の免疫組織化学染色像を Figure 3-1 に示す。0.5% Dox 投与群で角膜上皮の基底細胞及び翼細胞層に γ H2AX の陽性細胞が高範囲に認められた。しかし、陰性対照群でも同様の傾向を示し、0.5% Dox 投与による明らかな影響は確認できなかった。また、組織採取時点による差も認められなかった。なお、計画時には γ H2AX の Foci が認められた細胞数を計数する予定であったが、陰性対照群と Dox 投与群で γ H2AX の発現傾向に大きな違いが認められなかったため、本検討では計数しなかった。

免疫組織化学染色の陽性対照として用いたラット精巢において、精母細胞、精原細胞、及びパキテン期精母細胞の XY 体に陽性反応が認められた。

3) コメットアッセイ

結果を Figure 3-2 に示す。陰性対照群の % tail DNA 値は約 13%であった。0.5% Dox 投与群では陰性対照群と比較して % tail DNA 値の増加が認められた。

第4節 考察

第3章では、点眼後の眼局所における γ H2AXの検出を検討した。精巣では減数分裂の過程で二本鎖切断を伴うことが知られているため、免疫組織学的染色の妥当性を検証するための陽性対照として精巣を用いた。正常ラットの精巣において、精母細胞、精原細胞、及びパキテン期精母細胞のXY体に γ H2AXの陽性反応が認められ、既報の結果と一致した [Motoyama et al., 2018]。よって、本検討における免疫組織化学染色は適切であったと判断した。

トポイソメラーゼ阻害剤のDoxを点眼後の眼球を用い、 γ H2AXの免疫組織化学的評価を実施した。Dox投与群において角膜上皮の基底細胞及び翼細胞層に γ H2AX陽性細胞が高範囲に認められ、その形状は既報の通りFociが認められた。しかし、陰性対照群でも同様の傾向が見られ、Dox投与による γ H2AXの発現変動は明らかでなかった。この結果は、ラットの角膜では恒常的に γ H2AXが発現されていることを示唆している。一般的には、細胞が細胞分裂する際に、特にG2/M期で γ H2AXレベルが増加することが知られている [An et al., 2010]。正常なマウスの角膜上皮を用いて増殖細胞マーカーである増殖性細胞核抗原（以下、PCNA）の免疫組織学的染色を実施した試験では、多くの基底細胞でPCNA陽性細胞が確認された [Yoshizawa et al., 2011]。加えて、BrdUを用いてラットの角膜上皮の細胞分裂を評価した結果、基底細胞でBrdU陽性細胞が認められた [Jones and Marfurt, 1996]。一方で、イヌの目の腫瘍マーカーとして γ H2AXを検討した試験では、正常な幼若（2歳齢以下）及び老齢（9.5～12.4歳齢）のイヌの角膜上皮では γ H2AXの発現は認められていない [Merz et al., 2019]。また、ドライアイの治療薬に関する研究においても、正常なマウスの角膜上皮では γ H2AX陽性細胞はほとんど認められなかった [Yu et al., 2020]。以上のことから、ラットの角膜上皮細胞は定常的に細胞分裂を繰り返し、その過程で γ H2AXが誘導された可能性が考えられるが、正常なマウス及びイヌの角膜上皮細胞では γ H2AX陽性細胞はほとんど認められていないことから、今後も精査する必要がある。本実験条件では遺伝毒性物質の点眼後の角膜で γ H2AXの明らかな発現上昇は見られなかった。しかし、医薬品開発において投与部位で γ H2AXの明らかな発現上昇がみられた場合には、遺伝毒性のアラートとなることが期待される。

また、遺伝毒性評価の陽性対照として実施した角膜コメットアッセイでは、陰性対照群と比較してDox投与群でDNA損傷の増加が認められた。DoxはDNA鎖間にインターカレートし、DNA

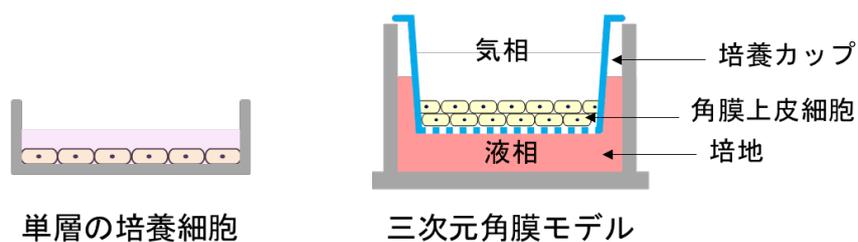
ポリメラーゼが DNA と結合するのを競合的に阻害することにより、DNA の合成を阻害することが知られている。また、Dox は DNA 複製時に DNA とトポイソメラーゼIIの複合体を安定させ、DNA 二本鎖切断後の再結合を阻害することも知られている。その他にも活性酸素種の生成も知られている [Yang et al., 2014]。本検討では、これらの過程で生じた DNA の一本鎖及び二本鎖切断をコメットアッセイで検出したと考える。Martins らの報告では 15 mg/kg の Dox を腹腔内投与後のラットの心臓を用いたコメットアッセイにより DNA 損傷の増加が認められており [Martins et al., 2012]、本検討結果と一致した。また、コメットアッセイと γ H2AX 検出系により DNA 損傷の経時的反応を比較した論文では、培養細胞に遺伝毒性物質を 1 時間曝露後、化合物を除去して新しい培地に置き換え、さらに培養後の細胞を用いて評価している [Nikolova et al., 2017]。本論文で、アルキル化剤の MMS において、コメットアッセイでは化合物除去後 45 分に最も高い DNA 損傷の値が検出され、曝露後 6 及び 24 時間では経時的に DNA 損傷の値が減少した。それに対し、 γ H2AX では化合物除去後 45 分及び 6 時間でも γ H2AX を有する細胞数が増加したものの 24 時間で最も高い値が認められた [Nikolova et al., 2017]。このことから、コメットアッセイは曝露直後から生じる初期の DNA 損傷を鋭敏に検出することができ、 γ H2AX では曝露直後から生じる DNA 二本鎖切断に加え、修復されていない DNA 二本鎖切断や細胞毒性による二次的損傷など、比較的長い間 DNA 損傷反応を検出できる可能性がある。本検討においては陰性対照と比較して Dox の投与後 30 分ではコメットアッセイにより DNA 損傷の増加を検出したが γ H2AX の増加は認められなかったため、本実験条件下では DNA の一本鎖切断は引き起こされたが、DNA 二本鎖切断は引き起こされなかった可能性がある。

第 3 章では 3Rs の観点から、眼刺激性試験や反復点眼毒性試験に組み込める遺伝毒性の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 の検出を検討した結果、ラットの角膜上皮での定常的な γ H2AX の発現が示唆され、DNA 損傷を誘発する条件にも関わらずその発現変動をとらえることが出来なかった。このことは、角膜上皮において γ H2AX のみを DNA 損傷の指標とすることは注意が必要であることが示唆された。なお、ラットでもウサギと同様に点眼後の角膜上皮細胞を用いたコメットアッセイで DNA 損傷を検出することができ、開発初期での評価も期待できる。

第4章 三次元角膜モデルを使用したコメットアッセイの検討

第1節 緒言

第1章～第3章では、点眼後の角膜におけるDNA損傷を検出できる *in vivo* 遺伝毒性試験系の開発を目的として検討したが、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可能な *in vitro* 試験は、動物福祉の観点やスループット性の面からも有用である。これまでに、角膜上皮細胞由来の単層の培養細胞を使用した *in vitro* コメットアッセイは複数報告されている [Wu et al., 2011; Ye et al., 2011; Sakaki et al., 2015]。しかしながら、これらの報告は薬物曝露時間が15～60分であるため、点眼時の薬物曝露時間と乖離がある（後述）。加えて、角膜上皮は重層扁平上皮で構成されているため、単層の培養細胞とは角膜表面の構造が異なる。そこで、真皮モデルや角膜モデルなどの三次元多層細胞培養モデルに着目した。このような三次元多層培養モデルは、主に眼刺激性試験及び皮膚刺激性試験の代替法試験に活用されている [Katoh et al., 2009; Katoh et al., 2013; OECD, 2015; OECD, 2018]。三次元多層培養モデルの1つである三次元角膜モデルは、密着結合を発現する多層角膜上皮細胞と、微絨毛を有する表在性細胞で構成されていることから [Katoh et al., 2012]、眼表面の構造を再現した培養モデルである。下図に示すように、三次元角膜モデルは培養カップの底面は培地と接触しているものの、細胞表面は空気に晒されている気相-液相培養法にて培養される。



単層の培養細胞と三次元角膜モデルの模式図

以上のことから、第4章では *in vivo* 角膜遺伝毒性試験の結果を予測するための *in vitro* 試験の確立を目的として、三次元角膜モデルを使用した *in vitro* コメットアッセイについて検討した。点眼による眼局所への曝露時間に関して、点眼後の点眼剤はヒトでは1～2分以内に大部分が瞬目や鼻涙管を通して排泄され、ウサギでは3～4分以内に80%以上が排出されることが知られている

[本瀬, 1984]。このことから、点眼剤は投与部位である角膜に直接曝露されるものの、その曝露時間は非常に短い。また、眼刺激性試験の代替法試験において、ウサギ角膜上皮細胞（SIRC 細胞）を用いた短時間曝露法（Short Time Exposure test, 以下、STE 試験）では実際の点眼を模倣するために曝露時間を 5 分間に設定している [Takahashi et al., 2008]。また、三次元角膜モデルを用いた眼刺激性試験代替法では、1 分間の曝露時間で評価している [Kato et al., 2013]。したがって、本検討においても点眼を模倣するために眼刺激性代替法を参考に曝露時間を 1 分に設定した。以上のことから、三次元角膜モデルを用いて 1 分間曝露させたときの DNA 損傷をコメットアッセイにより評価した。加えて、単層の培養細胞である SV40 不死化ヒト角膜上皮細胞（human corneal epithelial cells-transformed, 以下、HCE-T 細胞） [Araki-Sasaki et al., 1995] についても同様に検討し、三次元角膜モデルの結果と比較した。本検討では第 1 章～第 3 章で検討したアクリジンオレンジ、EtBr、パラコート、4-NQO、アクリルアミド及び MMS に加え、活性酸素種生成剤の過酸化水素についても検討した。

第 2 節 材料と方法

第 1 項 細胞

実験には三次元角膜モデル（LabCyte CORNEA-MODEL, 株式会社ジャパン・ティッシュ・エンジニアリング, 愛知, 日本）及び HCE-T 細胞を用いた。

三次元角膜モデルが培養された培養カップをアッセイ培地（株式会社ジャパン・ティッシュ・エンジニアリング）を添加した 24 ウェルプレートに移し、37°C, 5% CO₂ インキュベーター内で培養した。

HCE-T 細胞は、DMEM/F12 培地（サーモフィッシュャーサイエンティフィック株式会社）に 5% 牛胎児血清, 5 µg/mL インスリン, 10 ng/mL ヒト上皮成長因子及び 40 µg/mL ゲンタマイシンを混合した培地を用い、37°C, 5% CO₂ インキュベーター内で培養した。

第 2 項 被験物質

MMS, アクリジンオレンジ, EtBr, 過酸化水素, パラコート, 4-NQO 及びアクリルアミドを被

験物質として使用した。全ての試薬は富士フィルム和光純薬株式会社から購入した。

第3項 被験物質の調製及び曝露

1) 三次元角膜モデル

被験物質は添加最終濃度になるように注射用水（株式会社大塚製薬工場）を用いて調製した。

陰性対照として注射用水を用い，陽性対照として 0.3% MMS を使用した。

三次元角膜モデルにおける添加最終濃度

| 被験物質 | 添加最終濃度 (%) | | | |
|-----------|------------|---------|--------|-------|
| | 0.003 | 0.03 | 0.3 | 3 |
| MMS | 0.003 | 0.03 | 0.3 | 3 |
| アクリジンオレンジ | 0.000005 | 0.00005 | 0.0005 | 0.005 |
| EtBr | 0.00025 | 0.0025 | 0.025 | 0.25 |
| 過酸化水素 | 0.003 | 0.03 | 0.3 | 3 |
| パラコート | 0.005 | 0.05 | 0.5 | 5 |
| 4-NQO | 0.0001 | 0.001 | 0.01 | 0.1 |
| アクリルアミド | 0.003 | 0.03 | 0.3 | 3 |

被験物質の添加は三次元角膜モデルを使用した眼刺激性代替法試験の方法を参考にした [Katoh et al., 2013]。三次元角膜モデルの細胞表面に 50 μ L の被験物質溶液を添加し，室温で 1 分間曝露した。PBS を入れた洗浄瓶を用いて細胞表面を 10 回洗浄した。洗浄後，綿棒を使用して培養カップの側面，底面及び細胞表面の PBS を取り除いた。0.5 mL の 0.25%トリプシンを添加したウェルに培養カップを移し，更に細胞表面に 0.25%トリプシンを 0.5 mL 添加した。37°C，5% CO₂ インキュベーター内で 15 分間処理し，処理後の細胞に 1 mL の培地を添加した。その後，細胞をピペッティングにより攪拌し，40- μ m ポアサイズのセルストレーナーでろ過した。ろ過後の細胞懸濁液を 5000 rpm で 5 分間遠心し，上清を除去後，PBS で再度懸濁して 1~2 \times 10⁵ 細胞/mL に調製した。いずれの物質も n = 3 で実施した。

2) HCE-T 細胞

被験物質及び陽性対照物質は、添加最終濃度の 2 倍濃い濃度となるように注射用水を用いて調製した。陰性対照として注射用水を用い、陽性対照として 0.2% MMS を用いた。

HCE-T 細胞における添加最終濃度

| 被験物質 | 添加最終濃度 (%) | | | | |
|-----------|------------|----------|---------|---------|-----|
| | 0.02 | 0.05 | 0.1 | 0.2 | 0.5 |
| アクリジンオレンジ | 0.0000004 | 0.000002 | 0.00001 | 0.00005 | |
| EtBr | 0.0004 | 0.002 | 0.01 | 0.05 | |
| 過酸化水素 | 0.000004 | 0.00002 | 0.0001 | 0.0005 | |
| パラコート | 0.001 | 0.01 | 0.1 | 1 | |
| 4-NQO | 0.00004 | 0.0002 | 0.001 | 0.005 | |
| アクリルアミド | 0.003 | 0.03 | 0.3 | 3 | |

12 ウェルプレートに 1×10^5 細胞/ウェルの HCE-T 細胞を播種し、37°C、5% CO₂ インキュベーター内で一晩培養した。培養後の細胞を 1 mL の PBS で 1 回洗浄し、0.5 mL の DMEM/F12 無血清培地を添加した。0.5 mL の 2 倍濃い濃度の被験物質溶液を添加し、1 分間曝露した。曝露後、被験物質溶液を除去し、1 mL の PBS で 1 回洗浄した。洗浄後、セルスクレーパーで細胞を剥離し、PBS で $1 \sim 2 \times 10^5$ 細胞/mL に調製した。いずれの物質も n = 3 で実施した。

第 4 項 コメットアッセイ

コメットアッセイは第 2 章 第 2 節 第 1 項 4) の方法に従い実施した。各ウェルにつき 100 細胞あたりのヘッジホッグ数を計数した (300 個/群)。次いで、1 眼あたり測定可能な 100 細胞のコメットについて、Comet assay IV ソフトウェアを用いて % tail DNA 値を算出した。1 群 (300 個/群) あたりの % tail DNA 値及びヘッジホッグ数の平均値及び SD を算出した。

第 5 項 細胞毒性試験

1) 三次元角膜モデル

第 3 項と同様の方法で、各物質を 1 分間曝露した。Earle's Balanced Salt Solution (Sigma-Aldrich, セントルイス, ミズーリ州, アメリカ合衆国) で 10 倍希釈した Cell Counting Kit-8 (株式会社同仁化学研究所, 熊本, 日本) を 24 ウェルプレートに 0.5 mL 添加し, そこに各物質を曝露後の培養カップを移した。37°C, 5% CO₂ インキュベーター内で 4 時間培養した。培養後に 100 µL の培養液を 96 ウェルプレートに移し, 450 nm の吸光度をプレートリーダー (POWERSCAN HT, BioTek Instruments Inc., ウィヌースキ, バーモント州, アメリカ合衆国) で測定した。陰性対照群の吸光度を 100% として, 各物質の細胞生存率を算出した。いずれの物質も n = 1 で実施した。

2) HCE-T 細胞

第 3 項と同様の方法で、各物質を 1 分間曝露した。DMEM/F12 無血清培地で 10 倍希釈した Cell Counting Kit-8 を各物質曝露後の各ウェルに 1 mL ずつ添加し, 37°C, 5% CO₂ インキュベーター内で 1 時間培養した。培養後に 100 µL の培養液を 96 ウェルプレートに移し, 450 nm の吸光度をプレートリーダーで測定した。陰性対照群の吸光度を 100% として, 各物質の細胞生存率を算出した。いずれの物質も n = 2 で実施した。

第 6 項 統計解析

% tail DNA 値の統計解析を実施した。一元配置分散分析検定を実施し, 有意差がついた場合は陰性対照群と各被験物質群との間で, Dunnett の多重比較検定を実施した [Kimura et al., 2010]。陰性対照群と陽性対照群との間には, F 検定を実施し, その後 Student の t 検定または Welch の t 検定を実施した。なお, 有意水準は片側 5% とした。統計解析は JMP (バージョン 13.2.1) を用いて実施した。

第3節 結果

1) 三次元角膜モデル

結果を Figure 4-1 に示す。細胞毒性試験の結果、過酸化水素は濃度依存的に細胞生存率を低下させた。3%では強い細胞毒性を示したので、コメット像は観察対象外にした。次いで、ヘッジホッグ数を計数した。3% MMS は観察した全ての細胞がヘッジホッグであったため、コメット像は観察対象外とした。それ以外の被験物質においては、わずかにヘッジホッグが認められた濃度があったものの、観察対象とした。観察対象のコメット像を解析した結果、MMS は陰性対照群と比較して 0.3%で% tail DNA 値が有意に増加した。そのため、他の被験物質の実験時の陽性対照として 0.3% MMS を使用した。アクリジンオレンジ、EtBr、過酸化水素、パラコート及び 4-NQO は陰性対照群と比較してそれぞれ 0.005%、0.25%、0.03%、0.05%及び 0.001%以上の濃度で% tail DNA 値が有意に増加した。アクリルアミドは、最高濃度の 3%でも% tail DNA 値の有意な増加は認められなかった。

2) HCE-T 細胞

結果を Figure 4-2 に示す。いずれの被験物質も細胞毒性は認められなかった。0.05% EtBr 及び 0.005% 4-NQO は観察した全ての細胞がヘッジホッグであったため、これらのサンプルのコメット像は観察対象外とした。それ以外の被験物質については、わずかにヘッジホッグが認められたものの、観察対象とした。観察対象のコメット像を解析した結果、MMS は陰性対照群と比較して、0.1%以上の濃度で% tail DNA 値が有意に増加した。そのため、他の被験物質の実験時の陽性対照として 0.2% MMS を使用した。アクリジンオレンジ、EtBr、過酸化水素及び 4-NQO は陰性対照群と比較してそれぞれ 0.00001%、0.002%、0.0001%及び 0.001%以上の濃度で% tail DNA 値が有意に増加した。一方、パラコート及びアクリルアミドは最高濃度の 1%または 3%でも% tail DNA 値の有意な増加は認められなかった。

第4節 考察

三次元角膜モデルを使用して、点眼を模倣した条件、すなわち 1 分間の短時間曝露で *in vitro* コ

メットアッセイを検討した。その結果、1 分間の曝露でも DNA 損傷を検出することができた。また、HCE-T 細胞を用いて同様に検討し両細胞の結果を比較したところ、パラコート処理群を除いて、三次元角膜モデルと HCE-T 細胞の間で遺伝毒性の陰性または陽性の判定に違いは認められなかった。

パラコート処理群では、三次元角膜モデルを使用したコメットアッセイでは 0.05%以上の濃度で DNA 損傷の増加が認められたが、HCE-T 細胞では最高濃度の 1%でも DNA 損傷は誘導しなかった。パラコートは細胞内に取り込まれると還元酵素により還元され、パラコートラジカルが生成される。パラコートラジカルは酸素と反応することにより再酸化され、その後生成されるスーパーオキシドラジカルにより DNA 損傷が引き起こされることが知られている [Ali et al., 1996; Blanco-Ayala et al., 2014]。三次元角膜モデルは気相-液相培養法にて培養されており、本検討では点眼を模倣して 50 μ L の被験物質をこの気相界面に添加したことにより、パラコートが酸素と反応することができ、スーパーオキシドラジカルが生成された可能性が考えられた。一方で、HCE-T 細胞では、細胞が乾燥しないように細胞が薬液で浸るように曝露した。そのため、パラコートは溶液中の溶存酸素としか反応できずスーパーオキシドラジカルの生成量が少なかったために、DNA 損傷が認められなかった可能性が考えられた。加えて、第 1 章の *in vivo* 角膜 UDS 試験では 10%パラコートは陰性対照群と比較して UDS が有意に増加した。以上のことから、*in vivo* の曝露条件により近い三次元角膜モデルのみがパラコートの DNA 損傷のポテンシャルを検出でき、*in vivo* 角膜 UDS 試験の結果を再現できたと考える。

HCE-T 細胞において、パラコート処理群の細胞生存率が増加した。再現性を確認するために追加試験を実施したが、細胞生存率の増加は再現性が得られていないため原因を特定することが出来なかった。一方で、細胞生存率の測定で用いた試薬の Cell Counting Kit-8 は、試薬との干渉、または細胞の肥大によって見かけ上の細胞生存率の増加が認められることが知られているため [Tahara et al., 2017]、細胞生存率の測定には注意が必要である。

DNA 損傷が認められた被験物質の最低濃度に関して、HCE-T 細胞と三次元角膜モデルの結果を比較したところ、4-NQO 及び MMS においては両試験の DNA 損傷の検出濃度が同程度であった。一方で、過酸化水素、EtBr 及びアクリジンオレンジに関しては、両試験の検出濃度に約 100

～500 倍程度の差が認められ、HCE-T 細胞は三次元角膜モデルを使用した時よりも低濃度から DNA 損傷を引き起こすことが明らかとなった。その理由として、三次元角膜モデルは眼組織構造を再現していることに起因すると考えられる。すなわち、三次元角膜モデルは、表層、翼細胞層、及び基底層の 3 層からなり、密着結合などの細胞間結合が認められることから、三次元角膜モデルでは被験物質の浸透が制限されるため、DNA 損傷の検出濃度に差が認められた可能性が考えられた。また、眼刺激性の *in vitro* 代替法試験である STE 試験では、被験物質を 0.05%及び 5%濃度に希釈して SIRC 細胞に曝露しその細胞毒性を評価しているのに対し [Takahashi et al., 2008]、三次元角膜モデルを使用した代替法試験では、未希釈の溶液を曝露する [Katoh et al., 2013]。これらの知見と本結果は同じ傾向であり、細胞毒性だけでなく DNA 損傷のような遺伝毒性も *in vitro* の試験系に影響を受けることが分かった。

In vitro コメットアッセイの結果と、第 1 章の *in vivo* 角膜 UDS 試験及び第 2 章の *in vivo* 角膜コメットアッセイの結果を Table 4-1 に示す。パラコートを除いて *in vitro* コメットアッセイの結果は、*in vivo* 角膜遺伝毒性試験の陰性または陽性の判定と一致した。HCE-T 細胞を用いた *in vitro* コメットアッセイと *in vivo* 角膜コメットアッセイの試験の検出感度を比較したところ、*in vivo* コメットアッセイは DNA 損傷の検出下限値まで評価していないため両試験法の検出感度の差は明確ではないが、EtBr 及び 4-NQO では検出感度に 100 倍以上の差が認められた。また、HCE-T 細胞を用いた *in vitro* コメットアッセイと *in vivo* 角膜 UDS 試験の結果を比較すると、アクリジンオレンジでは約 500,000 倍の検出感度の差が認められた。一般的に単層の培養細胞を用いた試験は感度が高く、遺伝毒性のポテンシャル評価には向いているものの、*in vivo* 条件を反映していないためリスク評価には適していないとされている。この知見と同様の傾向が今回得られており、HCE-T 細胞を用いた *in vitro* コメットアッセイは、より遺伝毒性ポテンシャルの評価に適した評価系と言える。

三次元角膜モデルを用いた *in vitro* コメットアッセイと *in vivo* 角膜コメットアッセイの検出感度を比較すると、EtBr 及び MMS においては、両試験の DNA 損傷の検出濃度が同程度であった。4-NQO に関しては、DNA 損傷の検出濃度に 200 倍の差が認められたが、両試験の検出感度を比較するには *in vivo* 角膜コメットアッセイでより低濃度の 4-NQO を評価する必要がある。一方、

パラコートに関しては三次元角膜モデルを用いたコメットアッセイでは 0.05%で DNA 損傷を検出したのに対し、*in vivo* 角膜コメットアッセイでは 5%でも有意な DNA 損傷を誘発しなかった。また、三次元角膜モデルを用いた試験と *in vivo* 角膜 UDS の試験結果を比較すると、アクリジンオレンジでは依然として 1000 倍の検出感度の差が認められた。その理由として、三次元角膜モデルは一定の濃度が 1 分間曝露されるのに対し、*in vivo* では涙液による点眼剤の希釈や涙液のターンオーバー等により、組織中薬物濃度が経時的に減少するため [Lee and Robinson, 1986; Ueda et al., 2010], 両試験の検出感度の差は曝露濃度に起因すると考えられる。しかしながら、三次元角膜モデルを用いたコメットアッセイは、単層の培養細胞である HCE-T 細胞を使用する場合よりも、DNA 損傷を検出する感度が *in vivo* 試験に約 100 倍近い試験系であることが示された。以上のことから、三次元角膜モデルは組織構造や被験物質の添加量及び検出感度の観点から、*in vivo* に近い評価系であり、眼局所の DNA 損傷のリスク評価に適した *in vitro* 代替法試験系である。

第 4 章では、3Rs の観点やスループット性の面からも有用性が期待できる、三次元角膜モデルと単層の培養角膜細胞を用いた *in vitro* コメットアッセイを検討した。本検討では両者の DNA 損傷の検出感度の違いを初めて明らかにし、組織構造、曝露条件及び検出感度の観点から、三次元角膜モデルは *in vivo* 試験の試験結果を予測するのに適した試験系であることを示した。三次元角膜モデルは液体だけでなく、粉体やクリームなども適用可能である。点眼剤は水性点眼剤だけでなく粘性を有するもの、懸濁剤、油性製剤や乳剤など様々な剤型があるため、三次元角膜モデルは点眼剤としての評価も可能である点からも、点眼剤の開発上で有用な試験系である。

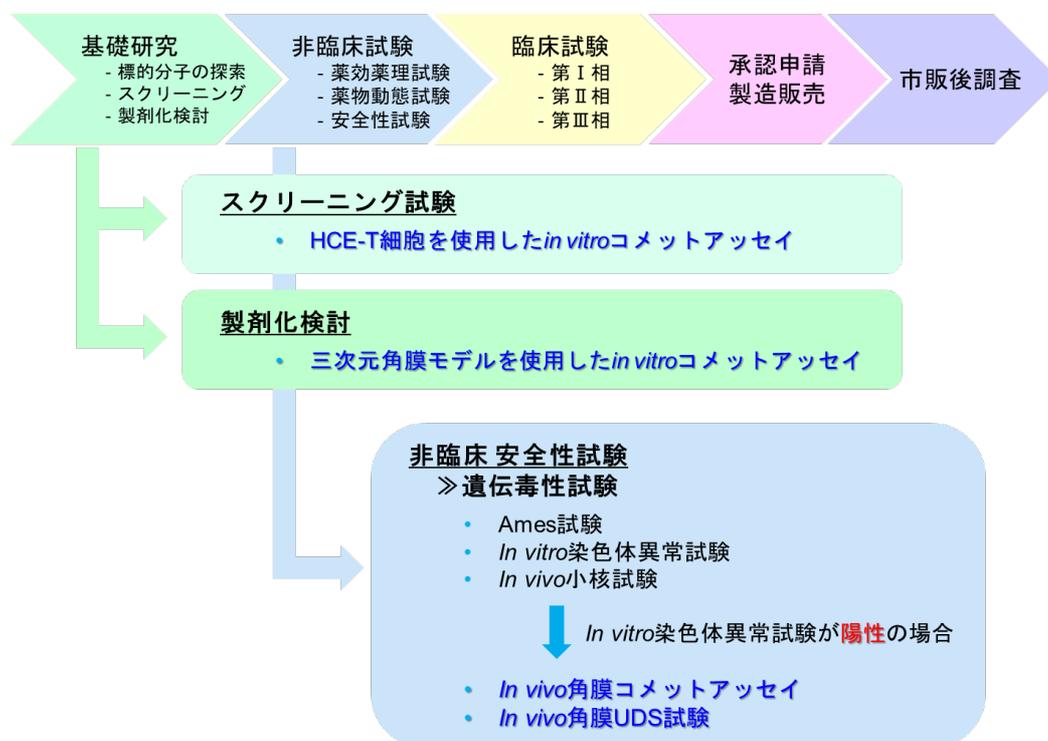
第5章 総合考察

第1章では既知の遺伝毒性物質を単回点眼し、投与後2時間のウサギの角膜上皮を用いてUDS試験を検討した結果、点眼後の眼局所での遺伝毒性が引き起こされることを明らかにした。本検討により、点眼後の眼局所の遺伝毒性評価系としてUDS試験の有用性を示した。第2章では、遺伝毒性物質を単回点眼後2時間のウサギの角膜上皮細胞を用いて、コメットアッセイによりDNA損傷の増加を検出することができた。また、*in vivo* 角膜コメットアッセイの試験系確立を目的として遺伝毒性物質を単回点眼後のウサギ角膜上皮におけるDNA損傷を経時的に評価し、適切な角膜採取時間を示した。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が、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*in vivo* 角膜遺伝毒性試験の結果を予測するための*in vitro* 試験の確立を目的として、三次元角膜モデルを使用した*in vitro* コメットアッセイについて検討した。点眼を模倣した条件（1分間の短時間曝露）で*in vitro* コメットアッセイを検討した結果、三次元角膜モデルを使用した*in vitro* コメットアッセイの結果は、*in vivo* 角膜UDS試験及び*in vivo* 角膜コメットアッセイの陰性または陽性の判定と一致した。本検討により、三次元角膜モデルを用いたコメットアッセイは眼局所の遺伝毒性評価系の代替法として有用であることを示した。

本研究で検討した試験法は点眼剤開発における基礎研究や非臨床安全性試験の中で活用できると考える。下図に本研究で検討した遺伝毒性試験の点眼剤開発の各ステージにおける活用法を提案する。基礎研究段階では、開発する化合物の選択（スクリーニング）及び製剤の開発（製剤化検討）を行う。一般的にスクリーニングは評価する化合物数が多く、開発のリスクを保守的に判断するため、スループット性に優れ、感度の高い評価方法が求められる。このため、HCE-T細胞を用いた*in vitro* コメットアッセイはスクリーニングに有用な試験系である。一方、製剤化検討では化合物ではなく製剤の評価が求められるため、より非臨床試験に近い条件やリスク評価が可能な試験系が求められる。三次元角膜モデルを用いた*in vitro* コメットアッセイは*in vivo* 角膜コメ

ットアッセイを予測できる試験系であり、また種々の剤型での評価が可能であることから、製剤化検討段階での活用が推奨される。次に非臨床試験ステージにおいては、安全性試験としての活用が見込まれる。すなわち、遺伝毒性試験の標準的組合せの Ames 試験、哺乳類細胞を使用した *in vitro* 試験及び *in vivo* 小核試験の内、哺乳類細胞を使用した *in vitro* 試験の結果が陽性だった場合に、2 種目の *in vivo* 試験として *in vivo* 角膜コメットアッセイ及び *in vivo* 角膜 UDS 試験を活用できる。実際に、一部の市販されている点眼剤においては、*in vitro* 遺伝毒性試験で陽性だったため、追加試験として *in vivo* 角膜 UDS 試験が実施されている。これらの点眼剤は、*in vivo* 角膜 UDS 試験で陰性だったことから、眼局所における遺伝毒性の懸念はないと判断されて承認されている [大塚製薬株式会社, 2011; 千寿製薬株式会社, 2012; 興和株式会社, 2014]。このことから、*in vivo* 角膜 UDS 試験の有用性はレギュラトリーの面からも支持されている。

以上のことから、本研究により点眼後の眼局所の *in vivo* 遺伝毒性評価系という点眼剤開発における遺伝毒性評価の課題を解決することができた。さらに眼局所の *in vivo* 遺伝毒性試験の結果を簡易に予測できる *in vitro* 遺伝毒性試験法を開発した。これらの試験は、上記の通り、点眼剤開発のステージに合わせて活用が期待できる。



本研究で開発した遺伝毒性試験の点眼剤開発における活用法

本研究における *in vivo* 遺伝毒性試験法の検出感度を比較すると、第1章の *in vivo* 角膜 UDS 試験及び第2章の *in vivo* 角膜コメットアッセイは、両試験結果に差異は認められなかった (Table 4-1)。*In vivo* 角膜 UDS 試験や *in vivo* 角膜コメットアッセイにおいて、ウサギの角膜で DNA 損傷を検出した遺伝毒性物質の最低濃度は 0.2%~10%であり、これは一般的な点眼剤の濃度 (0.1%~1%) の範囲と概ね一致した。すなわち、一般的な点眼剤の濃度で遺伝毒性を検出できたため、両試験は点眼剤開発において眼局所の遺伝毒性を評価するのに十分な感度があることが示唆された。一方で UDS 試験及びコメットアッセイの検出感度を比較するために発がん性物質の予測能を考察した論文では、UDS 試験の感度は 59.7%、特異性は 80.0%であり、コメットアッセイの感度は 91.2%、特異性は 55.5%であることが報告されている [EFSA Scientific Committee et al., 2017]。彼らの論文では UDS 試験はコメットアッセイより感度が低いため、*in vitro* 試験で陽性の場合のフローアップ試験として UDS 試験を推奨しないと報告している。

UDS 試験とコメットアッセイには原理的に以下に示す課題が知られている。UDS 試験は、遺伝毒性物質によって引き起こされた DNA 損傷を修復するために行われた DNA 合成を検出するため、ヌクレオチド除去修復やロングパッチ塩基除去修復のような DNA 損傷部位を含む 20~30 塩基を切断して修復する「ロングパッチ修復」を検出するには有用である。しかしながら、塩基除去修復のような 1~3 塩基を切断して修復する「ショートパッチ修復」、もしくは除去修復しない場合は、UDS の検出感度が非常に低く、偽陰性を示す場合がある [Lonati-Galligani et al., 1983]。このことから、UDS 試験は DNA アルキル化剤のように塩基除去修復によって修復される化合物の遺伝毒性を検出できない可能性が示唆される。コメットアッセイは、DNA 損傷や DNA 除去修復の過程によって生じる一過性の DNA 鎖切断を検出できる試験であるため、原理的には DNA 鎖切断を引き起こす化合物であればどんな化合物の遺伝毒性も検出可能である。しかしながら、マイトマイシン C のような DNA 鎖間架橋を引き起こす化合物の遺伝毒性を検出することは難しい [Sakaki et al., 2015]。ただし、DNA 鎖切断剤によって誘発される DNA 移動度の相対的な減少を評価する修正コメットアッセイによって、DNA 鎖間架橋剤の DNA 損傷を間接的に評価することが可能である [Merk and Speit, 1999; McKenna et al., 2003]。以上のことから、DNA 損傷を検出する原理的にも、コメットアッセイは UDS 試験よりも適用範囲の広い試験系であることが示唆される。

また、コメットアッセイは UDS 試験とは異なり放射線同位体を用いないため、より簡便な試験法である。さらにコメットアッセイは DNA 損傷の程度をソフトウェアにより半自動もしくは自動的に検出可能なため、作業者への負担が少なく、再現性の高いデータを取得可能である。

以上のことから、*in vivo* 角膜 UDS 試験及び *in vivo* 角膜コメットアッセイは、点眼剤開発において眼局所の遺伝毒性を評価するのに十分な感度があることが示唆された。両試験の中でも、*in vivo* 角膜コメットアッセイは *in vivo* 角膜 UDS 試験よりも簡便で優れた試験系であり、点眼剤開発において点眼後の眼局所の遺伝毒性を評価する試験系として有用である。そのため、今後はガイドライン化に取り組み、本手法を広く普及させる必要があると考えられた。

第6章 結論

本研究は眼局所の遺伝毒性評価系の確立とそれらの医薬品開発での活用法の提案を目的とした研究である。本研究の背景として、点眼剤開発における点眼後の眼局所での遺伝毒性評価系が存在しないという課題を取り上げた。本研究ではこの課題に対する解決策として *in vivo* 角膜 UDS 試験（第1章）及び *in vivo* 角膜コメットアッセイ（第2章）を世界で初めて確立した。次に、さらに医薬品開発に踏み込んだ課題として、動物福祉やスループット性に着目した。この課題に対しては、三次元角膜モデル及び単層培養細胞を用いたコメットアッセイを確立した（第4章）。これら一連の成果を通して、医薬品開発における本成果の活用方法を提案した（第5章）。

医薬品の遺伝毒性試験及び解釈に関する ICH S2(R1)では、哺乳類細胞を使用した *in vitro* 試験が陽性の場合、*in vitro* フォローアップ試験または2種目の *in vivo* 試験を実施することが推奨されている。加えて、局所適用の医薬品のように全身曝露が少ない場合は、汎用されている試験系でなくても、曝露部位の遺伝毒性を評価することも可能であると述べられている [ICH, 2011]。したがって、点眼剤開発において哺乳類細胞を用いた *in vitro* 遺伝毒性試験が陽性で、経口投与等での薬物の全身曝露が少ない場合は、本研究で確立した *in vivo* 角膜 UDS 試験や *in vivo* 角膜コメットアッセイが2種目の *in vivo* 試験として利用が期待できる。

In vivo 角膜 UDS 試験と *in vivo* 角膜コメットアッセイの比較からは、両試験は点眼剤開発において眼局所の遺伝毒性を評価するのに十分な感度があることが示唆された。また、両試験の中でも *in vivo* 角膜コメットアッセイは *in vivo* 角膜 UDS 試験よりも簡便で、遺伝毒性を検出する原理的にも適用範囲の広い試験系であることが明らかとなった。

In vivo 角膜遺伝毒性試験と三次元角膜モデルを使用した *in vitro* コメットアッセイの比較から、三次元角膜モデルを使用したコメットアッセイは1分間の曝露により *in vivo* 角膜遺伝毒性試験の試験結果を模擬できることが明らかとなった。

γ H2AX はラットの角膜上皮での定常的な発現が示唆されるため、遺伝毒性評価については確立することができなかったが、眼刺激性試験に組み込むことで遺伝毒性のアラートを出すことや、*in vivo* 角膜遺伝毒性試験で陽性の結果が認められた際のメカニズムの考察として期待される。

本研究では、点眼後の角膜上皮を用いた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初めて確立した。これらの評価系は、点眼剤開発における遺伝毒性評価の課題を解決できる評価系であり、医薬品開発において *in vitro* 遺伝毒性が陽性の場合の2種類の *in vivo* 試験として活用が期待できる。さらに、点眼を模擬した三次元角膜モデルを使用した *in vitro* コメットアッセイ法を確立した。これ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することが期待される。

謝辞

本研究を行うにあたり、多くの有益なご指導ご鞭撻を賜りました岩手大学 農学部 共同獣医学科 佐藤 洋 教授に心より感謝を申し上げます。

また、本論文の作成にあたり、適切なお助言を賜りました東京農工大学 農学部 共同獣医学科 佐々木 一昭 教授、同大学 同学科 鈴木 和彦 教授、岩手大学 農学部 共同獣医学科 佐藤 至 教授、同大学 同学科 古市 達哉 教授に深く感謝いたします。

本研究を行うにあたり、また、投稿論文作成にあたり、多大なご指導と御校閲を賜った、元 千寿製薬株式会社 総合研究所 倉田 昌明 副所長に謹んで感謝の意を表します。また、本研究にご理解とご協力を賜りました千寿製薬株式会社 総合研究所 薬物動態安全性グループ 原ノ園 祐 マネージャー及び同職場の皆さまに心より感謝を申し上げます。

また、第1章の UDS 試験の遂行にあたり多大なご協力を頂きました一般財団法人食品薬品安全センター 秦野研究所の皆さま、第2章のコメットアッセイの研究において眼球の組織標本作製してくださいました株式会社イナリサーチ 病理標本作製チームの皆さま、第3章において γ H2AXの免疫組織化学染色標本作製してくださいました Axcelead Drug Discovery Partners 株式会社 統合トランスレーショナル研究部門の皆さまに深く感謝し、御礼申し上げます。

最後に、未熟な私を支えて下さったすべての方に感謝します。

引用文献

Ali S, Jain SK, Abdulla M and Athar M. (1996). Paraquat induced DNA damage by reactive oxygen species. *Biochem Mol Biol Int.* **39**: 63-67.

An J, Huang YC, Xu QZ, Zhou LJ, Shang ZF, Huang B, Wang Y, Liu XD, Wu DC and Zhou PK. (2010). DNA-PKcs plays a dominant role in the regulation of H2AX phosphorylation in response to DNA damage and cell cycle progression. *BMC Mol Biol.* **11**: 18.

Anderson D, Yu TW and McGregor DB. (1998). Comet assay responses as indicators of carcinogen exposure. *Mutagenesis.* **13**: 539-555.

Araki-Sasaki K, Ohashi Y, Sasabe T, Hayashi K, Watanabe H, Tano Y and Handa H. (1995). An SV40-immortalized human corneal epithelial cell line and its characterization. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* **36**: 614-621.

Balajee AS and Bohr VA. (2000). Genomic heterogeneity of nucleotide excision repair. *Gene.* **250**: 15-30.

Bankoglu EE, Schuele C and Stopper H. (2021). Cell survival after DNA damage in the comet assay. *Arch Toxicol.* **95**: 3803-3813.

Benning V, Brault D, Duvinage C, Thybaud V and Melcion C. (1994). Validation of the *in vivo* CD1 mouse splenocyte micronucleus test. *Mutagenesis.* **9**: 199-204.

Beranek DT. (1990). Distribution of methyl and ethyl adducts following alkylation with monofunctional alkylating agents. *Mutat Res.* **231**: 11-30.

Berman HM and Young PR. (1981). The interaction of intercalating drugs with nucleic acids. *Annu Rev Biophys Bioeng.* **10**: 87-114.

Besaratinia A and Pfeifer GP. (2007). A review of mechanisms of acrylamide carcinogenicity. *Carcinogenesis*. **28**: 519-528.

Blanco-Ayala T, Andérica-Romero AC and Pedraza-Chaverri J. (2014). New insights into antioxidant strategies against paraquat toxicity. *Free Radic Res*. **48**: 623-640.

Brendler-Schwaab S, Hartmann A, Pfühler S and Speit G. (2005). The *in vivo* comet assay: use and status in genotoxicity testing. *Mutagenesis*. **20**: 245-254.

Burlinson B, Tice RR, Speit G, Agurell E, Brendler-Schwaab SY, Collins AR, Escobar P, Honma M, Kumaravel TS, Nakajima M, Sasaki YF, Thybaud V, Uno Y, Vasquez M and Hartmann A. (2007). Fourth International Workgroup on Genotoxicity testing: results of the *in vivo* Comet assay workgroup. *Mutat Res*. **627**: 31-35.

Butterworth BE, Ashby J, Bermudez E, Casciano D, Mirsalis J, Probst G and Williams G. (1987). A protocol and guide for the *in vivo* rat hepatocyte DNA-repair assay. *Mutat Res*. **189**: 123-133.

Chen Y, Mehta G and Vasiliou V. (2009). Antioxidant defenses in the ocular surface. *Ocul Surf*. **7**: 176-185.

Cholkar K, Vadlapudi AD, Trinh HM and Mitra AK. (2014). Compositions, formulation, pharmacology, pharmacokinetics, and toxicity of topical, periocular, and intravitreal ophthalmic drugs. *Methods in Pharmacology and Toxicology*. 91-118.

EFSA Scientific Committee, Hardy A, Benford D, Halldorsson T, Jeger M, Knutsen HK, More S, Naegeli H, Noteborn H, Ockleford C, Ricci A, Rychen G, Silano V, Solecki R, Turck D, Younes M, Aquilina G, Crebelli R, Gürtler R, Hirsch-Ernst KI, Mosesso P, Nielsen E, van Benthem J, Carfi M, Georgiadis N, Maurici D, Morte JP and Schlatter J. (2017). Clarification of some aspects related to genotoxicity assessment. *EFSA Journal*. **15**: 5113.

Fiedler RD, Weiner SK and Schuler M. (2010). Evaluation of a modified CD71 MicroFlow method for the flow cytometric analysis of micronuclei in rat bone marrow erythrocytes. *Mutat Res.* **703**: 122-129.

Fortini P, Raspaglio G, Falchi M and Dogliotti E. (1996). Analysis of DNA alkylation damage and repair in mammalian cells by the comet assay. **11**: 169-175.

Fujita E, Teramura Y, Shiraga T, Yoshioka S, Iwatsubo T, Kawamura A and Kamimura H. (2008). Pharmacokinetics and tissue distribution of tacrolimus (FK506) after a single or repeated ocular instillation in rabbits. *J Ocul Pharmacol Ther.* **24**: 309-319.

Furihata C, Yoshida S and Matsushima T. (1985). Potential initiating and promoting activities of diacetyl and glyoxal in rat stomach mucosa. *Jpn J Cancer Res.* **76**: 809-814.

Furihata C and Matsushima T. (2008). Use of *in vivo/in vitro* unscheduled DNA synthesis for identification of organ-specific carcinogens. *Crit Rev Toxicol.* **17**: 245-277.

Haesen S, Timmermans M and Kirsch-Volders M. (1993). Induction of micronuclei and karyotype aberrations during *in vivo* mouse skin carcinogenesis. *Carcinogenesis.* **14**: 2319-2327.

Hayashi M. (2016). The micronucleus test-most widely used *in vivo* genotoxicity test. *Genes Environ.* **38**: 1-6.

Heddle JA, Dean S, Nohmi T, Boerrigter M, Casciano D, Douglas GR, Glickman BW, Gorelick NJ, Mirsalis JC, Martus HJ, Skopek TR, Thybaud V, Tindall KR and Yajima N. (2000). *In vivo* transgenic mutation assays. *Environ Mol Mutagen.* **35**: 253-259.

International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use (ICH). (2009). M3 (R2) Guidance on nonclinical safety studies for the conduct of human clinical trials and marketing authorization for pharmaceuticals (Step 5).

International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use (ICH). (2011). S2(R1) Guidance on genotoxicity testing and data interpretation for pharmaceuticals intended for human use (Step 5).

Iyer GR, Cason MM, Womble SW, Li G and Chastain JE. (2015). Ocular pharmacokinetics comparison between 0.2% olopatadine and 0.77% olopatadine hydrochloride ophthalmic solutions administered to male New Zealand white rabbits. *J Ocul Pharmacol Ther.* **31**: 204-210.

Jones MA and Marfurt CF. (1996). Sympathetic stimulation of corneal epithelial proliferation in wounded and nonwounded rat eyes. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* **37**: 2535-2547.

Katoh M, Hamajima F, Ogasawara T and Hata K. (2009). Assessment of human epidermal model LabCyte EPI-MODEL for *in vitro* skin irritation testing according to European Centre for the Validation of Alternative Methods (ECVAM)-validated protocol. *J Toxicol Sci.* **34**: 327-334.

Katoh M, Uemura N, Hamajima F, Ogasawara T and Hata K. (2012). Morphological characterization of a reconstructed human corneal epithelial model (LabCyte CORNEA-MODEL) as an alternative to the Draize eye test for the assessment of eye irritation. *AATEX.* **17**: 2-8.

Katoh M, Hamajima F, Ogasawara T and Hata K. (2013). Establishment of a new *in vitro* test method for evaluation of eye irritancy using a reconstructed human corneal epithelial model, LabCyte CORNEA-MODEL. *Toxicol In Vitro.* **27**: 2184-2192.

Kim YC, Chiang B, Wu X and Prausnitz MR. (2014). Ocular delivery of macromolecules. *J Control Release.* **190**: 172-181.

Kimoto T, Horibata K, Chikura S, Hashimoto K, Itoh S, Sanada H, Muto S, Uno Y, Yamada M and Honma M. (2013). Interlaboratory trial of the rat *Pig-a* mutation assay using an erythroid marker HIS49 antibody. *Mutat Res.* **755**: 126-134.

Kimura A, Torigoe N, Miyata A and Honma M. (2010). Validation of a simple *in vitro* comet assay method using CHL cells. *Genes Environ.* **32**: 61-65.

Kompella UB, Kadam RS and Lee VH. (2010). Recent advances in ophthalmic drug delivery. *Ther Deliv.* **1**: 435-456.

Korr H, Botzem B, Schmitz C and Enzmann H. (2001). N-Nitrosomorpholine induced alterations of unscheduled DNA synthesis, mitochondrial DNA synthesis and cell proliferation in different cell types of liver, kidney, and urogenital organs in the rat. *Chem Biol Interact.* **134**: 217-233.

Kraynak AR, Barnum JE, Cunningham CL, Ng A, Ykoruk BA, Bennet B, Stoffregen D, Merschman M, Freeland E and Galloway SM. (2015). Alkaline comet assay in liver and stomach, and micronucleus assay in bone marrow, from rats treated with 2-acetylaminofluorene, azidothymidine, cisplatin, or isobutyraldehyde. *Mutat Res.* **786–788**: 77-86.

Kurata M, Atsumi I, Yamagiwa Y and Sakaki H. (2016). Ocular instillation toxicity study: current status and points to consider on study design and evaluation. *Fundam Toxicol Sci.* **3**: 217-232.

Lamy E, Völkel Y, Roos PH, Kassie F and Mersch-Sundermann V. (2008). Ethanol enhanced the genotoxicity of acrylamide in human, metabolically competent HepG2 cells by CYP2E1 induction and glutathione depletion. *Int J Hyg Environ Health.* **211**: 74-81.

Lee VH and Robinson JR. (1986). Topical ocular drug delivery: recent developments and future challenges. *J Ocul Pharmacol.* **2**: 67-108.

Lonati-Galligani M, Lohman PH and Berends F. (1983). The validity of the autoradiographic method for detecting DNA repair synthesis in rat hepatocytes in primary culture. *Mutat Res.* **113**: 145-160.

Lorenzo Y, Costa S, Collins AR and Azqueta A. (2013). The comet assay, DNA damage, DNA repair and

cytotoxicity: hedgehogs are not always dead. *Mutagenesis*. **28**: 427-432.

Madle S, Dean SW, Andrae U, Brambilla G, Burlinson B, Doolittle DJ, Furihata C, Hertner T, McQueen CA and Mori H. (1994). Recommendations for the performance of UDS tests in vitro and in vivo. *Mutat Res*. **312**: 263-285.

Mah LJ, El-Osta A and Karagiannis TC. (2010). γ H2AX: a sensitive molecular marker of DNA damage and repair. *Leukemia*. **24**: 679-686.

Marchetti F, Aardema MJ, Beevers C, van Benthem J, Godschalk R, Williams A, Yauk CL, Young R and Douglas GR. (2018). Identifying germ cell mutagens using OECD test guideline 488 (transgenic rodent somatic and germ cell gene mutation assays) and integration with somatic cell testing. *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen*. **832-833**: 7-18.

Martins RA, Minari AL, Chaves MD, dos Santos RWT, Barbisan LF and Ribeiro DA. (2012). Exercise preconditioning modulates genotoxicity induced by doxorubicin in multiple organs of rats. *Cell Biochem Funct*. **30**: 293-296.

Matsuda S, Wanibuchi S and Kasahara T. (2018). Quantitative analysis of γ H2AX reveals distinct responses in multiple mouse organs after administration of mitomycin C or ethyl methanesulfonate. *Mutagenesis*. **33**: 371-378.

McKenna DJ, Gallus M, McKeown SR, Downes CS and McKelvey-Martin VJ. (2003). Modification of the alkaline Comet assay to allow simultaneous evaluation of mitomycin C-induced DNA cross-link damage and repair of specific DNA sequences in RT4 cells. *DNA Repair*. **2**: 879-890.

Melchiorri D, Ortiz GG, Reiter RJ, Sewerynek E, Daniels WM, Pablos MI and Nisticò G. (1998). Melatonin reduces paraquat-induced genotoxicity in mice. *Toxicol Lett*. **95**: 103-108.

Merk O and Speit G. (1999). Detection of crosslinks with the comet assay in relationship to genotoxicity and cytotoxicity. *Environ Mol Mutagen.* **33**: 167-172.

Merz SE, Kershaw O, Petrick A, Gruber AD, Klopffleisch R and Breithaupt A. (2019). Tumour, but not age-associated, increase of senescence markers γ H2AX and p21 in the canine eye. *J Comp Path.* **173**: 41-48.

Mori M, Kobayashi H, Sugiyama C, Katsumura Y and Furihata C. (1999). Induction of unscheduled DNA synthesis in hairless mouse epidermis by skin carcinogens. *J Toxicol Sci.* **24**: 217-226.

Motoyama S, Takeiri A, Tanaka K, Harada A, Matsuzaki K, Taketo J, Matsuo S, Fujii E and Mishima M. (2018). Advantages of evaluating γ H2AX induction in non-clinical drug development. *Genes Environ.* **40**: 10.

Nikolova T, Marini F and Kaina B. (2017). Genotoxicity testing: Comparison of the γ H2AX focus assay with the alkaline and neutral comet assays. *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen.* **822**: 10-18.

Nuss RC, Puliafito CA and Dehm E. (1987). Unscheduled DNA synthesis following excimer laser ablation of the cornea in vivo. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* **28**: 287-294.

OECD. Test No.439. *In Vitro* Skin Irritation: Reconstructed Human Epidermis Test Method. (2015). 1–21.

OECD. Test No. 486: Unscheduled DNA Synthesis (UDS) Test with Mammalian Liver Cells *In Vivo*. OECD guidelines for the testing of chemicals. (1997). 1–8.

OECD. Test No. 489. *In vivo* mammalian alkaline comet assay. (2016). 1–27.

OECD. Test No.492. Reconstructed human Cornea-like Epithelium (RhCE) test method for identifying chemicals not requiring classification and labelling for eye irritation or serious eye damage. (2018). 1–39.

Okabe A, Kiriyama Y, Suzuki S, Sakurai K, Teramoto A, Kato H, Naiki-Ito A, Tahara S, Takahashi S, Kuroda M, Sugioka A and Tsukamoto T. (2019). Short-term detection of gastric genotoxicity using the DNA double-strand break marker γ -H2AX. *J Toxicol Pathol.* **32**: 91-99.

Olsen AK, Dertinger SD, Krüger CT, Eide DM, Instanes C, Brunborg G, Hartwig A and Graupner A. (2017). The *Pig-a* Gene Mutation Assay in Mice and Human Cells: A Review. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* **121**: 78-92.

Oshiro Y, Balwierz PS, Falk RW and Piper CE. (1987). Decision criteria for the *in vitro* rat hepatocyte UDS assay. *J Appl Toxicol.* **7**: 379-385.

Ostling O and Johanson KJ. (1984). Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochem Biophys Res Commun.* **123**: 291-298.

Patel A, Cholkar K, Agrahari V and Mitra AK. (2013). Ocular drug delivery systems: An overview. *World J Pharmacol.* **2**: 47-64.

Plappert-Helbig U, Libertini S, Frieauff W, Theil D and Martus H. (2018). Gamma-H2AX immunofluorescence for the detection of tissue-specific genotoxicity *in vivo*. *Environ Mol Mutagen.* **60**: 4-16.

Purohit V and Basu AK. (2000). Mutagenicity of nitroaromatic compounds. *Chem Res Toxicol.* **13**: 673-692.

Ray G and Husain SA. (2002). Oxidants, antioxidants and carcinogenesis. *Indian J Exp Biol.* **40**: 1213-1232.

Rogakou EP, Pilch DR, Orr AH, Ivanova VS and Bonner WM. (1998). DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139. *J Biol Chem.* **273**: 5858-5868.

Rogers CS, Chan LM, Sims YS, Byrd KD, Hinton DL and Twining SS. (2004). The effects of sub-solar levels

of UV-A and UV-B on rabbit corneal and lens epithelial cells. *Exp Eye Res.* **78**: 1007-1014.

Sakaki H, Kakehi M, Sadamoto K, Nemoto S and Kurata M. (2015). *In vitro* comet assay in cultured human corneal epithelial cells. *Fundam Toxicol Sci.* **2**: 147-153.

Sasaki YF, Saga A, Akasaka M, Ishibashi S, Yoshida K, Su YQ, Matsusaka N and Tsuda S. (1998). Detection of *in vivo* genotoxicity of haloalkanes and haloalkenes carcinogenic to rodents by the alkaline single cell gel electrophoresis (comet) assay in multiple mouse organs. *Mutat Res.* **419**: 13-20.

Schehrer L, Regan JD and Westendorf J. (2000). UDS induction by an array of standard carcinogens in human and rodent hepatocytes: effect of cryopreservation. *Toxicology.* **147**: 177-191.

Singh NP, McCoy MT, Tice RR and Schneider EL. (1988). A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res.* **175**: 184-91.

Suzuki H, Takasawa H, Kobayashi K, Terashima Y, Shimada Y, Ogawa I, Tanaka J, Imamura T, Miyazaki A and Hayashi M. (2009). Evaluation of a liver micronucleus assay with 12 chemicals using young rats (II): a study by the Collaborative Study Group for the Micronucleus Test/Japanese Environmental Mutagen Society-Mammalian Mutagenicity Study Group. *Mutagenesis.* **24**: 9-16.

Tahara H, Matsuda S, Yamamoto Y, Yoshizawa H, Fujita M, Katsuoka Y and Kasahara T. (2017). 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. *J Pharmacol Toxicol Methods.* **88**: 92-99.

Takahashi Y, Koike M, Honda H, Ito Y, Sakaguchi H, Suzuki H and Nishiyama N. (2008). Development of the short time exposure (STE) test: an *in vitro* eye irritation test using SIRC cells. *Toxicol In Vitro.* **22**: 760-770.

Tanaka R and Amano Y. (1985). Stimulation and inhibition of DNA synthesis and cell growth by paraquat in cultured cells. *J Toxicol Sci.* **10**: 309-314.

Tice RR, Hayashi M, MacGregor JT, Anderson D, Blakey DH, Holden HE, Kirsch-Volders M, Oleson Jr. FB, Pacchierotti F, Preston RJ, Romagna F, Shimada H, Sutou S and Vannier B. (1994). Report from the working group on the *in vivo* mammalian bone marrow chromosomal aberration test. *Mutat Res.* **312**: 305-312.

Tojo K. (1989). A model for extraocular fluid dynamics. *J Chem Eng Japan.* **22**: 518-521.

Toyoda T, Akagi J, Cho Y, Mizuta Y, Onami S, Suzuki I and Ogawa K. (2013). Detection of γ -H2AX, a biomarker for DNA double-strand breaks, in urinary bladders of n-butyl-n-(4-hydroxybutyl)-nitrosamine-treated rats. *J Toxicol Pathol.* **26**: 215-221.

Toyoizumi T, Ohta R, Nakagawa Y, Tazura Y, Kuwagata M, Noguchi S and Yamakage K. (2011). Use of the *in vivo* skin comet assay to evaluate the DNA-damaging potential of chemicals applied to the skin. *Mutat Res.* **726**: 175-180.

Tseng TH, Chu CY, Huang JM, Shiow SJ and Wang CJ. (1995). Crocetin protects against oxidative damage in rat primary hepatocytes. *Cancer Lett.* **97**: 61-67.

Ueda K, Ohtori A and Tojo K. (2010). Effects of pathological conditions on ocular pharmacokinetics of antimicrobial drugs. *Chem Pharm Bull.* **58**: 1301-1305.

Uno Y, Kojima H, Omori T, Corvi R, Honma M, Schechtman LM, Tice RR, Beevers C, Boeck MD, Burlinson B, Hobbs CA, Kitamoto S, Kraynak AR, McNamee J, Nakagawa Y, Pant K, Plappert-Helbig U, Priestley C, Takasawa H, Wada K, Wirtzner U, Asano N, Escobar PA, Lovell D, Morita T, Nakajima M, Ohno Y and Hayashi M. (2015). JaCVAM-organized international validation study of the *in vivo* rodent alkaline comet assay for detection of genotoxic carcinogens: II. Summary of definitive validation study results. *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen.* **786–788**: 45-76.

Wilson WD and Jones RL. (1981). Intercalating drugs: DNA binding and molecular pharmacology. *Adv Pharmacol Chemother.* **18**: 177-222.

Wu H, Zhang H, Wang C, Wu Y, Xie J, Jin X, Yang J and Ye J. (2011). Genoprotective effect of hyaluronic acid against benzalkonium chloride-induced DNA damage in human corneal epithelial cells. *Mol Vis.* **17**: 3364-3370.

Wyatt MD and Pittman DL. (2006). Methylating agents and DNA repair responses: methylated bases and sources of strand breaks. *Chem Res Toxicol.* **19**: 1580-1594.

Yang F, Teves SS, Kemp CJ and Henikoff S. (2014). Doxorubicin, DNA torsion, and chromatin dynamics. **1845**: 84-89.

Ye J, Wu H, Zhang H, Wu Y, Yang J, Jin X and Shi X. (2011). Role of benzalkonium chloride in DNA strand breaks in human corneal epithelial cells. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* **249**: 1681-1687.

Yoshizawa K, Sasaki T, Kuro M, Miki H, Kimura A, Uehara N, Yuri T and Tsubura A. (2011). Corneal damage induced in adult mice by a single intraperitoneal injection of N-ethyl-N-nitrosourea. *In Vivo.* **25**: 609-615.

Yu C, Chen P, Xu J, Liu Y, Li H, Wang L and Di G. (2020). hADSCs derived extracellular vesicles inhibit NLRP3 inflammasome activation and dry eye. *Sci Rep.* **10**: 14521.

Zhang T, Xiang CD, Gale D, Carreiro S, Wu EY and Zhang EY. (2008). Drug transporter and cytochrome P450 mRNA expression in human ocular barriers: implications for ocular drug disposition. *Drug Metab Dispos.* **36**: 1300-1307.

大塚製薬株式会社. ムコスタ®点眼液 UD2%. 審査報告書. 2011年09月26日.

久世 博. (2018). 6.8.3 視覚器毒性. 日本毒性学会教育委員会 編集, トキシコロジー 第3版, p.p. 259-265, 株式会社朝倉書店, 東京.

興和株式会社. グラナテック®点眼液 0.4%. 審査報告書. 2014年09月26日.

千寿製薬株式会社. アイファガン®点眼液 0.1%. 審査報告書. 2012年01月18日.

日本製薬工業会. (2015). 遺伝毒性試験 Q&A 2014 (2012-2013年度 活動報告) 改訂版. p.p. 51-54, 製薬協 医薬品評価委員会 基礎研 資料 No. 178.

本間 正充. (2018). 5.3 遺伝毒性. 日本毒性学会教育委員会 編集, トキシコロジー 第3版, p.p. 128-141, 株式会社朝倉書店, 東京.

本間 正充. 遺伝毒性概要. 2019, 国立医薬品食品衛生研究所・安全性生物試験研究センター 変異遺伝部, <https://www.nihs.go.jp/dgm/genotoxicitytest2R.html>

本瀬 賢治. (1984). 2. 点眼薬の bioavailability. 点眼剤, 第1版, p.p. 179-185, 株式会社南山堂, 東京.

図表

Table 1-1. Summary of histopathological findings in the corneal epithelium in Experiment 1 of the *in vivo* corneal UDS test.

| Findings | Compounds Dose | Grade | N.C. ^{a)} | Paraquat | | | Acridine orange | | | EtBr | | | P.C. ^{b)} |
|--|-------------------|-------|--------------------|----------|-------|-------|-----------------|------|------|-------|------|----|--------------------|
| | | | | 0.15% | 0.75% | 3.75% | 0.1% | 0.5% | 2.5% | 0.25% | 0.5% | 1% | |
| No. of corneas examined | | | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 2 |
| No abnormal findings | | | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 0 | 0 | 4 | 4 | 4 | 0 |
| Pale, cytoplasmic, epithelial cell | | ± | | | | | 2 | 3 | | | | | |
| | | + | | | | | 2 | 1 | | | | | |
| Desquamation, superficial cell | | ± | | | | | | 1 | | | | | |
| Degeneration, vacuolar | | ± | | | | | 4 | 4 | | | | | |
| Degeneration/necrosis, epithelial cell | | ++ | | | | | | | | | | | 2 ^{c)} |

±: very slight, +: slight, ++: moderate.

Paraquat: 1,1'-dimethyl-4,4'-bipyridinium dichloride, EtBr: ethidium bromide.

a): Saline, b): ultraviolet irradiation (1 J/cm²), c): specifically on the surface layer.

Table 1-2. Summary of histopathological findings in the corneal epithelium in Experiment 2 of the *in vivo* corneal UDS test.

| Findings | Compounds Dose | Grade | N.C. ^{a)} | V.C. ^{b)} | Paraquat | | | | Acridine orange | | P.C. ^{c)} |
|--|-------------------|-------|--------------------|--------------------|----------|-----|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|--------------------|
| | | | | | 5% | 10% | 20% | 40% | 2.5% | 5% | |
| No. of corneas examined | | | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 2 |
| No abnormal findings | | | 4 | 4 | 4 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Pale, cytoplasmic, epithelial cell | | ± | | | | | | | 3 | 4 | |
| | | + | | | | | | | 1 | | |
| Hypertrophy, epithelial cell | | ± | | | | 3 | 4 | 4 | 1 | 3 | |
| Degeneration, vacuolar | | ± | | | | | | | 4 | 3 | |
| | | + | | | | | | | | 1 | |
| Degeneration/necrosis, epithelial cell | | ± | | | | | 2 ^{d)} | 2 ^{d)} | 1 ^{d)} | 3 ^{d)} | |
| | | ++ | | | | | | | | | 2 ^{e)} |

±: very slight, +: slight, ++: moderate.

Paraquat: 1,1'-dimethyl-4,4'-bipyridinium dichloride.

a): Saline, b): dimethyl sulfoxide, c): ultraviolet irradiation (1 J/cm²), d): superficial cell, e): specifically on the surface layer.

Table 1-3. Summary of histopathological findings in the corneal epithelium in Experiment 3 of the *in vivo* corneal UDS test.

| Findings | Compounds Dose | Grade | N.C. ^{a)} | V.C. ^{b)} | Acrylamide | 4-NQO | P.C. ^{c)} |
|--|-------------------|-------|--------------------|--------------------|------------|-------|--------------------|
| | | | | | 3% | 2% | |
| No. of corneas examined | | | 4 | 4 | 4 | 4 | 2 |
| No abnormal findings | | | 4 | 4 | 4 | 0 | 2 |
| Degeneration/necrosis, epithelial cell | | ± | | | | 3 | |
| | | ++ | | | | 1 | |
| Desquamation, superficial cell | | ++ | | | | 1 | |
| Increase, nucleoli, epithelial cell | | + | | | | 4 | |
| Enlargement, nuclear, epithelial cell | | ± | | | | 4 | |

±: very slight, +: slight, ++: moderate.

4-NQO: 4-nitroquinoline 1-oxide.

a): General vehicle for ophthalmic solution, b): dimethyl sulfoxide, c): 5% ethidium bromide.

Table 2-1. Mean % tail DNA and hedgehog frequency in the corneal epithelial cells at 2 h after instillation in the *in vivo* corneal comet assay.

| Compounds | Concentration | % tail DNA (%) | Hedgehog (%) |
|---------------------|---------------|----------------|--------------|
| <u>Experiment 1</u> | | | |
| Saline | 0% | 7.3 ± 0.4 | 0.0 ± 0.0 |
| Paraquat | 1% | 8.0 ± 2.5 | 0.0 ± 0.0 |
| | 5% | 6.8 ± 1.2 | 0.0 ± 0.0 |
| EtBr | 0.25% | 15.2 ± 1.9 * | 0.7 ± 1.2 |
| | 1% | 24.0 ± 1.6 * | 7.0 ± 5.6 |
| <u>Experiment 2</u> | | | |
| Saline | 0% | 8.8 ± 2.2 | 0.0 ± 0.0 |
| MMS | 0.6% | 39.9 ± 6.0 * | 0.0 ± 0.0 |
| | 3% | 55.1 ± 3.9 * | 7.3 ± 4.6 |
| Acrylamide | 0.6% | 10.3 ± 5.2 | 0.0 ± 0.0 |
| | 3% | 12.1 ± 1.7 | 0.0 ± 0.0 |
| <u>Experiment 3</u> | | | |
| 5% DMSO | 0% | 7.9 ± 2.0 | 0.0 ± 0.0 |
| 4-NQO | 0.2% | 24.6 ± 3.2 * | 1.3 ± 1.2 |
| | 1% | 36.0 ± 11.6 * | 6.7 ± 4.2 |

Data are presented as mean ± SD (n = 3).

Paraquat: 1,1'-dimethyl-4,4'-bipyridinium dichloride, EtBr: ethidium bromide, MMS: methyl methanesulfonate, 5% DMSO: 5% dimethyl sulfoxide in saline, 4-NQO: 4-nitroquinoline 1-oxide.

*: Dunnett's multiple comparison test, significantly higher than the negative control group (saline or 5% DMSO) at the probability of 5% level (one-tailed).

Table 2-2. Histopathological findings in the cornea at 24 h after instillation in the *in vivo* corneal comet assay.

| Findings | Compounds | | | |
|---|-----------|---------|--------|----------|
| | Saline | 1% EtBr | 3% MMS | 1% 4-NQO |
| No. of corneas examined | 1 | 1 | 1 | 1 |
| Degeneration/necrosis, corneal epithelium | – | – | – | ++ |
| Infiltrate, inflammatory cell, corneal limbus | – | – | ± | ± |
| Infiltrate, inflammatory cell, corneal stroma | – | – | – | ± |

–: No abnormal findings, ±: very slight, ++: moderate.

EtBr: ethidium bromide, MMS: methyl methanesulfonate, 4-NQO: 4-nitroquinoline 1-oxide.

Table 2-3. Time-course changes of the % tail DNA and hedgehog in the corneal epithelial cells of rabbit in the corneal comet assay.

| Compounds | % tail DNA (%) | | | | | Hedgehog (%) | | | | |
|-----------|----------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|------------|--------------|-------------|-------------|
| | 0.5 h | 2 h | 4 h | 6 h | 24 h | 0.5 h | 2 h | 4 h | 6 h | 24 h |
| Saline | 9.6 ± 4.8 | 13.4 ± 1.0 | 10.2 ± 1.3 | 9.8 ± 3.1 | 8.3 ± 1.7 | 0.2 ± 0.6 | 1.1 ± 1.2 | 0.7 ± 1.0 | 0.7 ± 0.0 | 0.4 ± 0.6 |
| 1% EtBr | 31.0 ± 3.0 † | 28.1 ± 1.6 † | 55.3 ± 1.4 † | 41.0 ± 6.5 † | 10.0 ± 4.0 | 3.6 ± 2.5 | 3.3 ± 1.7 | 8.9 ± 3.5 † | 1.6 ± 2.3 | 0.4 ± 0.6 |
| 3% MMS | 66.2 ± 1.8 † | 63.6 ± 4.4 † | 47.1 ± 7.2 † | 50.1 ± 2.8 † | 40.1 ± 2.4 † | 12.9 ± 7.8 | 13.6 ± 8.3 | 10.7 ± 1.0 † | 8.0 ± 2.0 † | 2.0 ± 1.0 † |
| 1% 4-NQO | 55.2 ± 11.2 † | 38.9 ± 7.8 ‡ | 35.9 ± 2.6 † | 26.1 ± 2.6 † | 18.7 ± 5.0 † | 9.8 ± 8.5 | 3.8 ± 2.9 | 1.3 ± 1.0 | 1.1 ± 0.6 | 2.0 ± 2.0 † |

Data are presented as mean ± SD (n = 3).

EtBr: ethidium bromide, MMS: methyl methanesulfonate, 4-NQO: 4-nitroquinoline 1-oxide.

†: Student's *t*-test, significantly higher than the negative control group (saline) at 5% probability level (one-tailed).

‡: Welch *t*-test, significantly higher than the negative control group (saline) at 5% probability level (one-tailed).

Table 4-1. The lowest compound concentrations that caused DNA damage in the each genotoxicity test.

| Compounds | Mechanisms of DNA damage | <i>In vivo</i> | <i>In vivo</i> | <i>In vitro</i> corneal comet assay | |
|-------------------|--------------------------|------------------|---------------------|-------------------------------------|-------------|
| | | corneal UDS test | corneal comet assay | 3D corneal model | HCE-T cells |
| Paraquat | Radical generation | 10% | (5%) | 0.05% | (1%) |
| Hydrogen peroxide | Radical generation | – | – | 0.03% | 0.0001% |
| EtBr | DNA intercalation | ≤0.25% | ≤0.25% | 0.25% | 0.002% |
| Acridine orange | DNA intercalation | 5% | – | 0.005% | 0.00001% |
| 4-NQO | DNA adduct formation | ≤2% | ≤0.2% | 0.001% | 0.001% |
| Acrylamide | DNA adduct formation | (3%) | (3%) | (3%) | (3%) |
| MMS | DNA alkylation | – | ≤0.6% | 0.3% | 0.1% |

–: Non-conducted.

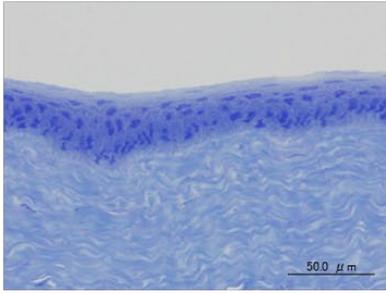
Paraquat: 1,1'-dimethyl-4,4'-bipyridinium dichloride, EtBr: ethidium bromide, 4-NQO: 4-nitroquinoline 1-oxide, MMS: methyl methanesulfonate.

The values present the lowest compound concentrations that caused DNA damage.

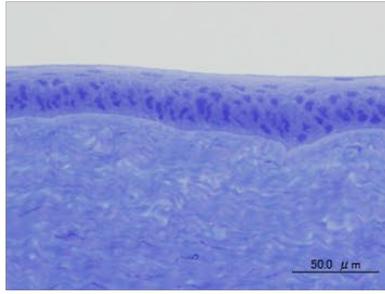
The values in the parentheses present the highest compound concentration that did not cause DNA damage.

Experiment 1

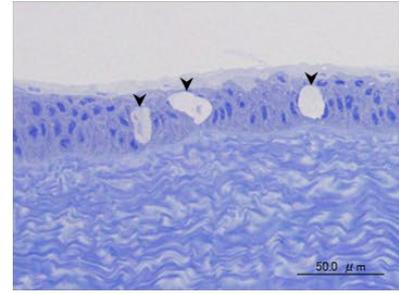
a) Negative control (Saline)



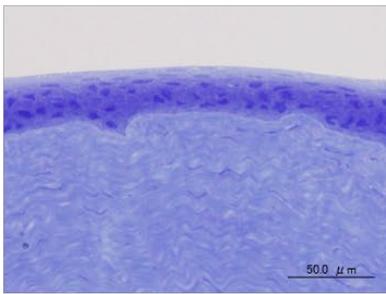
b) 3.75% Praquat



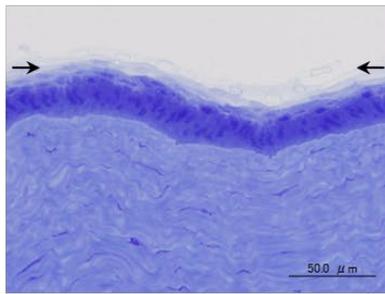
c) 0.5% Acridine orange



d) 1% EtBr

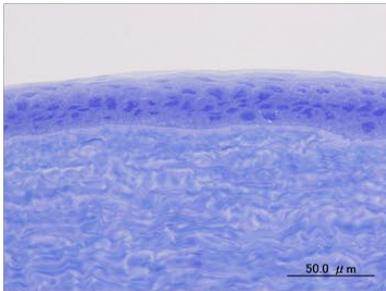


e) Positive control (UV)

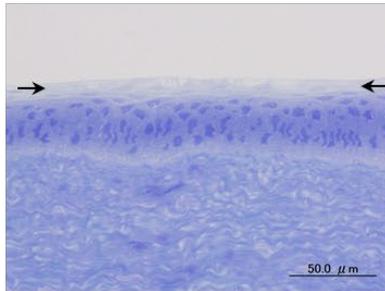


Experiment 2

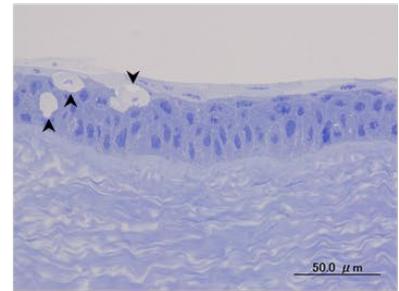
f) Vehicle control (DMSO)



g) 40% Paraquat

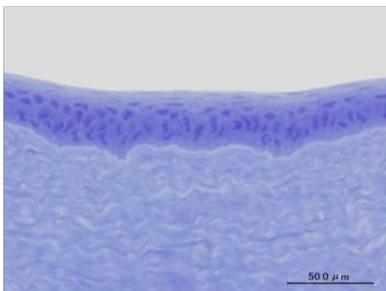


h) 5% Acridine orange

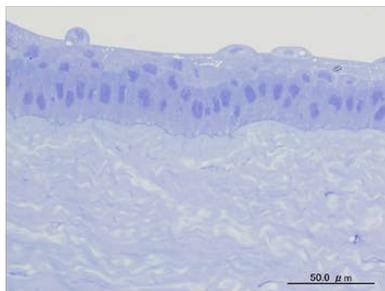


Experiment 3

i) 3% Acrylamide



j) 2% 4-NQO



k) Positive control (5% EtBr)

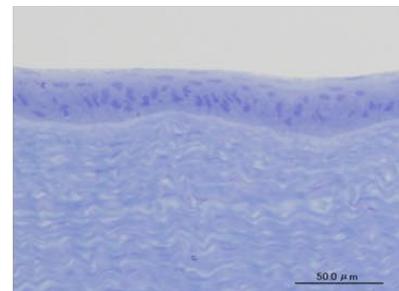
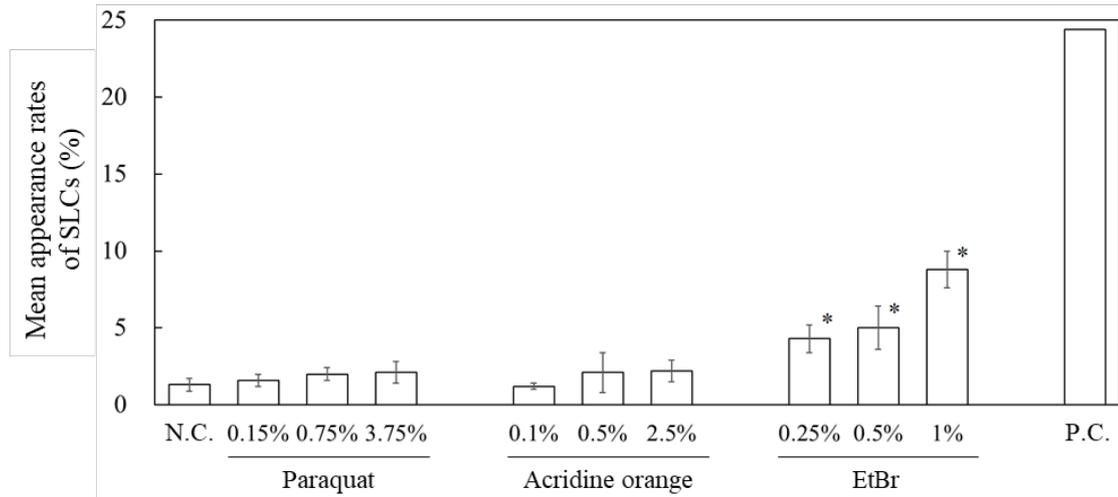


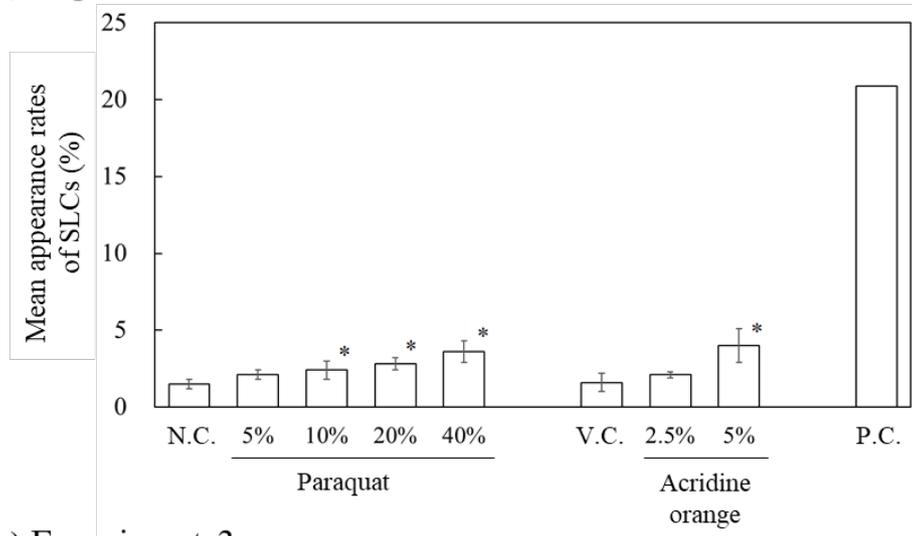
Figure 1-1. Representative photomicrographs of corneal epithelia in rabbits in the *in vivo* corneal UDS test. Test compounds and controls were instilled once to the eyes of rabbits, and the corneas were collected at 2 h after administration. As a positive control, ultraviolet (UV) was irradiated at 1 J/cm² to the corneas of the

rabbit, and the corneas were collected immediately after irradiation. No histopathological changes were observed in the corneal epithelium in the negative control (saline)-, 3.75% 1,1'-dimethyl-4,4'-bipyridinium dichloride (paraquat)-, and 1% ethidium bromide (EtBr)-treated eyes in Experiment 1 (a, b and d). In the 0.5% acridine orange-treated eyes, corneal epithelium had pale-colored cytoplasm, and several corneal epithelium were vacuolated (arrowheads) (c). Moderate degeneration/necrosis of epithelial cells in the surface layer (arrows) was observed in the positive control (UV irradiation)-treated eyes (e). No histopathological change was observed in the corneal epithelium in the vehicle control (dimethyl sulfoxide; DMSO)-treated eyes in Experiment 2 (f). Very slight hypertrophy of epithelial cells and degeneration/necrosis of superficial cells (arrows) were observed in the 40% paraquat-treated eyes (g). In the 5% acridine orange-treated eyes, corneal epithelium had pale-colored cytoplasm, and several corneal epithelium were vacuolated (arrowheads) (h). No histopathological change was observed in the corneal epithelium in the 3% acrylamide-treated eyes in Experiment 3 (j). Very slight nuclear enlargement in the corneal epithelium was observed in the 2% 4-nitroquinoline 1-oxide (4-NQO)-treated eyes (j). No histopathological change was observed in the corneal epithelium in the positive control (5% EtBr)-treated eyes (k). Corneal sections were stained with toluidine blue. Scale bars: 50 μ m.

a) Experiment 1



b) Experiment 2



c) Experiment 3

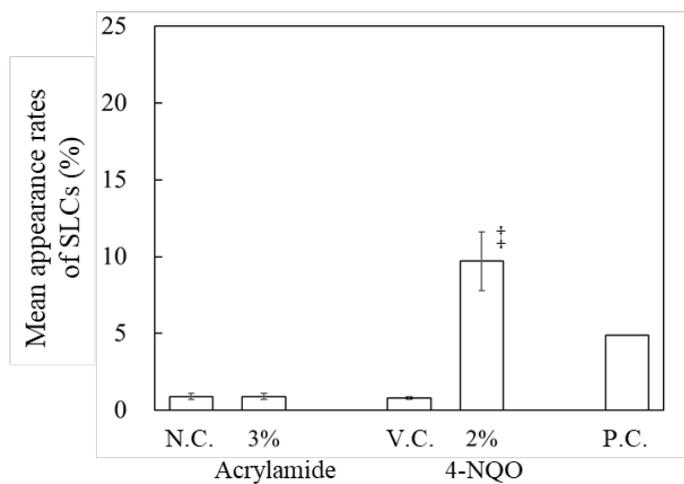
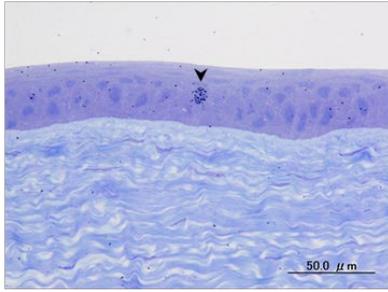


Figure 1-2. Mean appearance rates of sparsely labeled cells (SLCs) in the corneal epithelium in the *in vivo* corneal UDS test. Test compounds and controls were instilled once to the eyes of rabbits, and the corneas

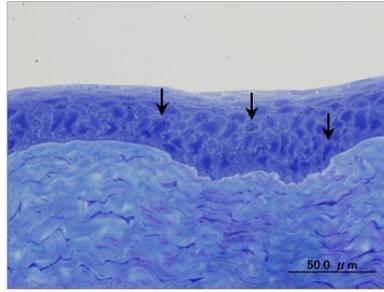
were collected at 2 h after administration. The following test compounds were used: 1,1'-dimethyl-4,4'-bipyridinium dichloride (paraquat), acridine orange, or ethidium bromide (EtBr) in Experiment 1 (a), higher concentrations of paraquat or acridine orange in Experiment 2 (b), and acrylamide or 4-nitroquinoline 1-oxide (4-NQO) in Experiment 3 (c). As the negative control, saline in Experiments 1 and 2 (a and b) or a general vehicle for ophthalmic solution in Experiment 3 (c) were used. As the vehicle control, dimethyl sulfoxide (DMSO) was used in Experiments 2 and 3 (b and c). As the positive control, ultraviolet (UV) was irradiated at 1 J/cm² in Experiments 1 and 2 (a and b), and 5% EtBr was administered in Experiment 3 (c). In the UV irradiation group, the corneas were collected immediately irradiation. Each bar indicates the mean \pm SD. *: $p < 0.05$ (Dunnett's multiple comparison test, one-tailed) (Comparison with the negative control or vehicle control). ‡: $p < 0.05$ (Welch *t*-test, one-tailed) (Comparison with the vehicle control).

Experiment 1

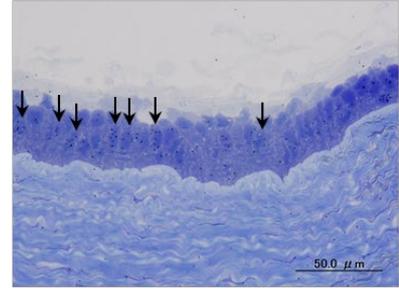
a) Negative control (Saline)



b) 0.25% EtBr

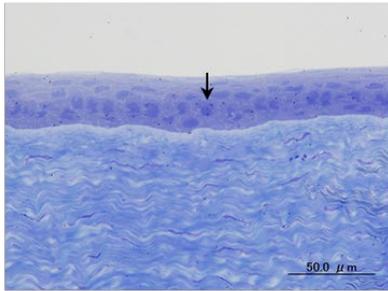


c) Positive control (UV)

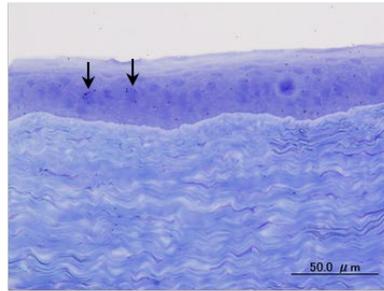


Experiment 2

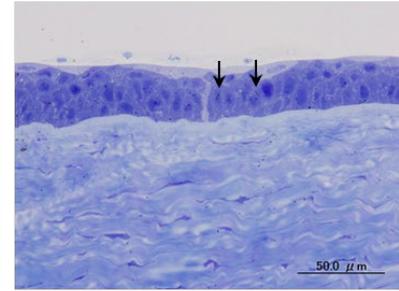
d) Vehicle control (DMSO)



e) 40% Paraquat

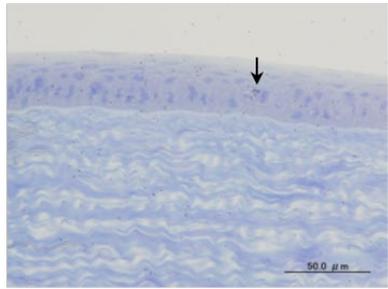


f) 5% Acridine orange

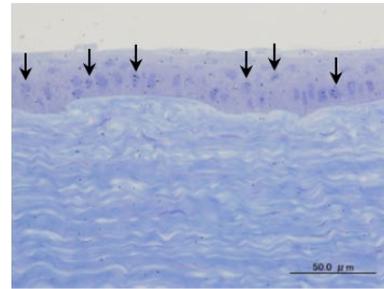


Experiment 3

g) 3% Acrylamide



h) 2% 4-NQO



i) Positive control (5% EtBr)

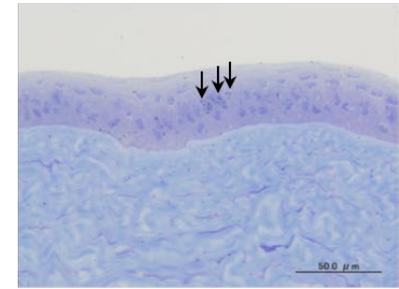
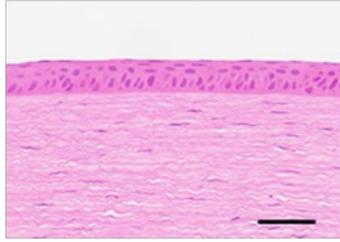


Figure 1-3. Representative light microscopic autoradiographs of corneal epithelia in the *in vivo* corneal UDS test. Test compounds and controls were instilled once to the eyes of rabbits, and the corneas were collected at 2 h after administration. As a positive control, ultraviolet (UV) was irradiated at 1 J/cm² to the corneas of the rabbit, and the corneas were collected immediately after irradiation. Each autoradiograph indicates the corneal epithelia of the negative control (saline)- (a), 0.25% ethidium bromide (EtBr)- (b), or the positive control (1 J/cm² UV irradiation)-treated eyes (c) in Experiment 1, the vehicle control (dimethyl sulfoxide; DMSO)- (d), 40% 1,1'-dimethyl-4,4'-bipyridinium dichloride (paraquat)- (e), or 5% acridine orange-treated eyes (f) in Experiment 2, and 3% acrylamide- (g), 2% 4-nitroquinoline 1-oxide (4-NQO)- (h), or the positive control (5% EtBr)-treated eyes (i) in Experiment 3. Arrows indicate sparsely labeled cells (SLCs), which

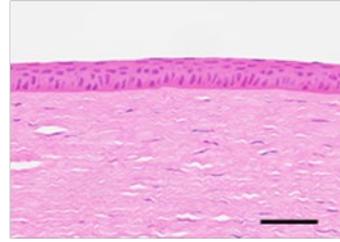
exhibit unscheduled DNA synthesis. Only a subset of arrows is depicted in the positive control (UV irradiation) because many SLCs are present. Arrowhead indicates heavily labeled cells, which are undergoing DNA replication (S-phase). Scale bars: 50 μm .

Experiment 1

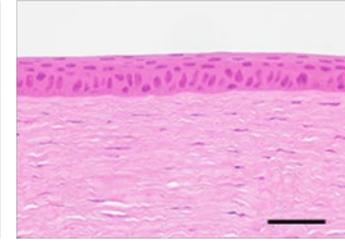
a) Saline



b) 5% Paraquat

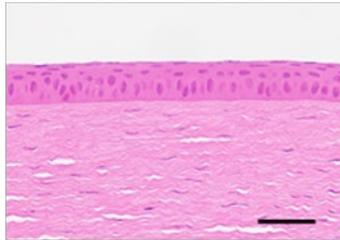


c) 1% EtBr

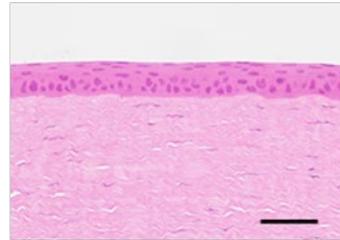


Experiment 2

d) 3% MMS

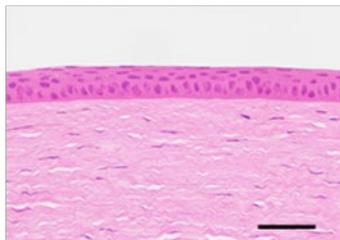


e) 3% Acrylamide



Experiment 3

f) 5% DMSO



g) 1% 4-NQO

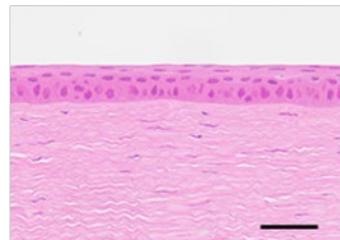
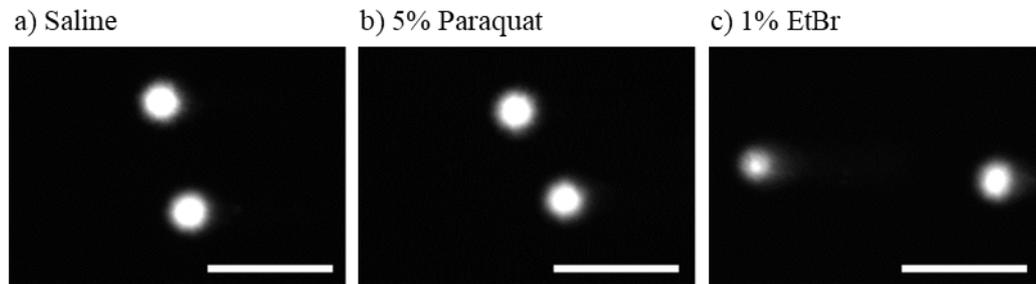
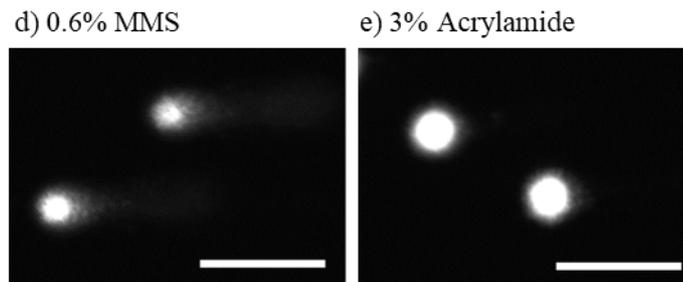


Figure 2-1. Representative photomicrographs of corneal epithelia in rabbits in the *in vivo* corneal comet assay. Saline as a negative control (a), 5% 1,1'-dimethyl-4,4'-bipyridinium dichloride (paraquat) (b), 1% ethidium bromide (EtBr) (c), 3% methyl methanesulfonate (MMS) (d), 3% acrylamide (e), 5% dimethyl sulfoxide in saline (5% DMSO) as a negative control (f), and 1% 4-nitroquinoline 1-oxide (4-NQO) (g) were administered once to the eyes of rabbits. The corneas were collected at 2 h after administration, and corneal sections were stained with hematoxylin and eosin. No histopathological changes were observed for any of the treatment or control groups. Scale bars: 50 μ m.

Experiment 1



Experiment 2



Experiment 3

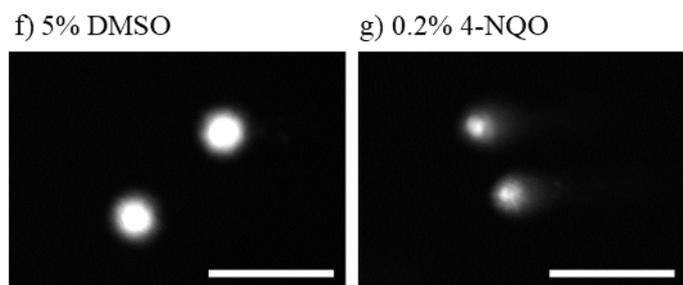


Figure 2-2. Representative comet images of corneal epithelial cells in rabbits. The comet assay was performed using corneal epithelial cells at 2 h after single ocular instillation of saline as a negative control (a), 5% 1,1'-dimethyl-4,4'-bipyridinium dichloride (paraquat) (b), 1% ethidium bromide (EtBr) (c), 0.6% methyl methanesulfonate (MMS) (d), 3% acrylamide (e), 5% dimethyl sulfoxide in saline (5% DMSO) as a negative control (f), or 0.2% 4-nitroquinoline 1-oxide (4-NQO) (g). The corneal epithelial cells were stained with SYBR Green I Nucleic Acid Gel Stain. Scale bars: 100 μm.

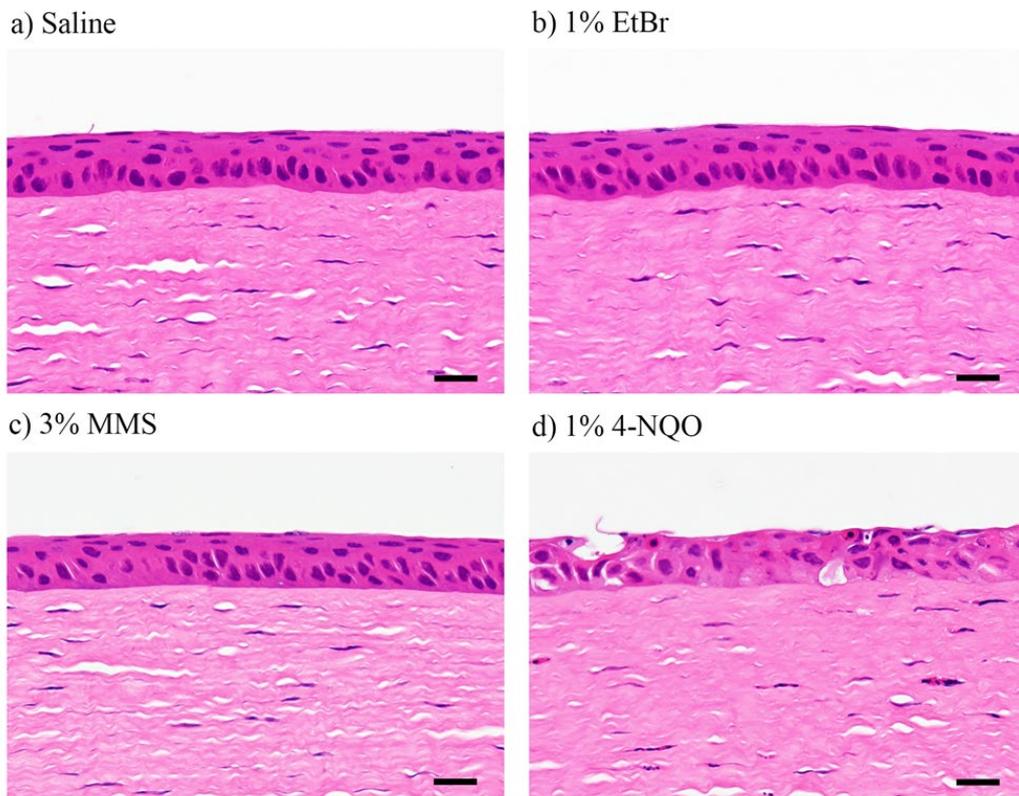
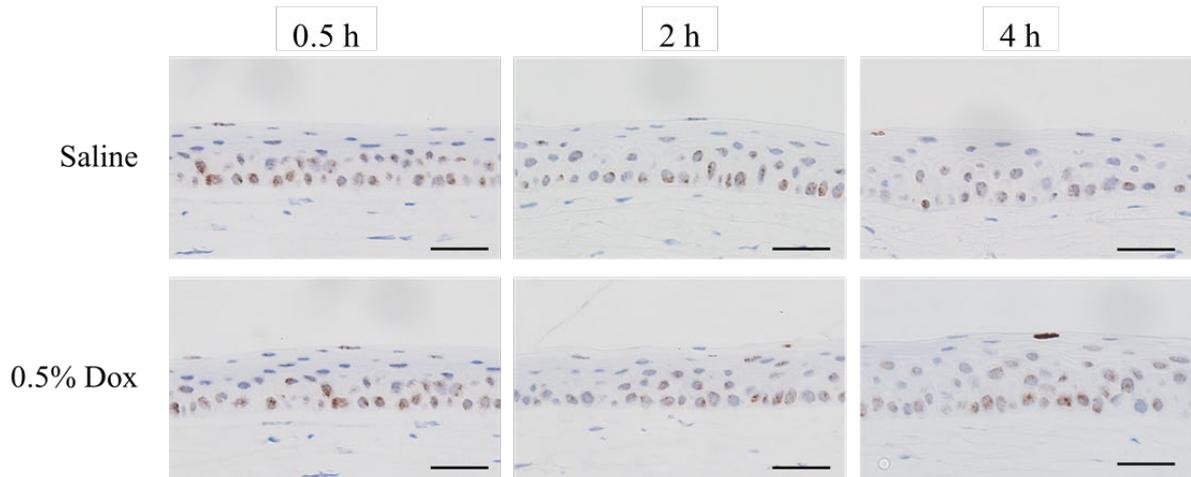


Figure 2-3. Representative photomicrographs of the corneal epithelia in the rabbits in the *in vivo* corneal comet assay. Saline as a negative control, 1% ethidium bromide (EtBr), 3% methyl methanesulfonate (MMS), and 1% 4-nitroquinoline 1-oxide (4-NQO) were administered once to the eyes of rabbits. The corneas were collected at 24 h after administration, and corneal sections were stained with hematoxylin and eosin. No histopathological changes in the corneal epithelium were observed in the saline (a), 1% EtBr (b), and 3% MMS-treated eyes (c). Moderate degeneration/necrosis was noted in the corneal epithelium in the 1% 4-NQO-treated eyes (d). Scale bars: 20 μ m.

a) Corneal epithelium



b) Testis

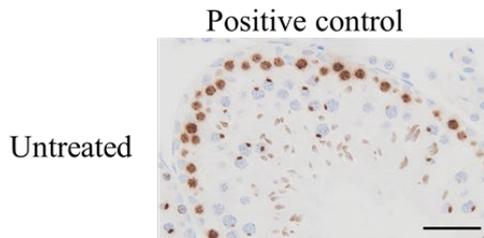


Figure 3-1. Representative immunohistochemical staining of γ H2AX in the rats. The corneas were collected at 0.5, 2, and 4 h after instillation of 0.5% doxorubicin (Dox) and saline as a negative control. The corneal epitheliums were stained with anti- γ H2AX antibody (a). The testis of untreated rat was similarly stained as a positive control for γ H2AX staining (b). Scale bars: 20 μ m.

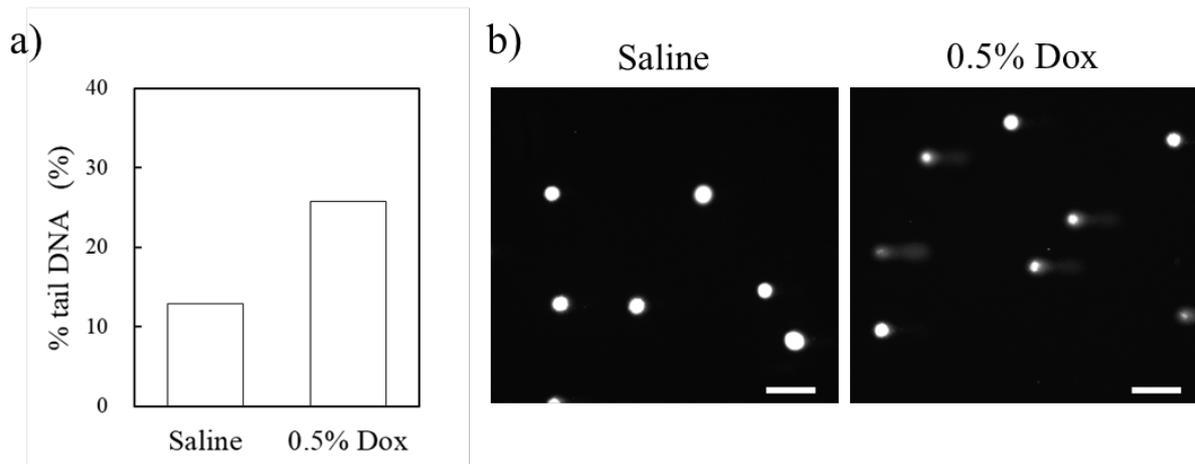


Figure 3-2. The results of comet assay of the corneal epithelial cells in the rats. The corneas were collected at 0.5 h after instillation of 0.5% doxorubicin (Dox) and saline as a negative control, and electrophoresis of corneal epithelial cells was performed. The graph shows the % tail DNA (a), and the photos show representative comet images (b). Scale bars: 100 μ m.

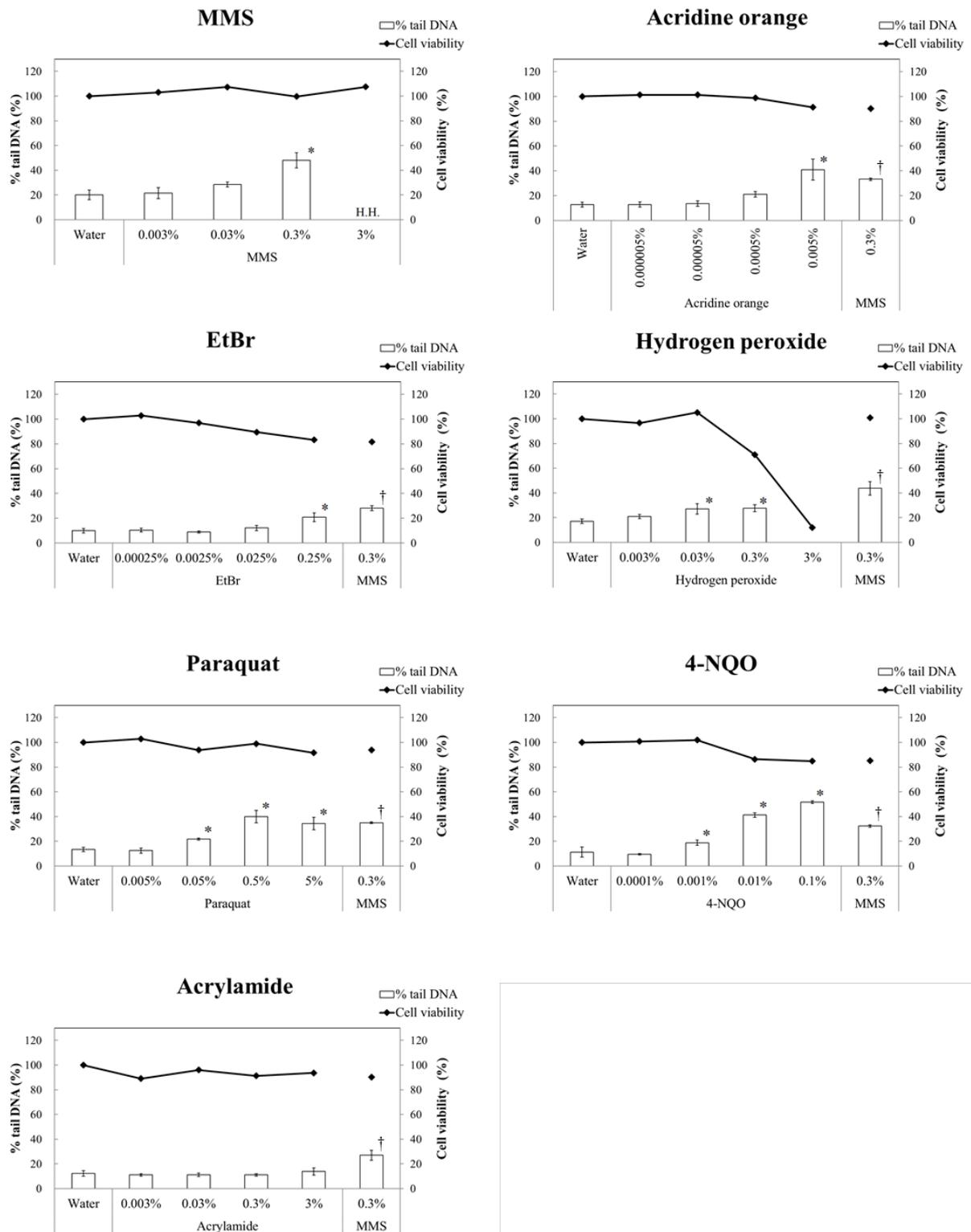


Figure 4-1. The results of comet assay and cytotoxicity test in the 3D corneal models. 3D corneal models were treated for 1 min with various concentrations of test compound solutions. The individual graphs show the results for methyl methanesulfonate (MMS), acridine orange, ethidium bromide (EtBr), hydrogen peroxide, 1,1'-dimethyl-4,4'-bipyridinium dichloride (paraquat), 4-nitroquinoline 1-oxide (4-NQO), and

acrylamide. Water for injection (water) was used as a negative control, and 0.3% MMS was used as a positive control. Each bar shows the mean \pm SD of % tail DNA in the comet assay (left-hand y-axes, n=3). The data points and lines show the cell viability in the cytotoxicity test (right-hand y-axes, n=1). H.H.: hedgehog cells, *: $p < 0.05$ (Dunnett's multiple comparison test, one-sided) (Comparison with negative control), †: $p < 0.05$ (Student's *t*-test, one-sided) (Comparison with negative control).

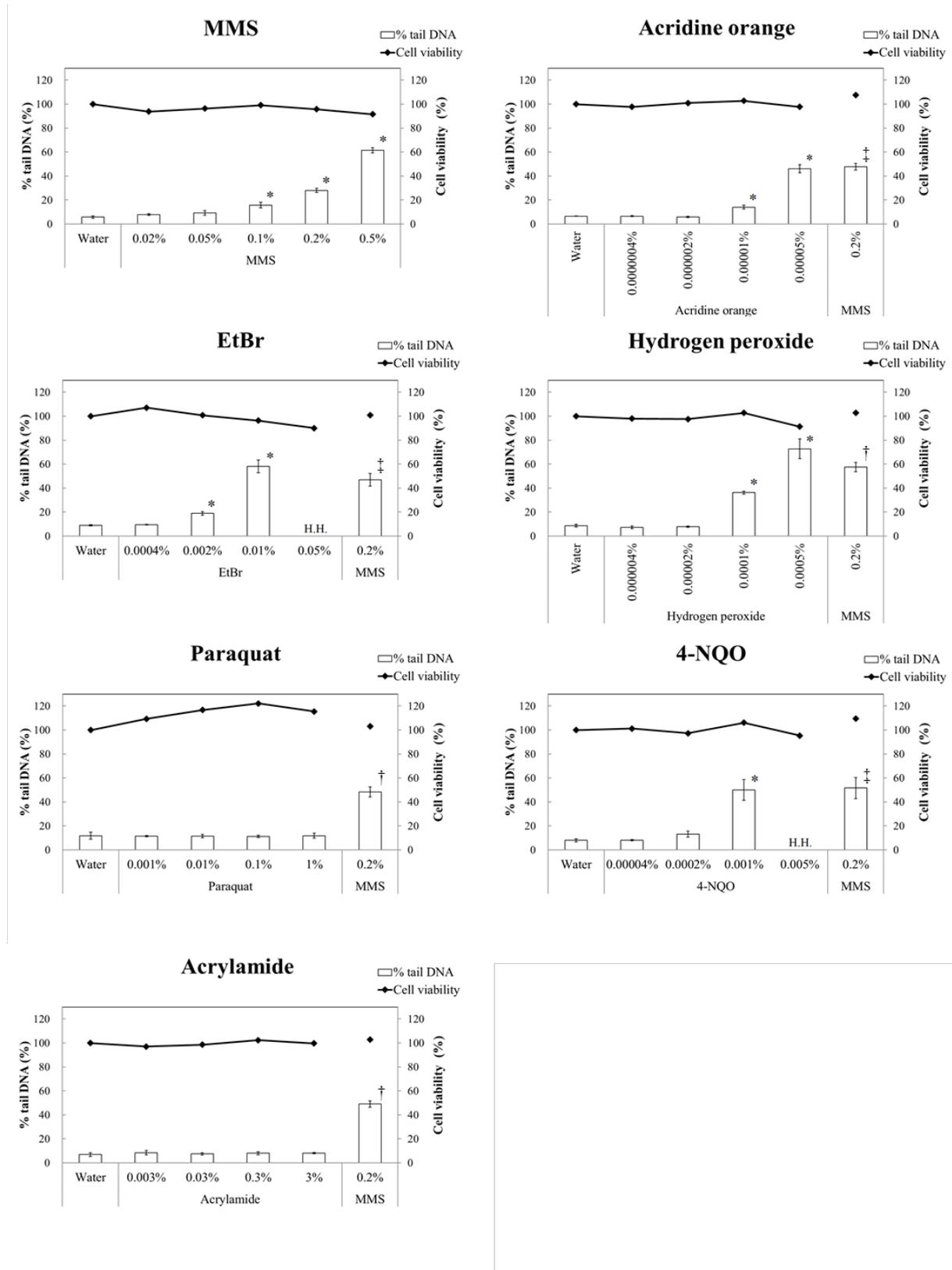


Figure 4-2. The results of comet assay and cytotoxicity test in the HCE-T cells. HCE-T cells were treated for 1 min with various concentrations of test compound solutions. The individual graphs show the results for methyl methanesulfonate (MMS), acridine orange, ethidium bromide (EtBr), hydrogen peroxide, 1,1'-

dimethyl-4,4'-bipyridinium dichloride (paraquat), 4-nitroquinoline 1-oxide (4-NQO), and acrylamide. Water for injection (water) was used as a negative control, and 0.2% MMS was used as a positive control. Each bar shows the mean \pm SD of % tail DNA in the comet assay (left-hand y-axes, n=3). The data points and lines show the cell viability in the cytotoxicity test (right-hand y-axes, n=2). H.H.: hedgehog cells, *: $p < 0.05$ (Dunnett's multiple comparison test, one-sided) (Comparison with negative control), †: $p < 0.05$ (Student's t -test, one-sided) (Comparison with negative control), ‡: $p < 0.05$ (Welch t -test, one-sided) (Comparison with negative control).