

	もちづき ひでみ
氏 名	望 月 秀 美
本籍（国籍）	日本
学位の種類	博士（獣医学）
学位記番号	獣博第2号
学位授与年月日	令和5年3月23日
学位授与の要件	学位規則第5条第2項該当 論文提出による博士
研究科及び専攻	獣医学研究科 共同獣医学専攻
学位論文題目	モルモットの化学メディエーター誘発アレルギー性結膜炎モデルの最適化と標準化に関する研究
学位審査委員	主査 教授 佐藤 洋 副査 教授 寺嶋 淳 副査 教授 佐藤 至 副査 准教授 佐々木 一昭 副査 准教授 臼井 達哉

論文の内容の要旨

アレルギー性結膜炎は、眼科領域における最も一般的な免疫性疾患である。その患者数は未だ世界で増加傾向にあり、アレルギー性結膜炎に対する治療薬の開発ニーズも高まっている。医薬品開発には莫大な時間と資源が必要だが、その成功確率は極めて低く、年々減少傾向にある。これを改善するためには有効性（薬効）と安全性（毒性）の観点から候補化合物のドロップアウトを防ぐ必要があり、薬効評価に関しては開発の初期段階から適切な動物種及び系統を選択し、適切な薬効評価モデル及び評価方法を確立して評価することが非常に重要である。

アレルギー性結膜炎の治療薬開発の薬効評価モデルはいくつか知られているが、結膜炎誘発物質を点眼して結膜炎症状を誘発させる化学メディエーター誘発モデルは、実験操作が簡便で開発初期のスクリーニングモデルとして有用と考えられる。このモデルで主に用いられるモルモットは取扱いが容易なだけでなくヒスタミン感受性が高くヒトとも類似していることから、開発初期の薬効モデル動物として適切な種と考えられている。一方で、このモデルのための結膜炎誘発物質の濃度や点眼量といった誘発条件や、結膜炎症状の観察に用いられる結膜炎スコアの基準は統一されておらず、このモデルを用いた薬効評価には精度の高さや信頼性に問題がある。そこで、本研究ではアレルギー性結膜炎治療薬の開発初期段階の薬効評価モデルとして、ヒスタミンとヒスタミン H₄ 受容体作動薬である 4-メチルヒスタミン（4MeHA）の 2 つの化学メディエーターにより結膜炎症状を誘発するモデルを用いて、確実に結膜炎症状を引き起こし薬効評価が可能な誘発条件、並びに精度が高く信頼性のある薬効評価方法の確立を試みた。

第1章では、ヒスタミンによる結膜炎誘発モデルについて検討した。既存モデルの条件でモデルの作製を試みたが、既報の条件では十分な結膜炎症状は発現せず、薬効評価のためにはヒスタミンの投与量は2000 ng/ μ L (12.5 μ L/eye)まで増加させる必要があった。さらに実際に作製した結膜炎モデルが薬効評価モデルとして適切かどうかを、市販の抗ヒスタミン薬を用いた薬効評価試験で確認した。その結果、ヒスタミンの投与量を増加させた条件で薬効に適した結膜炎症状が確認でき、さらに抗ヒスタミン薬の薬効も捉えることができた。評価方法については、医薬品の安全性試験において眼の急性毒性(刺激性)を調べる目的で標準化されている Draize の基準を結膜炎スコアに採用した。その結果、従来の方法と比較して曖昧性が排除され、より客観性の高い評価ができ、この基準は毒性試験だけでなく、薬効試験でも活用できる可能性が示された。以上のとおり、ヒスタミンモデルは2000 ng/ μ L (12.5 μ L/eye)の投与量で薬効評価可能な結膜炎症状がみられ、さらに評価方法に Draize の基準を取り入れることで、より信頼性の高い結果が得られた。

第2章では、ヒスタミン H₄ 受容体拮抗薬の評価のためのモデルとして、4MeHA による誘発モデルについて同様に検討した。4MeHA を用いたこの病態モデルはマウスで報告があるが、ヒスタミン H₄ 受容体のヒスタミン親和性には種差があり、マウスよりもモルモットの方がヒトにより近い結合親和性を示すことが知られている。そこで、マウス結膜炎モデルを参考にモルモットでの誘発条件を検討し、次いで作製した結膜炎モデルが薬効評価モデルとして適切かどうかを、ヒスタミン H₄ 受容体拮抗薬及びヒスタミン H₁ 拮抗薬を用いて確認した。その結果、4MeHA を81000 ng/ μ L (5000 nmol/12.5 μ L/eye)の濃度でモルモットに点眼することで、結膜及び虹彩の充血が確認できたが、マウス結膜炎モデルでみられるような浮腫は認められず、血管透過性の亢進や引っ掻き行動の増加は確認できなかった。マウスとモルモットでは、ヒスタミンの H₄ 受容体との結合親和性だけでなく、4MeHA に対する生体反応に違いがあるものと考えられた。一方で、4MeHA の点眼によって認められた結膜及び虹彩の充血は、ヒスタミン H₄ 受容体拮抗薬で特異的に抑制された。結膜炎スコアの評価基準は、第1章と同様に医薬品の毒性試験で標準化されている Draize 及び McDonald-Shadduck の基準を採用することで曖昧性を排除した。なお、McDonald-Shadduck の基準は Draize の基準よりも部位ごとに詳細な観察が可能な基準としてこのモデルで採用した。以上のとおり、モルモットを用いた4MeHA 誘発モデルは血管透過性の亢進や引っ掻き行動の増加がないことから、アレルギー性結膜炎の症状を網羅的に反映したモデルではないが、81000 ng/ μ L (5000 nmol/12.5 μ L/eye)で誘発される結膜及び虹彩の変化は薬効評価に用いることが可能で、医薬品の開発初期における簡易的なスクリーニングモデルとして活用できるものと考えられた。

以上、いずれの薬効評価モデルも作製条件を事前に確認することで、適切な薬効評価が可能であった。論文の情報をもとに薬効モデルを導入する場合は、小規模でも予備的な実験を行う必要があり、材料や方法はより詳細を記録し明らかにすること、国際的なガイドライン化や標準化がなされている毒性試験の評価基準を取り入れることでモデル作製や薬効評価試験の信頼性を高め、後の再現性や標準化に繋がるものと考えられた。

論文審査の結果の要旨

アレルギー性結膜炎は、眼科領域における最も一般的な免疫性疾患である。その患者数は世界で増加傾向にあり、治療薬の開発ニーズも高い。アレルギー性結膜炎の治療薬開発の薬

効評価モデルはいくつか知られているが、化学メディエーターを用いた結膜炎モデルでは、化学メディエーターの濃度や点眼量といった誘発条件や、結膜炎症状の観察に用いられる結膜炎スコアの基準は統一されておらず、このモデルを用いた薬効評価には精度や信頼性の問題が指摘されている。そこで、本研究ではアレルギー性結膜炎治療薬の薬効評価モデルとして、ヒスタミンとヒスタミン H₄ 受容体作動薬である 4-メチルヒスタミン (4MeHA) の 2 つの化学メディエーターを用いて、確実に結膜炎症状を引き起こし薬効評価が可能な誘発条件、並びに信頼性の高い薬効評価方法の確立を試みた。

第 1 章では、ヒスタミンによる結膜炎誘発モデルについて検討した。既存モデルを既報の条件で作製してみたが、十分な結膜炎症状は発現せず、薬効評価のためにはヒスタミンの投与量を 2000 ng/μL (12.5 μL/eye) まで増加させる必要があった。作製した結膜炎モデルが薬効評価モデルとして適切かどうかを、市販の抗ヒスタミン薬を用いて確認した。なお、薬効評価方法については、医薬品の安全性試験において眼の急性毒性 (刺激性) 評価で標準化されている Draize の基準を用いた。その結果、ヒスタミンの投与量を増加させた条件で薬効に適した結膜炎症状が確認でき、さらに抗ヒスタミン薬の薬効も捉えることができた。また、Draize の基準を用いたことにより、従来の薬効評価方法と比較して曖昧性が排除され、より客観性の高い評価が可能であった。

第 2 章では、4MeHA による誘発モデルについて検討した。ヒスタミン H₄ 受容体のヒスタミン親和性には種差があり、マウスよりもモルモットの方がヒトにより近い結合親和性を示すことが知られている。そこで、マウス結膜炎モデルを参考にモルモットでの誘発条件を検討し、薬効評価モデルとしての有用性を確認した。なお、結膜炎スコアの評価基準は、Draize 及び McDonald-Shadduck の基準を用いた。その結果、4MeHA を 81000 ng/μL (5000 nmol/12.5 μL/eye) の濃度で点眼することで、結膜及び虹彩の充血が確認できた。4MeHA の点眼によって認められた変化は、ヒスタミン H₄ 受容体拮抗薬で特異的に抑制されたことより、本モデルはアレルギー性結膜炎の症状を網羅的に反映したモデルではないものの、開発初期における薬効評価スクリーニングモデルとして有用であると考えられた。以上、国際的にガイドライン化されている基準を薬効評価に取り入れることで、モデル作製や薬効評価試験の信頼性を高めるとともに、薬効評価方法の標準化に繋がるものと考えられた。

学位論文の基礎となる学術論文

1. 著者名 Hidemi Mochizuki, Susumu Suyama, Joo Young Cha, Pil-Su Ho, Akihito Shimoi
発行年 2022
題目 Optimization of a histamine-induced allergic conjunctivitis model in Guinea pigs
学術雑誌名 Journal of Pharmacological and Toxicological Methods
(巻・号・頁) 113・ ・ 107133.
2. 著者名 Hidemi Mochizuki, Susumu Suyama, So Young Youm, Pil-Su Ho, Akihito Shimoi

発行年 2022
題目 Characteristics of histamine H4 receptor agonist-induced allergic conjunctivitis model in Guinea pigs
学術雑誌名 Journal of Pharmacological and Toxicological Methods
(巻・号・頁) ・ ・ 107203. (*in press*)

既発表学術論文

1. 著者名 Hidemi Mochizuki, Naoya Murota, Shin-ichi Sato, Kazuo Nii, Yoko Kouhei, Masahiro Taniguchi, Ryo Inoue, Chiyoko Nishime, Hideki Tsutsumi
発行年 2018
題目 Approaches of validation of a 2-week combined repeated oral dose toxicity study with plasma micro sampling toxicokinetics (PMS-TK) in common marmosets
学術雑誌名 Journal of Toxicological Sciences
(巻・号・頁) 43・11・685-695.
2. 著者名 Hirokazu Morokawa, Shigeki Yagyu, Aiko Hasegawa, Miyuki Tanaka, Shoji Saito, Hidemi Mochizuki, Kengo Sakamoto, Akihito Shimoi, Yoza Nakazawa
発行年 2020
題目 Autologous non-human primate model for safety assessment of piggyBac transposon-mediated chimeric antigen receptor T cells on granulocyte-macrophage colony-stimulating factor receptor
学術雑誌名 Clinical & Translational Immunology
(巻・号・頁) 9・11・e1207.
3. 著者名 Takeshi Watanabe, Satoshi Yasuda, Shinji Kusakawa, Takuya Kuroda, Mayumi Futamura, Mitsuhide Ogawa, Hidemi Mochizuki, Eri Kikkawa, Hatsue Furukawa, Masato Nagaoka, Yoji Sato
発行年 2021
題目 Multisite studies for validation and improvement of a highly efficient culture assay for detection of undifferentiated human pluripotent stem cells intermingled in cell therapy products
学術雑誌名 Cytotherapy

(卷・号・頁) 23・2・176-183.

4. 著者名 Shigeki Yagyū, Hidemi Mochizuki, Kumiko Yamashima,
Hiroshi Kubo, Shoji Saito, Miyuki Tanaka, Kengo Sakamoto,
Akihito Shimoi, Yozo Nakazawa
- 発行年 2021
- 題目 A lymphodepleted non-human primate model for the
assessment of acute on-target and off-tumor toxicity of human
chimeric antigen receptor-T cells
- 学術雑誌名 Clinical & Translational Immunology
- (卷・号・頁) 10・6・e1291.