

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

2023年3月

望月 秀美

## 【目次】

序論	2
第1章 モルモットにおけるヒスタミン誘発アレルギー性 結膜炎モデルの検証	6
1. 緒言	7
2. 実験材料及び方法	9
2-1 使用動物，選定理由及び飼育方法	9
2-2 結膜炎誘発条件の検証	9
2-3 作製した結膜炎モデルの検証	10
3. 実験結果	13
4. 考察	14
5. 小括	18
第2章 モルモットを用いたヒスタミン H4 受容体作動薬 誘発アレルギー性結膜炎モデルの検証	19
1. 緒言	20
2. 実験材料及び方法	21
2-1 使用動物，選定理由及び飼育方法	21
2-2 結膜炎誘発条件の検証	22
2-3 作製した結膜炎モデルの検証	23
3. 結果	26
4. 考察	27
5. 小括	31
総括	32
謝辞	35
文献	36
図表	42

## 序 論

アレルギー性結膜炎は、I型アレルギー反応を主体とした結膜の炎症性疾患の1つであり、抗原により誘発される自覚症状・他覚所見を伴うもののうち、結膜に増殖性の変化がみられないものと定義されている(公益財団法人日本眼科学会, 2010)。アレルギー性結膜疾患の日本国内の有病率は、1993年の推定では人口の15~20%であったものが、2017年には48.7%となり、近年増加傾向にある(公益財団法人日本眼科学会, 2021)。これは日本の全人口の約2人に1人が罹患していることを表すが、結膜炎症状は視力に直接影響することは稀で過小評価される傾向にあることから、実際にはそれ以上の有病率と思われる。アレルギー性結膜炎による痒み、発赤、腫れといった症状は時に不快感を伴い、個人の生活の質(Quality of life: QOL)を著しく損なう場合がある。特に、長期間持続するような強い痒みはその不快感から集中力の低下や疲労感、睡眠障害等を引き起こすことから、社会的な問題にもなっている。その患者数は日本だけでなく世界でも増加傾向にあり、アレルギー性結膜炎に対する、より有益な治療薬の開発ニーズは高い(Dupuis et al., 2020; Jalbert & Golebiowski, 2015)。

一方、医薬品開発は10年以上の時間と数百億~数千億円規模の費用がかかるにも関わらず、その成功確率は極めて低い。候補化合物が新薬となって販売される確率は日本では約3万分の1といわれ、さらにその確率は年々低下している(厚生労働省, 2018年, 日本製薬工業会, 2020年)。その原因として有効性(薬効)と安全性(毒性)の2つの問題が挙げられる。特に有効性に関しては、非臨床試験で薬効を示すデータが得られたとしても、臨床試験でその結果が再現できない事例が散見されている(国立研究開発法人新エネルギー・産業技術総合開発機構, 2010)。莫大な開発費と時間の損失を避けるために、非臨床から臨床への移行がより慎重になっていると考えられる。近年、非臨床

試験の精度を改善する必要性について提言されているとおり (Howells et al., 2014; Richter, 2017), 薬効の観点からは, 非臨床試験の薬効評価モデルの最適な条件や評価基準を見直して, 薬効評価の精度を高める必要があると考えられる。

開発初期の非臨床試験では, 候補化合物の数が多いことから, 自動化や高度にシステム化された方法で短期間に多数の化合物を評価するハイスループットスクリーニング (HTS) が行われていることがある (Entzeroth et al., 2009; Shinn et al., 2019)。HTS は膨大な候補化合物について, 標的分子に対する活性や選択性を指標に各種の *in vitro* のアッセイが組み込まれるのが一般的だが, 近年では薬物動態, 安全性, 物性評価についてもハイスループット化が進み, より高度化と効率化が進んでいる (須藤ら, 2008)。しかし, 機械やシステムによって自動化された方法は, 客観的で画一的な評価が可能である一方, 生体反応の全てを完全に再現できるシステムはなく, HTS のみで精度よく薬効を評価することは不可能である。そのため, 医薬品開発の成功確率を向上させるためには, 開発の初期段階から動物を用いた適切な病態モデル及び薬効評価方法の構築が重要である。また, 使用する動物は取り扱いやすく実験操作が容易かつヒトへの外挿が可能である必要がある。

アレルギー性結膜炎の治療薬において, 薬効評価のための病態モデルを作製する方法はいくつか知られている。第一に抗原に対する抗血清で結膜中の肥満細胞を受動的に感作する方法である (Mehta et al., 1990; Stock et al., 1985)。この方法では肥満細胞に結合した IgE に抗原が反応して肥満細胞が脱顆粒を引き起こす。肥満細胞の脱顆粒はヒスタミンやプロスタグランジンといった化学メディエーターの遊離を引き起こし, これらの化学メディエーターが充血や浮腫, 痒みといった結膜炎症状を引き起こす。IgE は直接肥満細胞に結合することになるため, この方法では T 細胞や B 細胞を介した反応は含まれない。第二

に、抗原をアジュバントとともに処置して能動的に感作する方法である (Kato et al., 2004; Shii et al., 2009)。この方法では、B 細胞より IgE が産生され、その IgE が肥満細胞に結合する。抗原に再び曝露されると肥満細胞は脱顆粒を引き起こし、種々の化学メディエーターがアレルギー症状を引き起こす。抗原による誘発が複数回可能であることから、抗原の曝露状況をより臨床に近い形で再現することも可能である。これらの方法はアレルギーのメカニズム解析や評価には向いているかもしれないが、動物各個体における免疫細胞の機能や状態に依存する方法である。生体反応の個体差からデータがばらつくこともしばしばあり、結果の解釈が困難となることもあり得る。本評価方法は実験手技の煩雑さや評価までに時間がかかることから、大量の化合物の評価には不向きといえる。一方で、第三の方法として、アレルギー症状を引き起こす化学メディエーターを直接結膜に投与する方法が挙げられる (Fukushima & Tomita, 2009; Kamei et al., 1991)。この方法は、前述の受動感作や能動感作と異なり、一定量の化学メディエーターを症状発現部位である眼結膜に直接作用させるため個体の免疫反応に大きく左右されることはなく、個体によるデータのばらつきは出にくいと考えられる。また、結膜炎症状を発現させるための操作は、結膜に各種化学メディエーターを点眼するだけであり、前述の 2 つの方法よりも操作が簡便であることから、一定の技術をもった技術者であれば、手技による結果のばらつきは小さくなると考えられる。さらに、異なる施設間でも手技による影響の少ない、精度の高い結果が得られることが期待される。

そこで、本研究ではモルモットを用いて 2 種類の化学メディエーターによって結膜炎を誘発する病態モデルについて、確実に結膜炎症状を引き起こし薬効評価が可能なモデルの作製条件を検証した。さらに、この病態モデルを用いて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 章ではアレルギー症状の発現に大きく関与するヒスタミンを化学メディエーターとする結膜炎誘発モデルについて、第 2 章では、近年アレルギー性結膜炎の治療薬として注目されているヒスタミン H<sub>4</sub> 受容体拮抗薬の薬効評価モデルとするため、ヒスタミン H<sub>4</sub> 受容体作動薬を化学メディエーターとする結膜炎誘発モデルについて評価を行った。

## 第 1 章

モルモットにおけるヒスタミン誘発アレルギー性結膜炎  
モデルの検証

## 1. 緒言

ヒスタミンは生体内では肥満細胞から放出され、ヒスタミン受容体を介して、血管拡張や血管透過性の亢進、痒みといったアレルギー症状を引き起こすことが知られている (Elieh Ali Komi et al., 2018; Ohbayashi et al., 2010)。さらに、ヒスタミンは直接結膜に点眼することで、疑似的にアレルギー症状を発現させることが可能であり、アレルギー性結膜炎に対する薬効評価や、薬効評価手法の開発のための病態モデル作製に用いられている (Fukushima & Tomita, 2009; Kamei et al., 1991)。このモデルに用いる動物種としてモルモットが汎用されている。その理由として、ラットでは一般的に炎症にヒスタミンよりもセロトニンが強く関与し、炎症症状に対する抗ヒスタミン剤の効果が弱いことが知られている (Maling et al., 1974)。一方、モルモットでは眼結膜を含む全身血管組織はヒスタミンに感受性が高く、眼結膜における炎症反応にもヒスタミンが大きく関与しており、ラットと比較してヒトに類似していると考えられている (PMDA, 2006)。

モルモットを用いたヒスタミン誘発結膜炎モデルについて、これまで最も詳細に検証されているのは Kamei ら (Kamei et al., 1991) の報告である。この報告では、1.5, 7.5, 75 及び 750 ng/ $\mu$ L のヒスタミンをモルモットに 25  $\mu$ L/eye で結膜に点眼した結果、充血及び浮腫といった結膜炎症状が用量依存的に誘発されることが示され、75 ng/ $\mu$ L 及び 750 ng/ $\mu$ L の用量でのピーク時の変化はほぼ同程度であった。また亀井による別の報告 (亀井, 2006) では、100 ng/ $\mu$ L (25  $\mu$ L/eye) で明らかな充血及び浮腫が観察されることも示されているが、いずれの報告にも薬効試験に適した用量に関する記述まではない。また、Fukushima & Tomita ら (Fukushima & Tomita, 2009) は 1000 ng/ $\mu$ L (20  $\mu$ L/eye) のヒスタミンを眼表面に点眼して結膜炎症状を誘発させている。このモデルを作製するためのヒスタミンの濃度や点眼量、点眼方法といった誘

発条件は統一されておらず，薬効評価に適したモデルの作製条件は不明である。さらに，結膜炎症状の観察には結膜炎スコアによるグレード評価が一般的であるが，その評価基準は既報の研究論文によってまちまちで曖昧な部分が多い。例えば，結膜炎の初期の充血と，次いで発生する浮腫を一連の変化ととらえて区別せずに一つの評価基準で評価している報告 (Kamei et al., 1991)，充血や浮腫などの症状をそれぞれ別の評価基準でスコア化して評価している報告 (Shii et al., 2010)，各症状のスコアを合計して評価している報告 (Nakano et al., 2009)，さらには整数値のスコアの中間の症状を 0.5 で定義するが詳細な評価基準までは記載されていない報告 (Fukushima et al., 2003) もみられる。スコア値も 4 段階であったり，5 段階であったりと統一はされていない。さらに，多くのスコアの定義は *slight* や *severe* といったシンプルな言葉で表現され，同じ結膜炎スコアという表現であっても，それらの値が指し示す症状は研究論文によって様々であり，統一されていない。このような評価方法は，同じ事象が起きていたとしても，観察者や選択した評価基準によって異なる結果として報告される可能性があり，曖昧な基準は恣意的なデータ操作の余地も残すことになることから，データの再現性という観点からも望ましくはない状態といえる。

以上のように，ヒスタミン誘発結膜炎モデルは簡便な方法として薬効評価のための実験に用いられている反面，薬効評価に適したモデルの作製方法や薬効評価方法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と考えられる。そこで本章では，アレルギー性結膜炎治療薬の開発初期の薬効スクリーニングに有用と考えられるモルモットを用いたヒスタミン誘発結膜炎モデルについて，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の検証，並びにこの病態モデルを用いて精度が高く信頼性のある薬効評価方法の確立を試みた。

## 2. 実験材料及び方法

本試験は「動物の愛護及び管理に関する法律」及び「株式会社イナリサーチ動物実験指針」を遵守し，試験施設の動物実験審査委員会（IACUC）による審査を受けた試験計画書に従って適正に実施された。なお，本実験は AAALAC International（The Association for Assessment and Accreditation of Laboratory Animal Care International）により認証を受けた実験施設で実施した。

### 2.1 使用動物，選定理由及び飼育方法

雄の Slc:Hartley モルモット（日本エスエルシー株式会社，5～10 週齢）を使用した。使用動物は，アレルギー性結膜炎のモデル動物として汎用されている種，系統及び性を選択した。各動物はステンレス製ワイヤーケージ（61W × 22D × 21H cm，エンリッチメント用の齧り木付き）に最大 3 匹/ケージで収容した。飼育室の温度は 21.0～25.0°C，湿度は 40.0～70.0%の範囲となるよう制御した。照明時間は 12 時間/日（7時から 19 時までの人工照明）とした。餌は固型 LRC4（オリエンタル酵母工業株式会社）を自由に摂取させた。飲料水は，自動給水装置により上水道水を自由に摂取させた。

### 2.2 結膜炎誘発条件の検証

Histamine dihydrochloride（富士フィルム和光純薬株式会社）を phosphate-buffered saline（以下，PBS，pH = 7.4）に溶解させて使用した。初回のヒスタミンの濃度及び点眼量は，Kamei ら及び亀井（Kamei et al., 1991; 亀井, 2006）の報告から明らかな結膜炎症状が認められる条件として 100 ng/μL（25 μL/eye）を設定した。さらに，1000 ng/μL（25 μL/eye），2000 ng/μL（12.5 μL/eye）及び 2000 ng/μL（25 μL/eye）の 3 条件でモデルの作製を試みた。100 ng/μL（25 μL/eye）の条件では 2 例に，その他の条件では各 1 例の動物を用

いて、各動物の両眼結膜嚢にそれぞれの条件のヒスタミン溶液を1回/eye点眼して結膜炎症状を誘発した。結膜炎スコアを用いて作製した結膜炎モデルの状態を評価して、確実に結膜炎症状が誘発され薬効評価が可能なヒスタミンの濃度と点眼量を決定した。結膜炎誘発条件の検証では明らかな結膜炎症状を捉えることを目的とし、結膜炎スコアは既報の症状と比較することも考慮して過去のいくつかの報告 (Fukushima et al., 2003; Kamei et al., 1991; Kyei et al., 2015) を改変して、0~5の6段階に分類した(表1)。このスコアを用いて左右の結膜の状態を総合的に観察してモデルの状態を評価した。

### 2.3 作製した結膜炎モデルの検証

検証の結果、薬効評価に使用するヒスタミンの濃度と点眼量として2000 ng/ $\mu$ L (12.5  $\mu$ L/eye)を設定した。作製した結膜炎モデルが医薬品開発における薬効評価に用いるのに適切かどうかを判断するため、市販薬を用いた薬効評価試験を実施した。薬効評価用の被験薬としてlevocabastine hydrochloride (リボスチン<sup>®</sup>点眼液 0.025%, 以下, レボカバスチン, ヤンセンファーマ), 対照物質としてPBSを用いた。レボカバスチンはH<sub>1</sub>ブロッカー点眼薬であり, アレルギー性結膜炎に効能を有する薬剤である (Noble & McTavish, 1995)。モルモットで申請用の非臨床薬効試験が行われた市販薬であることから, 作製したモデルの妥当性の確認に適した被験薬として原液をそのまま使用した。評価項目は, 結膜炎スコア, 眼部引っ掻き行動の観察, 結膜中の色素漏出量測定 (Kamei et al., 1991; Kato et al., 2004; Shii et al., 2009) として, それぞれの項目がレボカバスチンによって抑制されるかを確認した。結膜炎スコア及び眼部引っ掻き行動の観察は同一動物を用いてヒスタミン点眼後90分まで観察を行った。色素漏出量測定はヒスタミン点眼後30分に結膜組織を摘出するため, 結膜炎スコア及び眼部引っ掻き行動の観察とは別の動物を用いて評価した。結膜炎スコア及び眼部引っ掻き

行動の観察用の動物は、ヒスタミン点眼の約 60 分前に観察用ケージ（ポリカーボネート製ケージ，28W × 44D × 18H cm）に個別に収容し，眼部引っ掻き行動の観察の環境に順化させた。

### 2.3.1 投与方法

動物を保定して下眼瞼を緩やかに眼球から引き離し，レボカバスチンまたは PBS（25  $\mu$ L/eye）を左右の結膜嚢内にオートピペットを使用して点眼した。そのまま約 15 秒間保持した後，上下眼瞼を軽く閉じてゆっくりと指を離した。その 15 分後にヒスタミン（12.5  $\mu$ L/eye）を同様に点眼した。

### 2.3.2 結膜炎スコア評価

モデルの検証実験では，薬効評価のための結膜炎スコア評価は，より客観的な方法として Draize の基準（Draize, 1959）から虹彩と結膜の部分を抜粋して用いた（表 2）。

ヒスタミンの点眼前（薬効評価用薬剤の投与直後），点眼後 30 分，60 分及び 90 分に眼（結膜，虹彩）の所見を表 2 の評価基準に従って，肉眼的に観察した。詳細な変化はスリットランプを用いて観察した。虹彩及び結膜のすべてのスコアの合計を算出して左右それぞれの結膜炎スコアとした。

眼部引っ掻き行動の観察と同一動物を用いて，1 群あたり 5 例で評価した。

### 2.3.3 眼部引っ掻き行動の観察

観察用ケージ内で，ヒスタミン点眼後 30 分間のモルモットの行動をビデオで記録した。ビデオを再生し，後肢の眼部に対する引っ掻き回数をカウントした。なお引っ掻き回数は，引っ掻きのために後肢を上げ，引っ掻き行動を行って再び後肢を下すまでの連続した動作を 1 回として評価した。

結膜炎スコア評価と同一動物を用いて、1群あたり5例で評価した。

#### 2.3.4 結膜中の色素漏出量測定

エバンスブルーを生理食塩液に溶解し、1 w/v%溶液を調製した。薬効評価用薬剤の点眼5分後にエバンスブルー溶液を体重100 gあたり0.25 mL 静脈内へ投与した。エバンスブルー溶液投与の10分後、ヒスタミンを点眼して結膜炎症状を誘発した。結膜炎誘発の30分後に動物を日本薬局方イソフルラン（マイラン製薬株式会社。以下、イソフルランと略）吸入麻酔下で、後大静脈及び腹大動脈を切断して放血致死させ、両眼結膜組織を摘出した。摘出した結膜組織の湿重量を測定し、細断後、0.5 mLの1N KOH溶液中に37°Cにて一晚（12～24時間）浸した。4.5 mLのH<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>-acetone溶液（0.6N H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> : acetone = 5 : 13）を加えてよく混和した。抽出液を遠心（約1800 × g, 室温, 20分）後、上清を採取して620 nmにおける吸光度を測定した。あらかじめ作成した検量線から結膜組織1gあたりの色素量を算出した。

眼部引っ掻き行動の観察及び結膜炎スコア評価と別の動物を用いて、1群あたり5例で評価した。

#### 2.3.5 統計解析

結膜炎スコアは、虹彩及び結膜のすべてのスコアの合計を算出して左右それぞれのスコアとした。さらに各測定ポイントにおいて、左右の眼のすべてのスコアを用いて各群の平均値及び標準誤差を算出し、対照群及び薬剤群についてWilcoxonの順位和検定を用いて比較した。引っ掻き行動の回数及び色素漏出量は、各群の平均値及び標準誤差を算出し、対照群及び薬剤群との間でF検定による等分散性の検定（有意水準5%）を行い、分散が等しい場合はStudentのt検定を、分散が等しくない場合はAspin-Welchのt検定を行った。検定はいずれも両側で、有意水準5%で対照群との差が認められた場合に有意な変動とした。

### 3. 実験結果

#### 3.1 結膜炎誘発条件の検証

ヒスタミンを 100 ng/ $\mu$ L (25  $\mu$ L/eye) で点眼した結果、点眼後 30 分から 60 分にかけて眼球結膜にわずかな浮腫または充血が認められた (スコア 1)。眼瞼に変化は認められず、既報と比較してスコアは明らかに低く、薬効評価に用いるには不十分であった。

ヒスタミンの投与量を増すため、濃度及び点眼量について、1000 ng/ $\mu$ L (25  $\mu$ L/eye) , 2000 ng/ $\mu$ L (12.5  $\mu$ L/eye) 及び 2000 ng/ $\mu$ L (25  $\mu$ L/eye) の 3 つの条件を設定して検討した結果、ヒスタミン濃度が既報の 10 倍量の 1000 ng/ $\mu$ L (25  $\mu$ L/eye) では 100 ng/ $\mu$ L (25  $\mu$ L/eye) でみられた以上の変化はみられず、20 倍量の 2000 ng/ $\mu$ L において肉眼でも明らかな充血及び浮腫が確認された。なお、2000 ng/ $\mu$ L (25  $\mu$ L/eye) では、点眼後 30 分に、眼球結膜から上下眼瞼にかけて非常に強い浮腫及び充血が確認され、スコアは基準の最大値である 5 であった。点眼量が半量の 2000 ng/ $\mu$ L (12.5  $\mu$ L/eye) では、2000 ng/ $\mu$ L (25  $\mu$ L/eye) と比較して充血及び浮腫の程度はやや軽減され、点眼後 30 分のスコアは 3 であった (表 3 及び図 1)。

#### 3.2 作製した結膜炎モデルの検証

##### 3.2.1 結膜炎スコア評価

ヒスタミンの点眼後、対照群の全例で結膜の充血、浮腫及び分泌物が認められ、結膜炎誘発条件の検証で認められた症状と同程度の結膜炎発症を確認した。ヒスタミンの点眼前 (薬効評価用薬剤の投与後)、点眼後 30 分、60 分及び 90 分における各群の結膜炎スコア (Draize の基準) の平均値は、対照群で 0.0, 4.0, 2.8 及び 1.8, レボカバスチン群で 0.0, 0.6, 0.6 及び 0.0 であった。レボカバスチン群では、ヒスタミン点眼後のいずれの観察時間においても対照群と比較し

て有意な低値を示し，ヒスタミンによる結膜炎症状に対して抑制効果を示した（図 2 及び 3）。

### 3.2.2 眼部引っ掻き行動の観察

眼部引っ掻き行動回数の平均値 ± 標準誤差は，対照群で 16.6 ± 3.5 回，レボカバスチン群で 1.0 ± 0.6 回であった。対照群と比較してレボカバスチン群で統計学的に有意な低値が認められ，レボカバスチンによる眼部引っ掻き行動に対する抑制効果が確認された（図 4）。

### 3.2.3 結膜中の色素漏出量測定

結膜中色素の平均値 ± 標準誤差は，対照群で 68.1 ± 10.0 µg/g，レボカバスチン群で 18.3 ± 1.4 µg/g であった。対照群と比較してレボカバスチン群で統計学的に有意な低値が認められ，レボカバスチンによる血管透過性亢進に対する抑制効果が確認された（図 5）。

## 4. 考察

過去に報告のあるモルモットを用いたヒスタミン誘発モデルとして Kamei ら (Kamei et al., 1991) の誘発条件をもとにモデルの作製を試みた。その結果，既報で明らかな結膜炎症状の発現が認められた条件であるヒスタミン 100 ng/µL (25 µL/eye) では，眼球結膜にわずかな浮腫または充血が認められるのみで，眼瞼の変化は認められなかった。今回認められた症状は明らかに弱く，既報の誘発条件では薬効評価に用いる結膜炎モデルを再現することはできなかった。本研究のヒスタミンの投与方法は，ヒスタミンを結膜嚢内に点眼し 15 秒間保持する方法を採用したため，ヒスタミンは結膜に十分に接していたと考えられた。そのため投与方法には問題ないと判断し，ヒスタミンの投与量を増すことで，薬効評価に適した安定的な結膜炎症状を誘発できるか検

討を行った。その結果，ヒスタミン濃度が既報の 10 倍量の 1000 ng/ $\mu$ L (25  $\mu$ L/eye) では 100 ng/ $\mu$ L (25  $\mu$ L/eye) でみられた以上の変化は認められず，20 倍量の 2000 ng/ $\mu$ L において肉眼でも明らかな充血及び浮腫が確認された。2000 ng/ $\mu$ L (25  $\mu$ L/eye) では，強い浮腫及び充血が確認され，同じヒスタミン濃度でも点眼量が半量の 2000 ng/ $\mu$ L (12.5  $\mu$ L/eye) では，充血及び浮腫の程度はやや軽減された。薬効評価に用いる場合，モデルの病態が強すぎると本来評価したい変化を捉えることが難しくなることが想定される。そのため，**moderate** な症状を示すヒスタミン濃度 2000 ng/ $\mu$ L，点眼量 12.5  $\mu$ L/eye の条件が，適切なモデルであると判断した。

既報の再現が得られなかったことについては，材料の違いや実験環境の違いなどが考えられた。同じ材料でもロットの異なる試薬，飼育環境の異なる動物，仕入れ先が異なる場合があり，このようなわずかな違いが重なることで実験が再現できないことは生命科学領域の研究においてはしばしばみられる (Collins & Tabak, 2014)。本研究で参考にした Kamei ら (Kamei et al., 1991) のヒスタミン誘発モデルの場合，Kamei らと完全に同一の環境，材料，方法であれば同一の結果を導くことはできたかもしれない。しかし，研究論文においてこれらの情報が事細かに記載されることは稀であり，異なる施設で再現を試みる場合に，そのすべての条件を完全に一致させることは不可能である。医薬品開発で用いられる動物モデルで期待される重要な要件としては，実施が簡単であること (**quite easy to perform**)，広く利用可能であること (**widely accessible**)，そして再現性があること (**reproducible**) が挙げられる (Moeller et al., 2008)。ここでいう「再現性がある (**reproducible**)」とは，オリジナルと完全に同一でなくても，ほぼ同じ材料を用いて同様の手順に従い実施すれば，異なる施設であっても，同一の結果が導き出せることを示している。このような方法であ

れば、たとえ材料や方法にわずかな変更があったとしても、同一の結果が得られることが期待できる。より客観的な根拠に基づき開発される医薬品開発に用いられる病態モデルとしては、再現性があることは必須である。特に論文の情報をもとに新たにモデルを導入する場合には、施設ごとに小規模でも予備的な実験をして、再現性のある方法であるかの確認を行う必要があると考えられた。また今回のように再現性が得られなかったためにモデルの作製方法を改変する場合には、材料や方法に関してより詳細に記録し公表することが、後の再現性の向上のためには重要と考えられる。そのような詳細な記録があることで施設ごと再現性を妨げる要因の検証が可能となり、ばらつきの少ない最適な病態モデルの作製条件が設定でき、作製したモデルや実験の信頼性を高めることができると考えられた。

次に、ヒスタミン濃度 2000 ng/ $\mu$ L, 点含量 12.5  $\mu$ L/eye の条件で作製したモデルについて、実際に薬効評価が可能な病態モデルであるか、評価方法の信頼性はどうかの検証を行った。検証には、既存のアレルギー性結膜炎に効能を有する H<sub>1</sub> 受容体拮抗薬であるレボカバスチンを使用した。薬効評価の指標は結膜炎スコア評価、眼部引っ掻き行動の観察、結膜中の色素漏出量測定とした。ヒスタミン点眼後、結膜の充血、浮腫及び分泌物が認められ、結膜炎誘発条件の検証で認められた結膜炎症状と同程度の症状が再現され、眼部引っ掻き行動が誘発された。さらに、血管透過性の亢進がみられ、結膜中の色素漏出量測定による評価が可能であった。このモデルは個体の免疫応答を必要としないため、データは比較的安定し、いずれの症状もヒスタミン H<sub>1</sub> 受容体拮抗薬であるレボカバスチンによって抑制され、薬効評価が可能であった。

薬効評価方法に関しては、定量的なパラメータで表現できる眼部引っ掻き行動の観察及び結膜中の色素漏出量測定は、評価者の主観に

依存しない数値的な評価が可能であり、手順を統一することで信頼性は高められると考えられた。一方、結膜炎スコア評価は、従来のグレード評価（従来法）では、論文によって表現や基準がばらばらで曖昧な部分が多かった (Fukushima et al., 2003; Kamei et al., 1991; Nakano et al., 2009; Shii et al., 2010)。さらに、従来法は部位ごとに項目が設けられている評価基準はなく、その多くは観察者の主観によって症状の有無やその程度を5段階程度で分類するものが多かった。モデルの状態を簡易的に評価するのみであれば、単純化された定義のグレード評価は有用と考えられるが、薬効評価の信頼性という観点で考えた場合、判断基準はより明確に、また観察者の感覚に依存しない基準を設ける必要がある。そこで、これらの条件を満たす基準として Draize の基準が適していると考えた。Draize の基準は、医薬品開発において眼の急性毒性（刺激性）を調べる実験で使用され (Kowalski et al., 2016; Lather et al., 2020)、経済協力開発機構（OECD）の化学物質の試験に関するガイドライン（TG405）にも採用されたことから、国際的にも広く利用されている。この基準は部位ごとに詳細な基準が設けられており、従来法と比較して主観で判断する割合が減り、客観性が増している。さらに、この基準を用いて安全性が評価された医薬品が多数上市されていることから、医薬品開発に関わる多くの実験施設では既にこの基準が導入されている。既に手順も標準化されていることから、この基準を薬効評価へ応用することは容易と考えられる。しかし、Draize の基準はあくまで化学物質の刺激性を評価するための基準であり、一部で薬効評価になじまない項目が含まれているのも事実である。例えば、虹彩の変化は0～2の三段階で、最高評点では出血や著しい組織破壊を認めるとあるが、これは結膜炎として moderate な症状を示す条件を選択している今回のモデルでは該当しない。薬効による変化を捉えるにはもう少し弱い反応を詳細に観察する必要もあると考えられるが、そのような場合には別の基準を考慮する必要があるかもしれな

い。Draize に替わる基準として、同様に医薬品の安全性試験で一般的に使用され、標準化されている McDonald-Shaddock の基準が挙げられる (McDonald & Shaddock, 1977)。この基準では Draize の基準よりもさらに部位ごとに詳細な観察が可能で、評点も細分化されていることから、薬効評価の変化を捉えるにはより適していると考えられた。

## 5. 小括

ヒスタミン誘発モルモットモデルについて、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の検証、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。結果として、既報の条件では薬効評価に十分な結膜炎症状は発現せず、ヒスタミンの投与量は 2000 ng/ $\mu$ L (12.5  $\mu$ L/eye) まで増加させる必要があった。ヒスタミンの投与量を増加させた条件では、安定的に結膜炎症状が発現し、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、結膜炎スコアとして Draize の基準を採用した結果、曖昧性が排除され、より客観性の高い評価方法とすることができた。以上のとおり、ヒスタミンモデルは 2000 ng/ $\mu$ L (12.5  $\mu$ L/eye) の投与量で結膜嚢に点眼すること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

モルモットを用いたヒスタミン H<sub>4</sub> 受容体作動薬誘発  
アレルギー性結膜炎モデルの検証

## 1. 緒言

これまで同定されたヒスタミン受容体には、H<sub>1</sub>受容体、H<sub>2</sub>受容体、H<sub>3</sub>受容体、H<sub>4</sub>受容体の4種類が知られており (Wade et al., 2012), アレルギー性結膜炎は主にH<sub>1</sub>受容体の関与が知られている。肥満細胞から放出されたヒスタミンは、H<sub>1</sub>受容体を介して、血管拡張と血管透過性を増加させ、免疫細胞による炎症性サイトカインの産生や、神経線維の刺激によって、アレルギー性結膜炎患者の痒み、結膜浮腫や充血などの症状を引き起こす (Inada et al., 2017; Leonardi, 2000; Wade et al., 2012; Weimer et al., 1998)。そのため、アレルギー性結膜炎では、ヒスタミンH<sub>1</sub>受容体拮抗薬が治療の第一選択として使用されている。

一方、H<sub>4</sub>受容体はT細胞、樹状細胞、単球、肥満細胞、好中球などの免疫系細胞の細胞膜で発現し (Zampeli & Tiligada, 2009), ヒスタミンをケモアトラクタント (走化性因子) とするケモタキシス (化学物質の濃度勾配に対して方向性を持った行動を起こす現象, 化学走性) を媒介することが知られている。また、肥満細胞のケモタキシスがH<sub>4</sub>受容体を介すること (de Esch et al., 2005; Hofstra et al., 2003), H<sub>4</sub>受容体が炎症細胞の機能やサイトカイン産生を調整することが報告されている (Gutzmer et al., 2005; Nakayama et al., 2004)。このように、H<sub>4</sub>受容体の拮抗薬もまたアレルギー性結膜炎の治療薬候補としての期待が大きい。

初期の薬効試験ではマウスやラットが用いられるのが一般的であり、ヒスタミンH<sub>4</sub>受容体を標的としたアレルギー性結膜炎治療薬のための薬効評価モデルも、マウスで報告がなされている (Nakano et al., 2009)。Nakanoらの報告では、選択的なヒスタミンH<sub>4</sub>受容体作動薬である4-メチルヒスタミン (以下, 4MeHA) をマウスに点眼することで、結膜炎症状を誘発している。この報告では4MeHAは10, 100及び1000 nmol/eyeで点眼され、10 nmol/eye以上の投与量で充血及び浮腫を

評価した結膜炎スコアに，1000 nmol/eye の投与量で眼部引っ掻き行動に正常動物と比較して有意な差が認められている。一方で，H<sub>4</sub>受容体のヒスタミン親和性の種差に関して調べた研究では，ヒトとモルモットのH<sub>4</sub>受容体は，ヒスタミンに対して高い結合親和性を示すのに対し，マウスやラットのH<sub>4</sub>受容体ではヒスタミンに対する親和性が大幅に低いことが報告されている (Liu et al., 2001)。薬効評価に用いる動物種は，標的の特性だけでなく，ヒトへの外挿性も可能な限り考慮して選択する必要がある。ヒスタミン H<sub>4</sub>受容体を標的に考えた場合，薬効評価に用いる動物種は，ヒスタミンに対する結合親和性がヒトにより近いモルモットが，マウスよりも適していると考えられる。またモルモットは，アレルギー性結膜炎のモデル動物として汎用されている動物種であることから，結膜炎モデルには有用と考えられる。しかし，これまでモルモットを使用したヒスタミン H<sub>4</sub>受容体をターゲットにしたアレルギー性結膜炎治療薬のための薬効評価モデルに関する研究報告はない。

本章ではモルモットを用いて，ヒスタミン H<sub>4</sub>受容体作動薬によって結膜炎を誘発するモデルについて，第1章と同様の検証を行った。

## 2. 実験材料及び方法

本試験は「動物の愛護及び管理に関する法律」及び「株式会社イナリサーチ動物実験指針」を遵守し，試験施設の動物実験審査委員会 (IACUC) による審査を受けた試験計画書に従って適正に実施された。なお，試験施設は AAALAC International により認証を受けた実験施設で実施した。

### 2.1 使用動物，選定理由及び飼育方法

雄の Slc:Hartley モルモット (日本エスエルシー株式会社，6～10 週

齢) を使用した。使用動物は、アレルギー性結膜炎のモデル動物として汎用されている系統並びに性として選択した。各動物はステンレス製ワイヤーケージ (61W × 22D × 21H cm, エンリッチメント用の齧り木付き) に最大 3 匹/ケージで収容した。飼育室の温度は 21.0~25.0°C, 湿度は 40.0~70.0% の範囲となるよう制御した。証明時間は 12 時間/日 (7 時から 19 時までの人工照明) とした。餌は固型 LRC4 (オリエンタル酵母工業株式会社) を自由に摂取させた。飲料水は、自動給水装置により自由に摂取させた。

## 2.2 結膜炎誘発条件の検証

4MeHA として 4-methylhistamine dihydrochloride [5-(2-Aminoethyl)-4-methylimidazole dihydrochloride] (R&D Systems) を PBS に溶解させて使用した。4MeHA は選択的なヒスタミン H<sub>4</sub> 受容体作動薬として知られている (Lim et al., 2005)。4MeHA をモルモットに点眼した報告はないため, Nakano (Nakano et al., 2009) らの 4MeHA 誘発マウスモデルの報告をもとに初回の 4MeHA の濃度を決定した。Nakano らの報告では, マウスを用いてヒスタミン誘発モデルと 4MeHA 誘発モデルの 2 つの結膜炎モデルを検討しており, ヒスタミン誘発モデルでは最大で 10 μmol/5 μL/eye でヒスタミンを点眼していたのに対して, 4MeHA 誘発モデルはヒスタミンの 1/10 量の 1000 nmol/5 μL/eye で 4MeHA を点眼して結膜炎症状を誘発していた。一方, 亀井の報告 (亀井, 2006) では, 100 ng/μL (25 μL/eye), すなわち 13.58 nmol/eye のヒスタミンによってモルモットの結膜炎症状が誘発できることを報告している。本研究では, 亀井がモルモットで適用したヒスタミン量の 1/10 量である 1.358 nmol/eye (275 ng 4-methylhistamine dihydrochloride/eye) を 4MeHA の初回の投与量として設定した。すなわち, 本研究における初回の 4MeHA の濃度と点眼量は, 11 ng/μL (25 μL/eye) に設定した。その後, さらなる検証のため, 110 ng/μL (25 μL/eye), 550 ng/μL

(25  $\mu\text{L}/\text{eye}$ ) 及び 81000  $\text{ng}/\mu\text{L}$  (12.5  $\mu\text{L}/\text{eye}$ , 4MeHA として 5000 nmol) の 3 条件でモデルの作製を試みた。いずれの条件も、動物の両眼結膜嚢にそれぞれの 4MeHA 溶液を 1 回/eye 点眼して結膜炎症状を誘発した。肉眼的及び詳細な変化はスリットランプを用いてモデルの状態を評価し、確実に結膜炎症状が誘発され薬効評価が可能な 4MeHA の濃度と点眼量を決定した。

### 2.3 作製した結膜炎モデルの検証

結膜炎誘発条件の検証の結果、薬効評価に使用する 4MeHA の濃度と点眼量として 81000  $\text{ng}/\mu\text{L}$  (5000 nmol/12.5  $\mu\text{L}/\text{eye}$ ) を設定した。作製した結膜炎モデルがヒスタミン  $\text{H}_4$  受容体を標的にしたアレルギー性結膜炎治療薬の薬効評価に用いることが可能かを判断するため、市販の  $\text{H}_4$  受容体拮抗作用を示す薬剤を用いた薬効評価試験を実施した。薬効評価用の被験薬として JNJ7777120 [(5-chloro-1H-indol-2-yl)(4-methyl-1-piperazinyl)-methanone] (Cayman Chemical), 陰性対照物質として PBS を使用した。JNJ7777120 は、高い選択性と結合親和性をもつヒスタミン  $\text{H}_4$  受容体拮抗薬であり (Jablonowski et al., 2003), 既報 (Nakano et al., 2009) のマウスモデルの条件と合わせて 11.11  $\text{mg}/\text{mL}$  (1000 nmol/25  $\mu\text{L}$ ) の濃度で使用した。さらに、作製したモデルがヒスタミン  $\text{H}_4$  受容体に特異的であることを検証するため、 $\text{H}_1$  ブロッカー点眼薬であり、アレルギー性結膜炎に効能を有するレボカバスチン (Noble & McTavish, 1995) を比較対照物質として用いた。レボカバスチンは原液をそのまま使用した。評価項目は、結膜炎スコア、眼部引っ掻き行動の観察、結膜中の色素漏出量測定 (Kamei et al., 1991; Kato et al., 2004; Shii et al., 2009) として、それぞれの項目が JNJ7777120 によって特異的に抑制されるかを確認した。結膜炎スコア及び眼部引っ掻き行動の観察は同一動物を用いてヒスタミン点眼後 90 分まで観察を行った。色素

漏出量測定はヒスタミン点眼後 30 分に結膜組織を摘出するため、結膜炎スコア及び眼部引っ掻き行動の観察とは別の動物を用いて評価した。結膜炎スコア及び眼部引っ掻き行動の観察用の動物は、ヒスタミン点眼の約 60 分前に観察用ケージ（ポリカーボネート製ケージ、28W × 44D × 18H cm）に個別に収容し、眼部引っ掻き行動の観察の環境に順化させた。

### 2.3.1 投与方法

動物を保定して下眼瞼を緩やかに眼球から引き離し、JNJ7777120、レボカバスチンまたは PBS（25  $\mu$ L/eye）を左右の結膜嚢内にオートピペットを使用して点眼した。そのまま約 15 秒間保持した後、上下眼瞼を軽く閉じてゆっくりと指を離れた。その 15 分後に 4MeHA（12.5  $\mu$ L/eye）を同様に点眼した。

### 2.3.2 結膜炎スコア評価

結膜炎モデルの検証実験では、第 1 章の結果を参考にして Draize の基準 (Draize, 1959) 及び McDonald- Shadduck の基準 (McDonald & Shadduck, 1977) から虹彩と結膜の部分を抜粋して結膜炎スコアの評価に用いた（表 2 及び 4）。4MeHA の点眼前（薬効評価用薬剤の投与直後）、4MeHA 点眼後 30 分、60 分及び 90 分に眼（結膜、虹彩）の所見をそれぞれの評価基準に従って、肉眼的及びスリットランプを用いて観察した。虹彩及び結膜のすべてのスコアを左右別に合計してそれぞれの結膜炎スコアとした。

眼部引っ掻き行動の観察と同一動物を用いて、対照群及び JNJ7777120 群は各 5 例で、レボカバスチン群は 4 例で評価した。

### 2.3.3 眼部引っ掻き行動の観察

観察用ケージ内で、4MeHA 点眼後 30 分間のモルモットの行動をビデオで記録した。ビデオを再生し、後肢の眼部に対する引っ掻き回数

をカウントした。なお引っ掻き回数は、引っ掻きのために後肢を上げ、引っ掻き行動を行って再び後肢を下すまでの連続した動作を1回として評価した。

結膜炎スコア評価と同一動物を用いて、対照群及び JNJ7777120 群は各5例で、レボカバスチン群は4例で評価した。

#### 2.3.4 結膜中の色素漏出量測定

エバンスブルーを生理食塩液に溶解し、1w/v%溶液を調製した。薬効評価用薬剤の点眼5分後にエバンスブルー溶液を体重100gあたり0.25 mL 静脈内へ投与した。エバンスブルー溶液投与の10分後、4MeHAを点眼して結膜炎症状を誘発した。結膜炎誘発の30分後に動物をイソフルラン吸入麻酔下で、後大静脈及び腹大動脈を切断して放血致死させ、両眼結膜組織を摘出した。摘出した結膜組織の湿重量を測定し、細断後、0.5 mLの1N KOH溶液中に37°Cにて一晩（12~24時間）浸した。4.5 mLのH<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>-acetone溶液（0.6N H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> : acetone = 5 : 13）を加えてよく混和した。抽出液を遠心（約1800 × g，室温，20分）後、上清を採取して620 nmにおける吸光度を測定した。あらかじめ作成した検量線から結膜組織1gあたりの色素量を算出した。

眼部引っ掻き行動の観察及び結膜炎スコア評価と別の動物を用いて、1群あたり5例で評価した。

なお、結膜炎誘発条件の検証では明らかな浮腫は認められず、モルモットでは4MeHAの点眼によって血管透過性は亢進されないことが予想された。最低限の動物を用いたデザインで実験を行うこととしてレボカバスチン群では結膜中色素の測定群を設けなかった。

#### 2.3.5 統計解析

結膜炎スコアは、虹彩及び結膜のすべてのスコアの合計を算出して左右それぞれのスコアとした。さらに、各測定ポイントにおいて、左右の眼のすべてのスコアを用いて各群の平均値及び標準誤差を算出

し、対照群及び薬剤群について Wilcoxon の順位和検定を用いて比較した。引っ掻き行動の回数及び色素漏出量は、各群の平均値及び標準誤差を算出し、対照群及び薬剤群との間で F 検定による等分散性の検定（有意水準 5%）を行い、分散が等しい場合は Student の t 検定を、分散が等しくない場合は Aspin-Welch の t 検定を行った。検定はいずれも両側で、有意水準 5%で対照群との差が認められた場合に有意な変動とした。

### 3. 結果

#### 3.1 結膜炎誘発条件の検証

初回の点眼量として、4MeHA を 11 ng/ $\mu$ L (25  $\mu$ L/eye) で点眼したが、いずれの観察ポイントにおいても変化はみられなかった。

4MeHA の濃度を上げたところ、110 ng/ $\mu$ L (25  $\mu$ L/eye) では変化はみられず、550 ng/ $\mu$ L (25  $\mu$ L/eye) で、眼球結膜にわずかな充血が認められるのみだった。81000 ng/ $\mu$ L (5000 nmol/12.5  $\mu$ L/eye) において、浮腫は確認できなかったが、結膜及び虹彩に強い充血が確認された。

#### 3.2 作製した結膜炎モデルの検証

##### 3.2.1 結膜炎スコア評価

4MeHA の点眼後、対照群の全例で結膜及び虹彩の充血が認められ、結膜炎誘発条件の検証で認められた症状と同程度の結膜炎の発症を確認した。

4MeHA の点眼前（薬効評価用薬剤の投与後）、点眼後 30 分、60 分及び 90 分における各群の結膜炎スコアの平均値は、Draize の基準では、対照群で 0.0, 2.0, 2.0 及び 2.0, JNJ7777120 群で 0.0, 2.0, 1.2 及び 1.2, レボカバスチン群で 0.0, 2.0, 2.0 及び 2.0, McDonald-

Shadduck の基準では，対照群で 0.0，4.0，3.6 及び 3.6，JNJ7777120 群で 0.0，2.0，1.2 及び 1.2，レボカバスチン群で 0.0，4.0，3.5 及び 3.0 であった。Draize と McDonald-Shadduck の 2 つの基準で評価した結果，McDonald-Shadduck の基準でスコアが高い傾向にあった。

JNJ7777120 群では，4MeHA の点眼後，Draize の基準で 60 分以降，McDonald-Shadduck の基準で 30 分以降に対照群と比較して統計学的に有意な低値を示し，4MeHA による結膜炎症状に対して，抑制効果を示した（図 6～8）。

レボカバスチン群では，対照群との間に差はなく，ヒスタミン H<sub>4</sub> 受容体作動薬である 4MeHA で誘発した結膜炎症状に対して，ヒスタミン H<sub>1</sub> 受容体拮抗薬であるレボカバスチンは抑制効果を示さなかった。

### 3.2.2 眼部引っ掻き行動の観察

眼部引っ掻き行動回数の平均値 ± 標準誤差は，対照群で 3.8 ± 1.4 回，JNJ7777120 群で 3.0 ± 0.8 回，レボカバスチン群で 2.3 ± 1.1 回となり，JNJ7777120 及びレボカバスチン群のいずれも対照群との間に有意な差はみられなかった（図 9）。

### 3.2.3 結膜中の色素漏出量測定

結膜中色素の平均値 ± 標準誤差は，対照群で 22.3 ± 4.1 µg/g，JNJ7777120 群で 21.5 ± 1.8 µg/g となり，対照群と JNJ7777120 群との間に有意な差はみられなかった（図 10）。

## 4. 考察

過去に報告のある 4MeHA 誘発マウス結膜炎モデル (Nakano et al., 2009) と同様に，4MeHA をモルモットに点眼することでアレルギー性結膜炎様の症状が誘発できるか検証を行った結果，81000 ng/µL (5000

nmol/12.5  $\mu$ L/eye) において、結膜及び虹彩に強い充血が確認された。既報のマウスを用いた結膜炎モデルでは、10 nmol/eye 以上の 4MeHA の点眼で浮腫も認められていたが、モルモットでは 5000 nmol/eye まで投与量を増やしても浮腫が起こる兆候がみられなかった。このことから、モルモットを用いた 4MeHA 誘発結膜炎モデルは、浮腫を欠くものの虹彩を含む眼粘膜に強い充血が発現するのが特徴であると考えられた。4MeHA をマウス以外の動物に点眼して詳細に観察及び比較をした研究報告はこれまでにない。そのため、4MeHA 点眼の種差による結膜炎発症メカニズムの詳細は不明であるが、マウスとモルモットでは、ヒスタミンの  $H_4$  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可能性が示唆された。

次に、4MeHA 濃度 81000 ng/ $\mu$ L、点眼量 12.5  $\mu$ L/eye (4MeHA として 5000 nmol) の条件で作成した病態モデルについて、ヒスタミン  $H_4$  受容体をターゲットにした薬剤の薬効評価に適切かどうかを、ヒスタミン  $H_4$  受容体拮抗作用を示す JNJ7777120、及びヒスタミン  $H_1$  拮抗作用を示すレボカバスチンを使用して検証した。薬効評価の指標は結膜炎スコア評価、眼部引っ掻き行動の観察、結膜中の色素漏出量測定とした。4MeHA の点眼後、結膜炎誘発条件の検証で認められた症状と同程度の結膜及び虹彩の充血が認められ、いずれの症状も JNJ7777120 によって抑制されることを確認した。レボカバスチンは抑制効果を示さなかったことから、4MeHA の点眼後に観察された充血はヒスタミン  $H_4$  受容体特異的な変化と考えられた。しかし、眼部引っ掻き行動の観察、結膜中の色素漏出量測定では、JNJ7777120 あるいはレボカバスチンを投与したいずれの群も対照群との差はみられず、痒みや血管透過性（浮腫）に対する薬効は確認できなかった。モルモットでは浮腫が起きていないことから、血管透過性が亢進しておらず、結膜組織中への色素漏出量で評価をすることは困難と考えられた。また眼部引っ掻

き行動は、マウスを用いた結膜炎モデルでは 4MeHA の点眼により明らかに正常動物と比較して引っ掻き回数が増加しているが、この研究の対照群の値は、前章及び同じモルモットで結膜炎症状が発症している動物の値と比較して、明らかに少なかった (Kato et al., 2004)。モルモットでは 4MeHA の点眼のみでは引っ掻き行動に繋がる痒みは誘発されない、あるいは、浮腫が生じず結膜の腫れによる物理的な刺激がなかったことで、引っ掻き行動に繋がらなかった可能性が考えられた。

以上のとおり、モルモットにおいても既報のマウスを用いた結膜炎モデルと同様の反応が得られることを期待したが、モルモットでは結膜及び虹彩の充血が認められるのみで、血管透過性の亢進や引っ掻き行動の増加がみられず、アレルギー性結膜炎の薬効評価で一般的に用いられている指標を網羅的に評価することはできなかった。ただし、今回認められた結膜及び虹彩の充血はヒスタミン H<sub>4</sub> 受容体拮抗薬で特異的に抑制され、その変化は結膜炎スコアによって評価可能であった。マウス結膜炎モデルのような結膜浮腫は起きないが、充血を結膜炎スコアで評価することで H<sub>4</sub> 受容体拮抗作用をもつ薬剤の評価は可能であることが確認できた。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が、ヒスタミン H<sub>4</sub> 受容体をターゲットにした複数の候補化合物がある開発初期において化合物の選別を目的に、簡易的な薬効スクリーニングとして活用できる可能性が考えられた。

なお、結膜炎スコア評価については、第 1 章で検証した Draize の基準に加え、McDonald-Shadduck の基準でも評価を行った。McDonald-Shadduck の基準も Draize の基準同様、医薬品開発において眼の急性毒性（刺激性）を調べる試験で一般的に用いられており (Daull et al., 2018)、医療機器の安全性評価の国際規格である ISO 9394 にも採用され国際的にも広く利用されている基準である。この 2 つの基準で評価し

た結果、McDonald-Shadduck の基準でスコアが高い傾向にあった。その理由として、Draize の基準の虹彩のスコアが 0~2 の 3 段階であるのに対して、McDonald-Shadduck の基準の虹彩のスコアは 0~4 の 5 段階であり、虹彩の変化をより詳細に観察できたためと考えられた。虹彩の変化が主たる症状であるモルモットの 4MeHA 誘発モデルにおいては、McDonald-Shadduck の基準を用いることで適切に変化を捉えられることが可能であり、信頼性の高い結果が得られると考えられた。

## 5. 小括

4MeHA を 81000 ng/ $\mu$ L (5000 nmol/12.5  $\mu$ L/eye) でモルモットの結膜囊に点眼したところ、結膜及び虹彩の充血が確認できたが、既報のマウスを用いた結膜炎モデルのような浮腫はみられず、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 H<sub>4</sub> 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可能性が示唆された。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 H<sub>4</sub> 受容体拮抗薬で特異的に抑制され、その変化は結膜炎スコアによって評価可能であった。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、医薬品の開発初期において、簡易的なスクリーニングのための病態モデルとして活用できる可能性が考えられた。結膜炎スコアの評価基準は、第 1 章と同様に医薬品や化学物質、医療機器の安全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。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でこのモデルにより適していると考えられた。

## 総 括

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、特に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、適切な病態モデル及び薬効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の薬効を評価するための病態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、実験操作が簡便なため、開発初期のスクリーニングのための病態モデルとして有用である。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類似していることから、開発初期の薬効評価に用いる動物種としては適切と考えられている。一方で、このモデルにおける結膜炎誘発物質の濃度や点眼量といった誘発条件は統一されておらず、薬効評価に適したモデルの作製条件は不明である。さらに、結膜炎症状を観察するための従来 of 結膜炎スコアによる評価方法は、既報の研究論文によって評価基準がばらばらで曖昧な部分が多いという課題がある。そのため、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と考えられる。そこで、本研究ではヒスタミンとヒスタミン H<sub>4</sub> 受容体作動薬である 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病態モデルを用いて、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を検証した。さらに、この病態モデルを用いて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、モルモットを用いたヒスタミン誘発結膜炎モデルについて検討した。その結果、既存モデル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/ $\mu$ L

(12.5  $\mu$ L/eye) まで増加させる必要があった。2000 ng/ $\mu$ L

(12.5  $\mu$ L/eye) で作製したモデルは市販の抗ヒスタミン薬の薬効を捉えることができた。評価方法については、医薬品等の開発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。

第 2 章では、近年アレルギー性結膜炎の治療薬として注目されているヒスタミン H<sub>4</sub> 受容体拮抗薬の評価のためのモデルとして、4MeHA 誘発結膜炎モデルについて検討した。その結果、4MeHA を 81000 ng/ $\mu$ L (12.5  $\mu$ L/eye, 4MeHA として 5000 nmol) でモルモットに点眼したところ、結膜及び虹彩に強い充血が確認された。既報のマウスを用いた結膜炎モデルでは浮腫が認められていたが、マウスのモデル以上に 4MeHA の投与量を上げて浮腫が起こる兆候がみられなかったことから、モルモットを用いた 4MeHA 誘発結膜炎モデルは、浮腫を欠くものの虹彩を含む眼粘膜に強い充血が発現するのが特徴であると考えられた。結膜炎スコアに関しては、第 1 章の Draize の基準に加え、同じく医薬品等の毒性試験で用いられている McDonald-Shadduck の基準の 2 つを採用した。2 つの基準の結果を比較したところ、McDonald-Shadduck の基準でスコアが高い傾向にあった。その理由として、Draize の基準と比べて McDonald-Shadduck の基準の方が虹彩のスコアが細分化されていて、虹彩の変化をより詳細に観察できたためと考えられた。虹彩の変化が主たる症状であるモルモットの 4MeHA 誘発モデルにおいては、McDonald-Shadduck の基準を用いることで適切に変化を捉えることが可能だった。この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、医薬品の開発初期において、簡易的なスクリーニングのための病態モデルとして活用できる可能性が考えられた。

いずれの病態モデルも過去に報告のあったモデルの情報から作製条件を事前に詳細に確認する必要があったが、結果として、ヒスタミン誘発モデルはヒスタミンを 2000 ng/ $\mu$ L (25  $\mu$ L/eye) で、4MeHA 誘発モデルは 4MeHA を 81000 ng/ $\mu$ L (12.5  $\mu$ L/eye, 4MeHA として 5000 nmol) でモルモットの結膜嚢に点眼することで、薬効評価が可能な結膜炎症状を誘発できることが明らかになった。医薬品開発のための病態モデルとしては、再現性があることは重要な要件である。しかし一方で、研究論文において材料や実験環境についてそれらの情報が事細かに記載されることは稀であり、異なる施設で再現を試みる場合に、そのすべての条件を完全に一致させることは不可能である。本研究のように既報の研究論文の情報をもとに病態モデルの作製方法を改変する際は、材料や方法をより詳細に記録し公表することが、後の再現性の向上のためには重要と考えられた。そのような記録があることで施設ごと再現性を妨げる要因の検証が可能となり、ばらつきの少ない最適な病態モデルの作製条件が設定でき、作製したモデルや実験の信頼性を高めることができると考えられた。さらに、薬効評価方法に関しては結膜炎スコアに課題があったが、医薬品や化学物質、医療機器の毒性試験で国際的にも標準化されている評価基準である Draize 及び McDonald-Shadduck の基準を病態モデルの症状観察に取り入れることで、より信頼性の高い結果が得られ、精度の高い薬効試験が可能であった。これらの基準を用いて安全性が評価された医薬品は多数上市されており、医薬品開発に関わる多くの実験施設では既にこの基準が導入されている。既に手順も標準化されていることから、この基準を

薬効評価に応用することは容易と考えられ、アレルギー性結膜炎のための薬効評価方法の標準化に繋がるものと考えられた。開発初期の非臨床試験の段階からこのような検討を行うことは、臨床開発の成功確率を上げ、膨大となっている医薬品開発費用の抑制の一助にも役立つものと期待される。

## 謝 辞

本論文の作成にあたり，終始御指導，御鞭撻賜りました岩手大学 農学部 共同獣医学科 比較薬理毒性学研究室 教授 佐藤 洋先生に深謝します。

本稿作成に際し，有益な御助言と御校閲を頂いた岩手大学 農学部 共同獣医学科 獣医公衆衛生学研究室 教授 寺嶋 淳先生，岩手大学 農学部 動物医学食品安全教育研究センター 獣医環境衛生学研究室 教授 佐藤 至 先生，東京農工大学 農学研究院 動物生命科学部門 准教授 佐々木 一昭先生，東京農工大学 農学研究院 動物生命科学部門 准教授 臼井 達哉先生に深甚なる謝意を表します。

本研究の遂行にあたり多大な御助言，御協力頂きました株式会社イナリサーチ 執行役員 DX 推進部担当 兼 創薬戦略相談室 室長 下井 昭仁博士に厚く御礼申し上げます。

本研究の実施において，共に実験を行っていただいた株式会社イナリサーチ 試験研究センター 巢山 晋氏，井上 敏氏及び中島 実千代氏並びにその他全ての皆様に感謝の意を表します。

## 文 献

- Collins, F. S., & Tabak, L. A. (2014). Policy: NIH plans to enhance reproducibility. *Nature*, 505(7485), 612-613.
- Dauil, P., Raymond, E., Feraille, L., & Garrigue, J. S. (2018). Safety and Tolerability of Overdosed Artificial Tears by Abraded Rabbit Corneas. *J Ocul Pharmacol Ther*, 34(10), 670-676.
- de Esch, I. J., Thurmond, R. L., Jongejan, A., & Leurs, R. (2005). The histamine H4 receptor as a new therapeutic target for inflammation. *Trends Pharmacol Sci*, 26(9), 462-469.
- Draize, J. H. (1959). Dermal toxicity. In: Appraisal of the safety of chemicals in foods, drugs and cosmetics. The association of Food and Drug Officials of the United States.
- Dupuis, P., Prokopich, C. L., Hynes, A., & Kim, H. (2020). A contemporary look at allergic conjunctivitis. *Allergy Asthma Clin Immunol*, 16, 5.
- Elieh Ali Komi, D., Rambasek, T., & Bielory, L. (2018). Clinical implications of mast cell involvement in allergic conjunctivitis. *Allergy*, 73(3), 528-539.
- Entzeroth, M., Flotow, H., & Condron, P. (2009). Overview of high-throughput screening. *Curr Protoc Pharmacol*, Chapter 9, Unit 9.4.
- Fukushima, A., & Tomita, T. (2009). Image analyses of the kinetic changes of conjunctival hyperemia in histamine-induced conjunctivitis in Guinea pigs. *Cornea*, 28(6), 694-698.
- Fukushima, Y., Nabe, T., Mizutani, N., Nakata, K., & Kohno, S. (2003). Multiple cedar pollen challenge diminishes involvement of histamine in allergic conjunctivitis of Guinea pigs. *Biol Pharm Bull*, 26(12), 1696-1700.
- Gutzmer, R., Diestel, C., Mommert, S., Köther, B., Stark, H., Wittmann, M., & Werfel, T. (2005). Histamine H4 receptor stimulation suppresses IL-

- 12p70 production and mediates chemotaxis in human monocyte-derived dendritic cells. *J Immunol*, 174(9), 5224-5232.
- Hofstra, C. L., Desai, P. J., Thurmond, R. L., & Fung-Leung, W. P. (2003). Histamine H4 receptor mediates chemotaxis and calcium mobilization of mast cells. *J Pharmacol Exp Ther*, 305(3), 1212-1221.
- Howells, D. W., Sena, E. S., & Macleod, M. R. (2014). Bringing rigour to translational medicine. *Nat Rev Neurol*, 10(1), 37-43.
- Inada, N., Shoji, J., Shiraki, Y., Aso, H., & Yamagami, S. (2017). Histamine H(1) and H(4) receptor expression on the ocular surface of patients with chronic allergic conjunctival diseases. *Allergol Int*, 66(4), 586-593.
- Jablonowski, J. A., Grice, C. A., Chai, W., Dvorak, C. A., Venable, J. D., Kwok, A. K., Ly, K. S., Wei, J., Baker, S. M., Desai, P. J., Jiang, W., Wilson, S. J., Thurmond, R. L., Karlsson, L., Edwards, J. P., Lovenberg, T. W., Carruthers, N. I. (2003). The first potent and selective non-imidazole human histamine H4 receptor antagonists. *J Med Chem*, 46(19), 3957-3960.
- Jalbert, I., & Golebiowski, B. (2015). Environmental aeroallergens and allergic rhino-conjunctivitis. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*, 15(5), 476-481.
- Kamei, C., Izushi, K., & Tasaka, K. (1991). Inhibitory effect of levocabastine on experimental allergic conjunctivitis in guinea pigs. *J Pharmacobiodyn*, 14(8), 467-473.
- 亀井 千晃. (2006). アレルギー性結膜炎の動物モデル. *アレルギー・免疫*, 13 卷 10 号, 1416-1428.
- Kato, M., Imoto, K., Miyake, H., Oda, T., Miyaji, S., & Nakamura, M. (2004). Apafant, a potent platelet-activating factor antagonist, blocks eosinophil activation and is effective in the chronic phase of experimental allergic conjunctivitis in guinea pigs. *J Pharmacol Sci*,

95(4), 435-442.

公益財団法人日本眼科学会. (2010). アレルギー性結膜疾患診療ガイドライン (第2版). 日本眼科学会雑誌, 114 巻 10 号, 833-870.

公益財団法人日本眼科学会. (2021). アレルギー性結膜疾患診療ガイドライン (第3版). 日本眼科学会雑誌, 125 巻 8 号, 741-785.

厚生労働省. (2018). 第5回国立高度専門医療研究センターの今後の在り方検討会, 臨床研究に関する現状と最近の動向について. <https://www.mhlw.go.jp/content/10800000/000358539.pdf>

国立研究開発法人新エネルギー・産業技術総合開発機構. (2010). 「研究用モデル細胞の創薬技術開発プロジェクト」第1回事後評価分科会説明資料. <https://www.nedo.go.jp/content/100096077.pdf>.

Kowalski, R. P., Romanowski, E. G., Yates, K. A., & Mah, F. S. (2016). An Independent Evaluation of a Novel Peptide Mimetic, Brilacidin (PMX30063), for Ocular Anti-infective. *J Ocul Pharmacol Ther*, 32(1), 23-27.

Kyei, S., Koffuor, G. A., Ramkissoo, P., Abokyi, S., Owusu-Afriyie, O., & Wiredu, E. A. (2015). Possible Mechanism of Action of the Antiallergic Effect of an Aqueous Extract of *Heliotropium indicum* L. in Ovalbumin-Induced Allergic Conjunctivitis. *J Allergy (Cairo)*, 2015, 245370.

Lather, A., Sharma, S., & Khatkar, A. (2020). Naringin derivatives as glucosamine-6-phosphate synthase inhibitors based preservatives and their biological evaluation. *Sci Rep*, 10(1), 20477.

Leonardi, A. (2000). Role of histamine in allergic conjunctivitis. *Acta Ophthalmol Scand Suppl*(230), 18-21.

Lim, H. D., van Rijn, R. M., Ling, P., Bakker, R. A., Thurmond, R. L., & Leurs, R. (2005). Evaluation of histamine H1-, H2-, and H3-receptor ligands at the human histamine H4 receptor: identification of 4-methylhistamine as the first potent and selective H4 receptor agonist. *J*

- Pharmacol Exp Ther, 314(3), 1310-1321.
- Liu, C., Wilson, S. J., Kuei, C., & Lovenberg, T. W. (2001). Comparison of human, mouse, rat, and guinea pig histamine H4 receptors reveals substantial pharmacological species variation. *J Pharmacol Exp Ther*, 299(1), 121-130.
- Maling, H. M., Webster, M. E., Williams, M. A., Saul, W., & Anderson, W. (1974). Inflammation induced by histamine, serotonin, bradykinin and compound 48-80 in the rat: antagonists and mechanisms of action. *J Pharmacol Exp Ther*, 191(2), 300-310.
- McDonald, T. O., & Shadduck, J. A. (1977). Eye irritation In: *Dermatotoxicology and Pharmacology*. John Wiley & Son's.
- Mehta, M. C., Calonge, M. C., Levene, R. B., Bloch, K. J., & Allansmith, M. R. (1990). Effect of topical dexamethasone on the ocular allergic reaction in passively sensitized guinea pigs. *Ophthalmic Res*, 22(6), 351-358.
- Moeller, A., Ask, K., Warburton, D., Gauldie, J., & Kolb, M. (2008). The bleomycin animal model: a useful tool to investigate treatment options for idiopathic pulmonary fibrosis? *Int J Biochem Cell Biol*, 40(3), 362-382.
- Nakano, Y., Takahashi, Y., Ono, R., Kurata, Y., Kagawa, Y., & Kamei, C. (2009). Role of histamine H(4) receptor in allergic conjunctivitis in mice. *Eur J Pharmacol*, 608(1-3), 71-75.
- Nakayama, T., Kato, Y., Hieshima, K., Nagakubo, D., Kunori, Y., Fujisawa, T., & Yoshie, O. (2004). Liver-expressed chemokine/CC chemokine ligand 16 attracts eosinophils by interacting with histamine H4 receptor. *J Immunol*, 173(3), 2078-2083.
- 日本製薬工業協会 . (2020). 第 1 医薬品開発協議会 .  
<https://www.kantei.go.jp/jp/singi/kenkouiryou/iyakuhin/dai1/siryou2->

5.pdf.

- Noble, S., & McTavish, D. (1995). Levocabastine. An update of its pharmacology, clinical efficacy and tolerability in the topical treatment of allergic rhinitis and conjunctivitis. *Drugs*, 50(6), 1032-1049.
- Ohbayashi, M., Manzouri, B., Morohoshi, K., Fukuda, K., & Ono, S. J. (2010). The role of histamine in ocular allergy. *Adv Exp Med Biol*, 709, 43-52.
- PMDA. (2006). パタノール点眼液 0.1%に関する資料 .  
<https://www.pmda.go.jp/drugs/2006/P200600037/index.html>
- Richter, S. H. (2017). Systematic heterogenization for better reproducibility in animal experimentation. *Lab Anim (NY)*, 46(9), 343-349.
- Shii, D., Nakagawa, S., Yoshimi, M., Katsuta, O., Oda, T., & Nakamura, M. (2010). Inhibitory effects of cyclosporine a eye drops on symptoms in late phase and delayed-type reactions in allergic conjunctivitis models. *Biol Pharm Bull*, 33(8), 1314-1318.
- Shii, D., Oda, T., Shinomiya, K., Katsuta, O., & Nakamura, M. (2009). Cyclosporine A eye drops inhibit the early-phase reaction in a type-I allergic conjunctivitis model in mice. *J Ocul Pharmacol Ther*, 25(4), 321-328.
- Shinn, P., Chen, L., Ferrer, M., Itkin, Z., Klumpp-Thomas, C., McKnight, C., . . . Guha, R. (2019). High-Throughput Screening for Drug Combinations. *Methods Mol Biol*, 1939, 11-35.
- Stock, E. L., Dwyer, R. S., Jones, B. R., & Waters, J. A. (1985). Pharmacologic inhibition of immediate hypersensitivity in the guinea pig conjunctiva. *J Ocul Pharmacol*, 1(2), 183-187.
- 須藤 正樹, 渡邊 修造, 稲垣 泰介. (2008). 創薬におけるハイスループットスクリーニング技術の最前線. *化学と生物*, 46 卷 12 号, 859-864.
- Wade, L., Bielory, L., & Rudner, S. (2012). Ophthalmic antihistamines and

- H1-H4 receptors. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*, 12(5), 510-516.
- Weimer, L. K., Gamache, D. A., & Yanni, J. M. (1998). Histamine-stimulated cytokine secretion from human conjunctival epithelial cells: inhibition by the histamine H1 antagonist emedastine. *Int Arch Allergy Immunol*, 115(4), 288-293.
- Zampeli, E., & Tiligada, E. (2009). The role of histamine H4 receptor in immune and inflammatory disorders. *Br J Pharmacol*, 157(1), 24-33.

## 図表

表 1 結膜炎誘発条件の検証のための結膜炎スコア基準

評点	グレード	結膜炎の状態
0	no symptoms	所見なし。
1	minimal	眼球結膜の一部に浮腫または充血が認められる
2	mild	眼球結膜の全体に浮腫または充血が認められる。
3	moderate	眼球結膜の浮腫または充血に加え，眼瞼結膜の軽度の浮腫が認められる。
4	marked	眼球結膜の浮腫または充血に加え，眼瞼結膜の中等度の浮腫が認められる。
5	severe	眼球結膜の浮腫または充血に加え，眼瞼結膜の強度の浮腫が認められる。

モデルの状態を確認するための結膜炎スコア基準として使用した。  
左右の眼の状態を総合的に評価して各評点及びグレードに分類した。

表 2 Draize の評価基準

Iris	
(A) Appearance, values	
Normal .....	0
Folds above normal, congestion, swelling, circumcorneal injection (any or all of these or combination of any thereof), iris still reacting to light (sluggish reaction is positive).....	1
No reaction to light, hemorrhage, gross destruction (any or all of these).....	2
Conjunctivae	
(A) Redness (refers to palpebral and bulbar conjunctivae)	
Vessels normal.....	0
Vessels definitely injected above normal.....	1
More diffuse, deeper crimson red, individual vessels not easily discernible.....	2
Diffuse beefy red.....	3
(B) Chemosis	
No swelling.....	0
Any swelling above normal.....	1
Obvious swelling with partial eversion of lids.....	2
Swelling with lids about half closed.....	3
Swelling with lids about half closed to completely closed.....	4
(C) Discharge	
No discharge.....	0
Any amount different from normal.....	1
Discharge with moistening of the lids and hairs just adjacent to lids.....	2
Discharge with moistening of the lids and hairs, and considerable area around the eye.....	3

Draize の基準の虹彩及び結膜部分を抜粋して結膜炎スコア評価に使用した。虹彩及び結膜のすべてのスコアの合計を算出して左右それぞれの結膜炎スコアとした。

表 3 ヒスタミンモデルにおける各誘発条件による結膜炎症状の違い

Histamine		Conjunctivitis symptoms
(ng/ $\mu$ L)	( $\mu$ L/eye)	
100	25	Slight edema or hyperemia was observed in the bulbar conjunctiva. No changes were observed in the eyelids.
1000	25	Same as 100 ng/ $\mu$ L.
2000	25	Very strong edema and hyperemia were observed from the bulbar conjunctiva to the upper and lower eyelids.
2000	12.5	The severity of hyperemia and edema slightly reduced as compared to 2000 ng/ $\mu$ L (25 $\mu$ L/eye).

ヒスタミン濃度（点眼量）として，100 ng/ $\mu$ L（25  $\mu$ L/eye），  
1000 ng/ $\mu$ L（25  $\mu$ L/eye），2000 ng/ $\mu$ L（12.5  $\mu$ L/eye）及び 2000 ng/ $\mu$ L  
（25  $\mu$ L/eye）の 4 つの条件について検討した結果を示した。

表 4 McDonald- Shaddock の基準

Conjunctival congestion	
0 =	Normal. May appear blanched to reddish pink without perilimbal injection (except at 12:00 and 6:00 o'clock positions) with vessels of the palpebral and bulbar conjunctiva easily observed.
+1 =	A flushed, reddish color predominately confined to the palpebral conjunctiva with some perilimbal injection but primarily confined to the lower and upper parts of the eye from the 4:00 to 7:00 and 11:00 to 1:00 o'clock positions.
+2 =	Bright red color of the palpebral conjunctiva with accompanying perilimbal injection covering at least 75% of the circumference of the perilimbal region.
+3 =	Dark, beefy red color with congestion of both the bulbar and the palpebral conjunctiva along with pronounced perilimbal injection and the presence of petechia on the conjunctiva. The petechia generally predominates along the nictitating membrane.
Conjunctival swelling	
0 =	Normal or no swelling of the conjunctival tissue.
+1 =	Swelling above normal without eversion of the lids (can be easily ascertained by noting that the upper and lower eyelids are positioned as in the normal eye), swelling generally starts in the lower cul-de-sac near the inner canthus.
+2 =	Swelling with misalignment of the normal approximation of the lower and upper eyelids; primarily confined to the upper eyelid so that in the initial stages the misapproximation of the eyelids begins by partial eversion of the upper eyelid. In this stage, swelling is confined generally to the upper eyelid, although it exists in the lower cul-de-sac.
+3 =	Definite swelling with partial eversion of the upper and lower eyelids essentially equivalent. This can be easily ascertained by looking at the animal head-on and noticing the positioning of the eyelids; if the eye margins do not meet, eversion has occurred.
+4 =	Eversion of the upper eyelid is pronounced with less pronounced eversion of the lower eyelid. It is difficult to retract the lids and observe the perilimbal region.
Conjunctival discharge	
0 =	Normal. No discharge.
+1 =	Discharge above normal and present on the inner portion of the eye but not on the lids or hairs of the eyelids. One can ignore the small amount that is in the inner and outer canthus.
+2 =	Discharge is abundant, easily observed, and has collected on the lids and around the hairs of the eyelids.
+3 =	Discharge has been flowing over the eyelids so as to wet the hairs substantially on the skin around the eye.
Iris	
0 =	Normal iris without any hyperemia of the iris vessels. Occasionally around the 12:00 to 1:00 o'clock position near the pupillary border and the 6:00 to 7:00 o'clock position near the pupillary border there is a small area around 1 mm to 3 mm in diameter in which both the secondary and tertiary vessels are slightly hyperemic.
+1 =	Minimal injection of secondary vessels but not tertiary. Generally, it is uniform, but may be of greater intensity at the 1:00 or 6:00 o'clock position. If it is confined to the 1:00 or 6:00 o'clock position, the tertiary vessels must be substantially hyperemic.
+2 =	Minimal injection of tertiary vessels and minimal to moderate injection of the secondary vessels.
+3 =	Moderate injection of the secondary and tertiary vessels with slight swelling of the iris stroma (this gives the iris surface a slightly rugose appearance, which is usually most prominent near the 3:00 and 9:00 o'clock positions).
+4 =	Marked injection of the secondary and tertiary vessels with marked swelling of the iris stroma. The iris appears rugose; may be accompanied by hemorrhage (hyperemia) in the anterior chamber.

McDonald- Shaddock の基準の虹彩及び結膜部分を抜粋して結膜炎スコア評価に使用した。虹彩及び結膜のすべてのスコアの合計を算出して左右それぞれの結膜炎スコアとした。

Normal	Moderate Histamine: 2000 ng/ $\mu$ L Volume: 12.5 $\mu$ L/eye	Severe Histamine: 2000 ng/ $\mu$ L Volume: 25 $\mu$ L/eye
		

図 1 異なるヒスタミン投与量による結膜炎症状の違い  
ヒスタミン濃度（点眼量）が 2000 ng/ $\mu$ L（12.5  $\mu$ L/eye）及び  
2000 ng/ $\mu$ L（25  $\mu$ L/eye）の条件並びに比較対照として無処置動物の眼  
の状態を示した。2000 ng/ $\mu$ L（25  $\mu$ L/eye）では、ヒスタミン点眼後 30  
分に、眼球結膜から上下眼瞼にかけて非常に強い浮腫及び充血が確認  
された。2000 ng/ $\mu$ L（12.5  $\mu$ L/eye）では、2000 ng/ $\mu$ L（25  $\mu$ L/eye）と比  
較して充血及び浮腫の程度はやや軽減された。

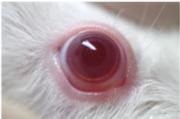
		Pre	30 min	60 min	90 min
PBS	Symptom				
	Score	Any score is 0	Iris; appearance, values: 0, Conjunctivae; redness: 1, chemosis: 2, discharge: 1	Iris; appearance, values: 0, Conjunctivae; redness: 1, chemosis: 1, discharge: 1	Iris; appearance, values: 0, Conjunctivae; redness: 1, chemosis: 1, discharge: 0
Levocabastine	Symptom				
	Score	Any score is 0	Any score is 0	Any score is 0	Any score is 0

図 2 ヒスタミン誘発モデルにおける対照群とレボカバスタチン群の比較  
ヒスタミンの点眼前（PBSまたはレボカバスタチンの投与後），点眼後  
30分，60及び90分の各群の眼の状態を示した。

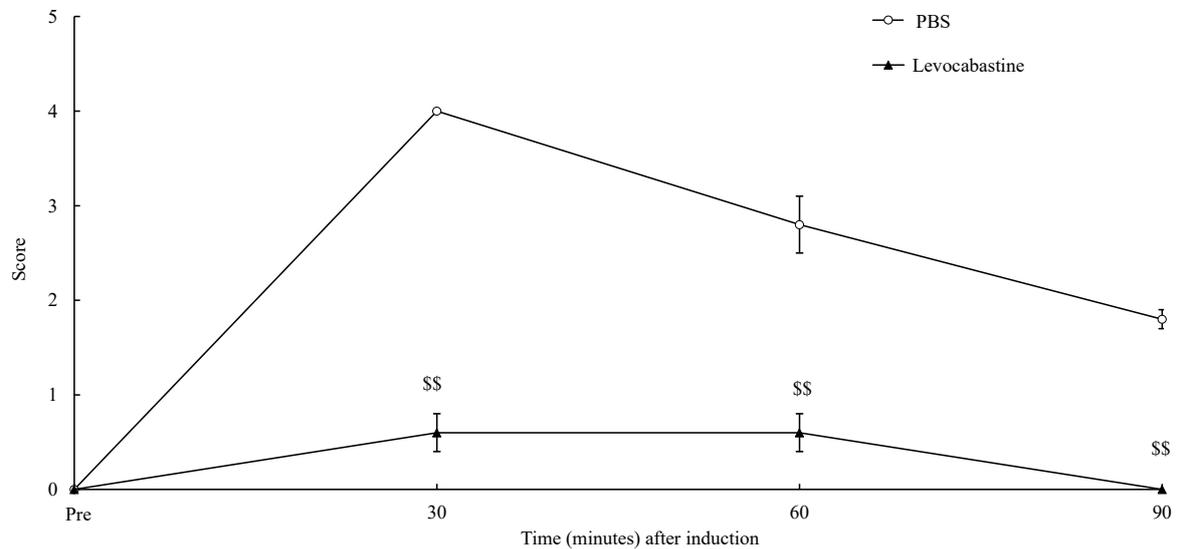


図 3 ヒスタミン誘発モデルにおける対照群及びレボカバステチン群の結膜炎スコアの比較

ヒスタミンの点眼前（PBS またはレボカバステチンの投与後），点眼後 30 分，60 及び 90 分に結膜及び虹彩の状態を観察し，Draize の基準に従って判定した結膜炎スコアの推移を示した。

値は各群の平均値±標準誤差（N = 10，動物数 5 匹の両眼）で示した。

\$\$は Wilcoxon の順位和検定において  $P < 0.01$  であったことを示す。

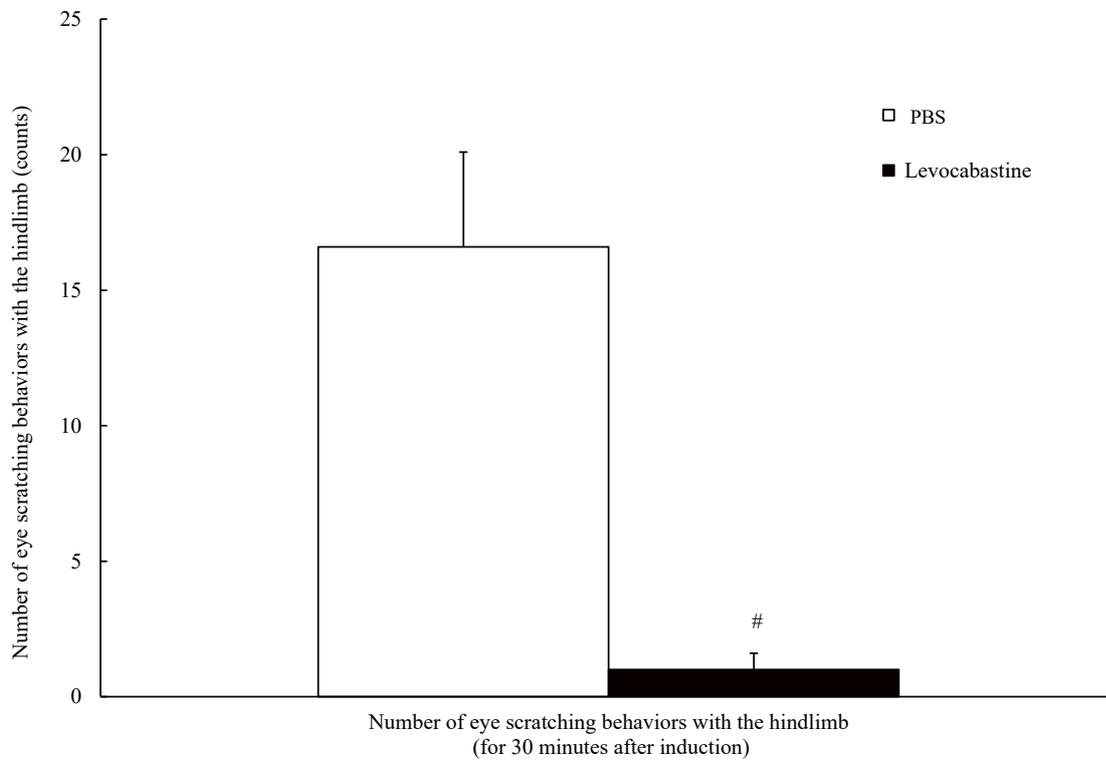


図 4 ヒスタミン誘発モデルにおける対照群及びレボカバスチン群の眼部引っ掻き行動回数比較

ヒスタミン点眼後 30 分間の後肢の眼部に対する引っ掻き回数をカウントした結果を示した。連続した引っ掻き動作は 1 回として評価した。値は各群の平均値±標準誤差 (N = 5) で示した。#は *Aspin-Welch* の t 検定において  $P < 0.05$  であったことを示す。

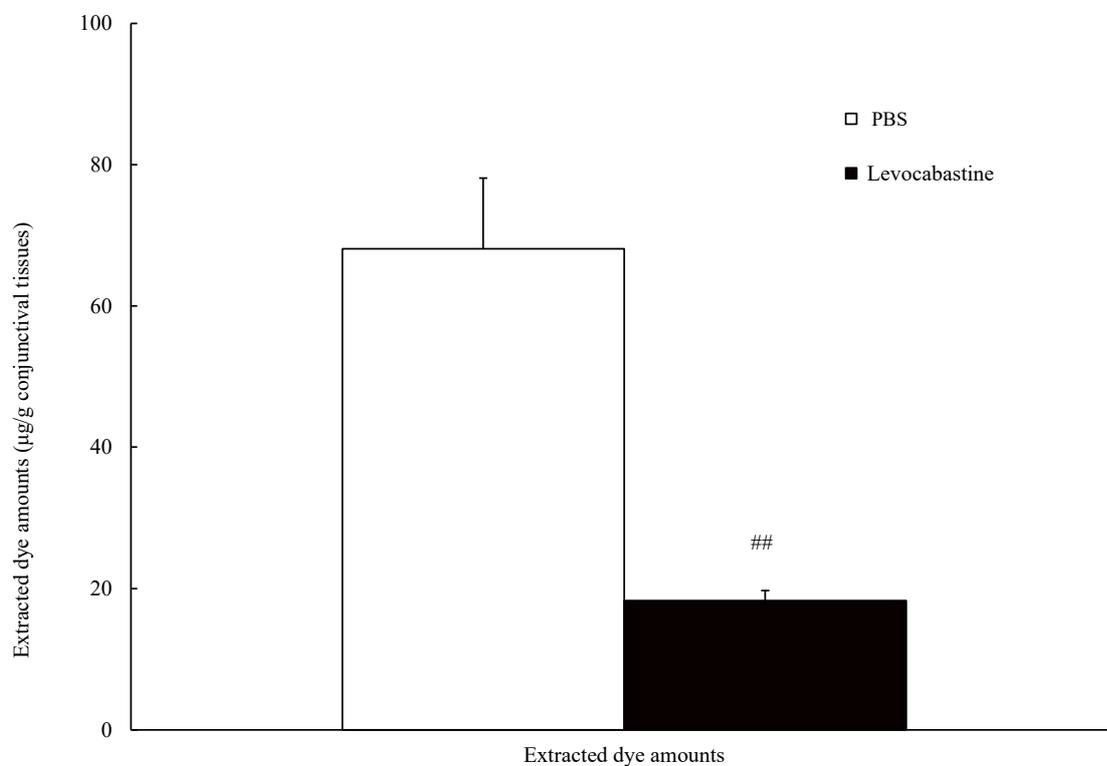


図 5 ヒスタミン誘発モデルにおける対照群及びレボカバステチン群の結膜中の色素漏出量の比較

ヒスタミン点眼の 30 分後の結膜組織中のエバンスブルーの色素量を示した。結膜抽出液の吸光度から結膜組織 1 g あたりの色素量として算出した。

値は各群の平均値±標準誤差 (N = 5) で示した。##は Aspin-Welch の t 検定において  $P < 0.01$  であったことを示す。

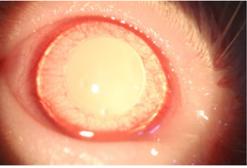
		30 min	60 min	90 min
PBS	Symptom			
	Score	Conjunctival congestion: 2, Conjunctival swelling: 0, Conjunctival discharge: 1 Iris: 2	Conjunctival congestion: 2, Conjunctival swelling: 0, Conjunctival discharge: 0, Iris: 2	Conjunctival congestion: 2, Conjunctival swelling: 0, Conjunctival discharge: 0, Iris: 2
JNJ7777120	Symptom			
	Score	Conjunctival congestion: 1, Conjunctival swelling: 0, Conjunctival discharge: 0, Iris: 1	Conjunctival congestion: 1, Conjunctival swelling: 0, Conjunctival discharge: 0, Iris: 1	Conjunctival congestion: 1, Conjunctival swelling: 0, Conjunctival discharge: 0, Iris: 1

図 6 4MeHA 誘発モデルにおける対照群と JNJ7777120 群の比較

4MeHA 点眼後 30 分，60 及び 90 分の各群の眼の状態を示した。スコアは McDonald-Shadduck scoring system で観察した結果を示した。

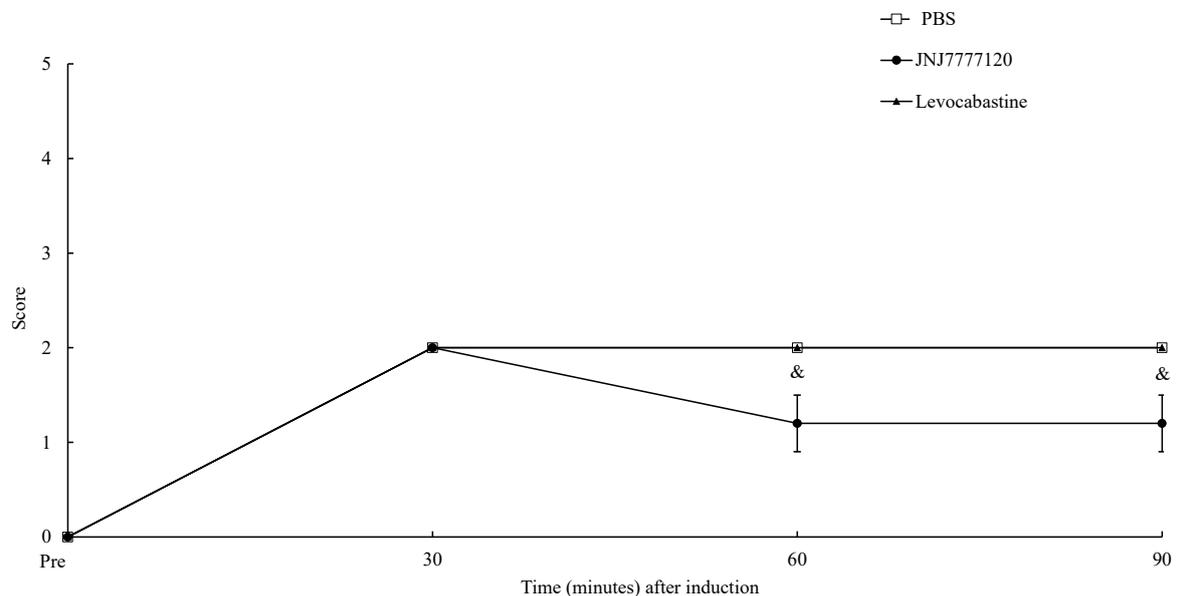


図 7 4MeHA 誘発モデルにおける対照群，JNJ777120 群及びレボカバスチン群の結膜炎スコアの比較（Draize の基準）

4MeHA の点眼前（PBS，JNJ777120 またはレボカバスチンの投与後），点眼後 30 分，60 及び 90 分に結膜及び虹彩の状態を観察し，Draize の基準に従って判定した結膜炎スコアの推移を示した。

値は各群の平均値±標準誤差で示した。対照群及び JNJ777120 群は N = 10（動物数 5 匹の両眼），レボカバスチン群は N = 8（動物数 4 匹の両眼）の平均値であり，&は Wilcoxon の順位和検定において P < 0.05 であったことを示す。

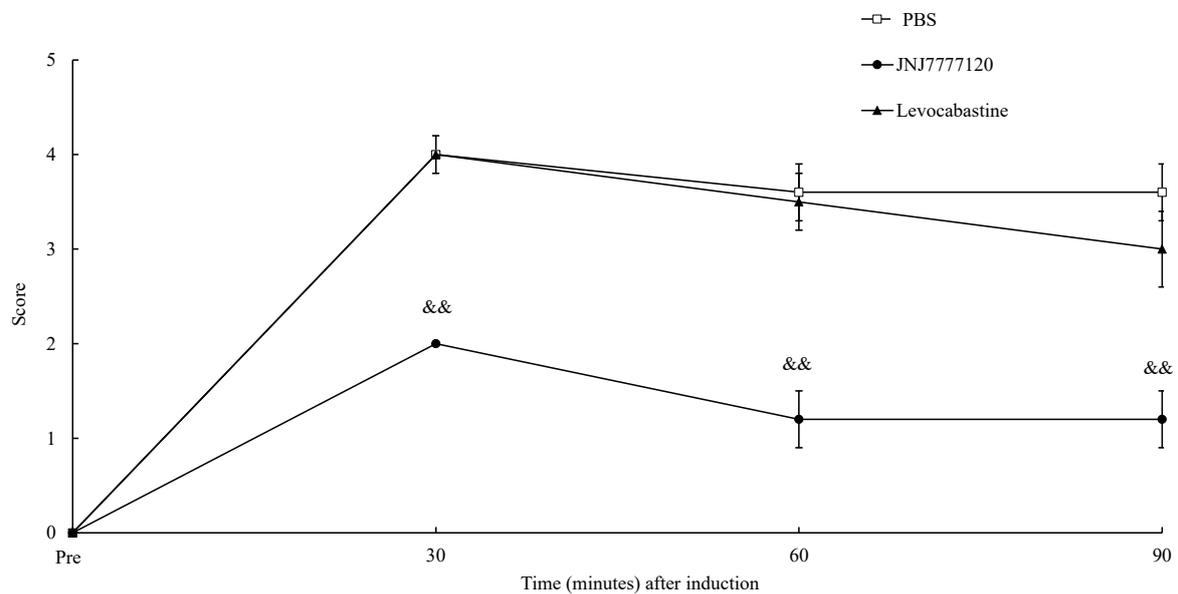


図 8 4MeHA 誘発モデルにおける対照群，JNJ777120 群及びレボカバスチン群の結膜炎スコアの比較（McDonald- Shaddock の基準）

4MeHA の点眼前（PBS，JNJ777120 またはレボカバスチンの投与後），点眼後 30 分，60 及び 90 分に結膜及び虹彩の状態を観察し，McDonald- Shaddock の基準に従って判定した結膜炎スコアの推移を示した。

値は各群の平均値±標準誤差で示した。対照群及び JNJ777120 群は N = 10（動物数 5 匹の両眼），レボカバスチン群は N = 8（動物数 4 匹の両眼）の平均値であり，&&は Wilcoxon の順位和検定において P < 0.01 であったことを示す。

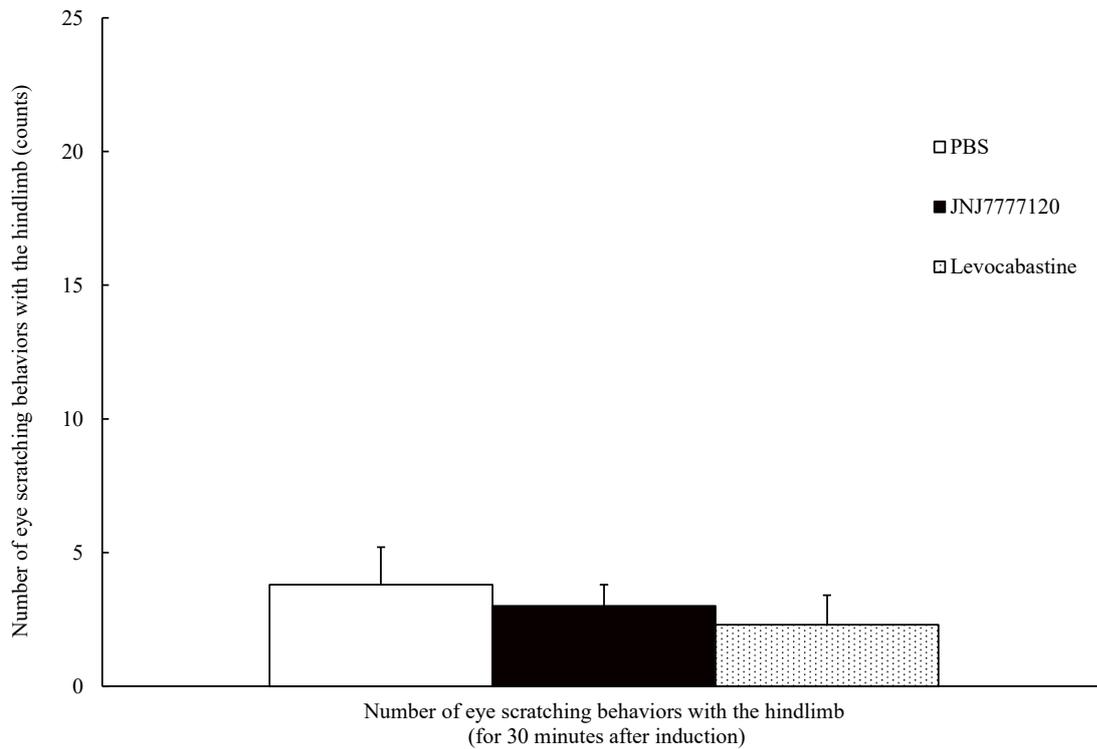


図 9 4MeHA 誘発モデルにおける対照群，JNJ777120 群及びレボカバスタチン群の眼部引っ掻き行動回数比較

4MeHA 点眼後，30 分間の後肢の眼部に対する引っ掻き回数をカウントした結果を示した。連続した引っ掻き動作は 1 回として評価した。値は各群の平均値±標準誤差（対照群及び JNJ777120 群は N = 5，レボカバスタチン群は N = 4）で示した。

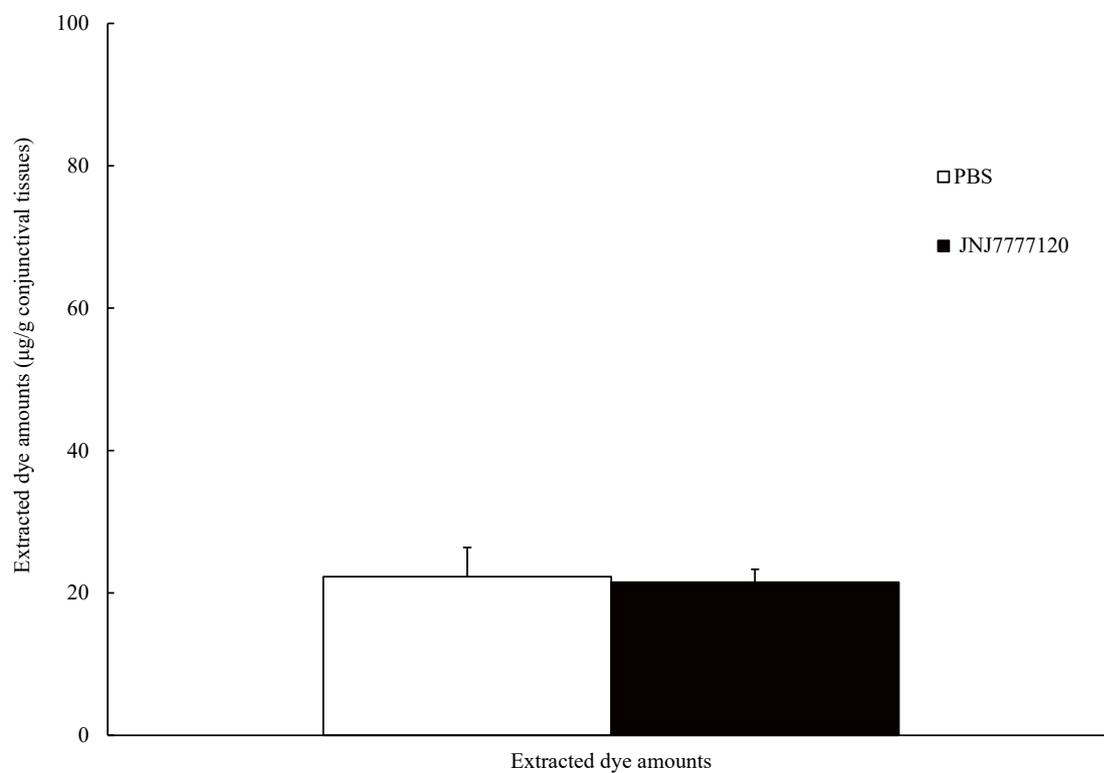


図 10 4MeHA 誘発モデルにおける対照群及び JNJ7777120 群の結膜中の色素漏出量の比較

4MeHA 点眼の 30 分後の結膜組織中のエバンスブルーの色素量を示した。結膜抽出液の吸光度から結膜組織 1 g あたりの色素量として算出した。

値は各群の平均値±標準誤差 (N = 3) で示した。