

博士論文

マイボーム腺の腺分泌機能を保持した三次元培養モデルの作成と
ウサギマイボーム腺への薬物移行に関する研究

平成 29 年度

浅野 長祥

目次

| | |
|--|----|
| 略語一覧 | 3 |
| 序論 | 4 |
| 第1章 マイボーム腺細胞における三次元培養モデルの作成 | 8 |
| 第1節 緒言 | 8 |
| 第2節 実験方法 | 11 |
| 第3節 結果 | 14 |
| 1.3.1 メンブレンフィルターを用いた三次元培養条件の検討 | 14 |
| 1.3.2 三次元培養時の細胞外マトリックス選択 | 17 |
| 1.3.3 多孔性スキャフォールド(Alvetex [®])を用いた三次元培養 -サイトケラチン発現量の変化- | 18 |
| 1.3.4 多孔性スキャフォールド(Alvetex [®])を用いた三次元培養 -分化誘導時のサイトケラチン発現量の変化- | 21 |
| 1.3.5 多孔性スキャフォールド(Alvetex [®])を用いた三次元培養 -脂肪滴の発現量変化- | 22 |
| 1.3.6 多孔性スキャフォールド(Alvetex [®])を用いた三次元培養 -電子顕微鏡観察- | 24 |
| 1.3.7 ハンギングドロップ法による三次元培養 -電子顕微鏡観察- | 27 |
| 第4節 考察 | 29 |
| 第2章 マイボーム腺への点眼時薬物移行性の検証 | 32 |
| 第1節 緒言 | 32 |
| 第2節 実験方法 | 33 |
| 第3節 結果 | 42 |
| 2.3.1 ウサギマイボーム腺採取法の開発 | 42 |
| 2.3.2 SA22465 懸濁液単回点眼後の眼瞼結膜上皮、マイボーム腺開口部、マイボーム腺中 SA22465 および SA22313 濃度の測定 | 43 |
| 2.3.3 リン酸ベタメタゾン水溶液単回点眼後の眼瞼結膜上皮、マイボーム腺開口部、マイボーム腺中ベタメタゾン濃度の測定 | 45 |
| 2.3.4 3% ¹⁴ C-SA22465 懸濁液点眼後の眼球および眼瞼オートラジオグラフィー | 46 |
| 2.3.5 3% ¹⁴ C-SA22465 懸濁液点眼後の眼球および眼瞼マイクロオートラジオグラフィー | 48 |
| 第4節 考察 | 50 |
| 第3章 アジスロマイシン点眼時のマイボーム腺への移行性評価 | 54 |
| 第1節 緒言 | 54 |
| 第2節 実験方法 | 55 |
| 第3節 結果 | 60 |
| 3.3.1 アジスロマイシン水溶液(AzaSite [®])点眼後の眼瞼結膜、眼瞼結膜上皮、マイボーム腺開口部、マイボーム腺中アジスロマイシン濃度の測定 | 60 |
| 3.3.2 アジスロマイシン水溶液(AzaSite [®])点眼後の角膜および眼瞼中薬物の MS イメージング | 61 |
| 第4節 考察 | 62 |
| 総括 | 65 |
| 本論文内容の誌上発表 | 68 |
| 謝辞 | 69 |
| 引用文献 | 70 |

略語一覽

| | |
|-------------------|--|
| Air-lift | Air-liquid interface culture |
| BMV | Bioanalytical method validation |
| BPE | Bovine pituitary extract |
| CK | Cytokeratin |
| C_{\max} | Maximum drug concentration |
| DESI | Desorption electrospray ionization |
| DMEM/F-12 | Dulbecco's modified Eagle's medium-nutrient mixture F-12 |
| EGF | Epidermal growth factor |
| EMT | Epithelial-mesenchymal transition |
| FDA | Food and Drug Administration |
| HMGEC | Human meibomian gland epithelial cell |
| hTERT | human telomerase reverse transcriptase |
| IL-1 β | Interleukin-1 β |
| IMS | Ionmobility spectrometry |
| KSFM | Keratinocyte serum-free medium |
| LC-MS/MS | Liquid chromatography tandem-mass spectrometry |
| MALDI | Matrix-assisted laser desorption ionization |
| MIC ₉₀ | Minimum inhibitory concentration 90 |
| MGD | Meibomian gland dysfunction |
| MMP-9 | Matrix metalloproteinase-9 |
| MS | Mass spectrometry |
| OCT | Optical coherence tomography |
| PBS | Phosphate buffered saline |
| SEGRA | Selective glucocorticoid receptor agonist |
| TBST | Tris buffered saline with Tween 20 |
| TFOS | Tear Film & Ocular Surface Society |
| TGF- β 1 | Transforming growth factor- β 1 |
| T_{\max} | Time to maximum drug concentration |
| $t_{1/2}$ | elimination half-life |

序論

知覚機能を通じて外界から得られる情報量のうち、視覚は全体の約 83%と言われており、視覚情報がいかに日常生活に重要かを物語っていると同時に、眼は五感の中でも最も重要な感覚器官と言える。その眼を外部から守る最前線が涙であり眼表面の健康維持に不可欠である。涙は油層、水層、ムチン層の 3 層で構成されており、その 90%以上を水層が占めている (Figure 1-1)。

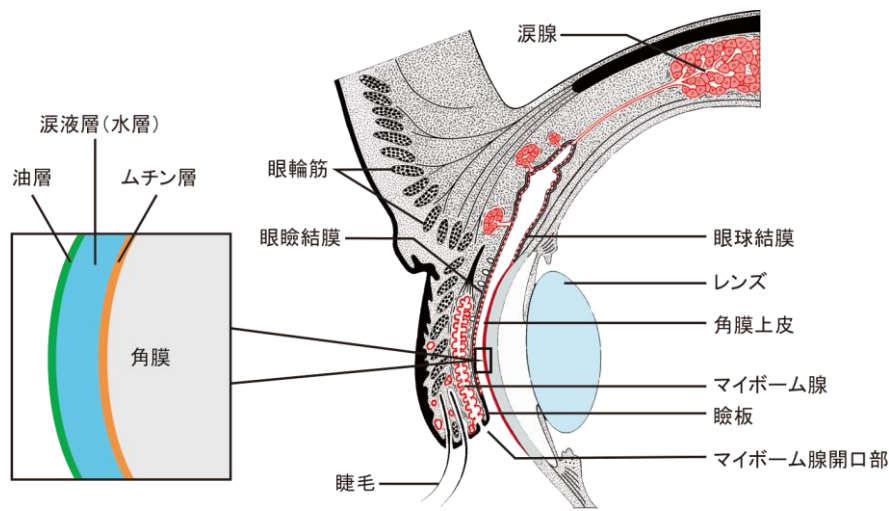


Figure 1-1. Schematic diagram of the eyelid structure.

水層には、眼球を潤すだけでなく、角膜への酸素供給などの役割がある。また水層の外側にある油層は、水分の蒸発を防ぐと共に細菌や花粉などの有機物から眼を保護しており、瞬目および開瞼時に涙液層を引き連れて眼表面に伸展させている。さらに、内側にあるムチン層は眼表面と涙液層を繋ぎ水濡れ性を維持することで、涙全体を眼表面に安定に留めておく役割を担っている。ドライアイは、各成分のバランスが破綻した結果、涙液層の安定性が失われた状態を指すが、涙液減少型と蒸発亢進型に大別する考え方が支配的であり¹⁾、そのうち蒸発亢進型は、ドライアイ全体の 86%を占めるという報告がある²⁾。このような背景から、眼表面への油分の供給を担うマイボーム腺が近年注目されている。マイボーム腺は、上下眼瞼(まぶた)の瞼板中に存在する大きな皮脂腺であり、1本の中央導管とその周囲の多数の腺房から構成される (Figure 1-2)。マイボーム腺は、皮脂腺と同じく全分泌(ホロクリン)腺である。すなわち、マイボーム腺では腺房の基底細胞から分裂した娘細胞が次第に細胞内に脂質を作りながら小葉の内方に向かって移動し、最終的には、細胞全体が崩壊して蓄積された脂質が細胞残渣とともに眼表面へ排出される (Figure 1-2)。マイボーム腺から分泌された脂質(メイバムと呼ばれる)は瞬目を介して涙液層全体へ広がり、涙液の安定性を高め、蒸発の防止に繋がるため、ドライアイ発症防止と関連性が高いと推測されている。

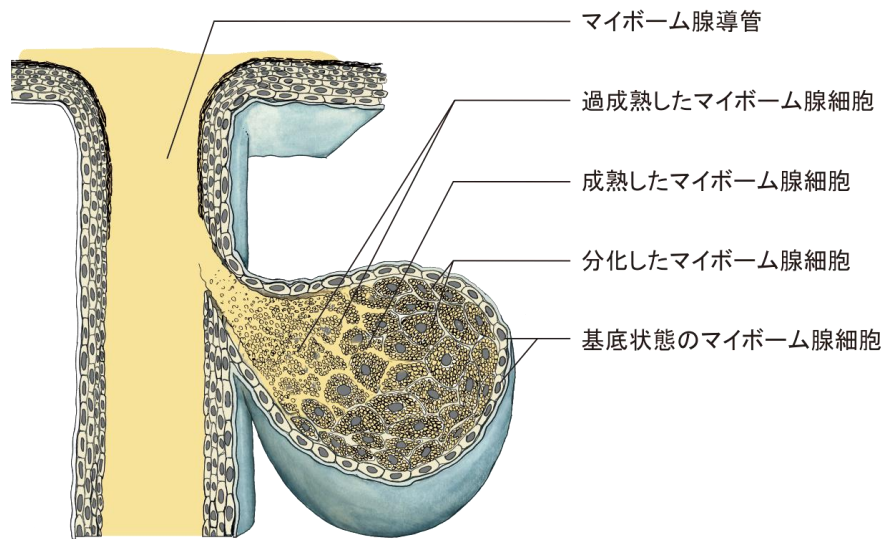


Figure 1-2. Mechanism of meibum secretion.

マイボーム腺機能不全 (Meibomian Gland Dysfunction : MGD) は、1980 年に Korb と Henriquez らによって初めて言及されて以来³⁾、マイボーム腺機能に異常をきたした状態を呼称する際に臨床で使用されている。しかしながら、MGD は臨床的に極めて重要な疾患であるにも関わらず、臨床現場では過小評価されていた。理由の一つとして、MGD の定義、分類、診断、治療等において基準が存在しなかったためと考えられる。そこで、MGD に対する世界的な統一基準の作成に向けて、Tear Film & Ocular Surface Society (TFOS) は、基礎および臨床の世界的な研究者達をメンバーとする MGD Workshop を発足させ 2011 年 3 月に TFOS MGD Report を発行した⁴⁾。TFOS MGD Report において MGD は以下のとおり定義されている。

- MGD は、マイボーム腺の慢性・びまん性の異常で、マイボーム腺導管の閉塞に伴う腺分泌物の質的・量的変化が見られる疾患である
- その結果、涙液層機能の変化、眼不快感、眼表面の著明な炎症及び上皮障害を来す場合もある

こうして MGD の定義、診断、検査法に関する世界的なコンセンサスが醸成され、MGD の臨床的重要性は今後ますます高まると考えられているが確立された根治療法は無い。現在のところ、眼瞼清拭および温罨法おんあんぼう (蒸したタオルで患部を温める治療法) が一般的な MGD 管理法として認識されているが対症療法に過ぎない。また経験的に抗生物質が投与される場合もあるが、臨床的エビデンスは確立していない⁵⁾。その他、プローブ穿刺によるマイボーム導管閉塞の物理的解除⁶⁾、温熱システムによりメイバムの溶解・圧出を補助する改良型温罨法⁷⁾、さらに抗炎症療法⁸⁾などが近年提唱されているが、いずれの治療法も一長一短である。またドライアイの治療薬として本邦で承認されているヒアルロン酸ナトリウム点眼液あるいはジクアホソルナトリウム点眼液は、

いずれも水層あるいはムチン層をターゲットとしており、油層に対する改善効果は見込まれてない。

前述したとおり、MGD に関する臨床学的知見は徐々に蓄積されつつあり、幾つかの臨床所見は新規治療法に関する手掛かりとなりうる。しかしながら、MGD の病態生理の解明および医薬品開発に繋がる基礎研究は大きく遅れており、MGD 治療薬の開発を妨げている。そのため、科学的エビデンスに基づき承認された MGD 治療薬は未だ存在せず、アンメットニーズが高い。

近年、MGD の病因仮説および他覚所見に基づいた疾患モデル動物が複数報告されているが⁹⁾¹⁰⁾¹¹⁾¹²⁾、病態メカニズムの正確な理解および効率的な薬物スクリーニングには、優れた *in vitro* 実験系が不可欠であり、*in vitro* および *in vivo* 両方法を相互補完的に活用することが望ましい。現在のところ、マイボーム導管上皮の過剰角化、角化細胞のデブリ蓄積およびメイバム粘度の上昇等によるマイボーム腺中央導管の閉塞が MGD の特徴的な変化として認められており、共通する上流の要因として脂質の質的あるいは量的な変化が挙げられている (Figure 1-3)。しかしながら、MGD の本質的な病巣部は未だ明らかではなく、具体的な標的細胞も特定されていない。例えば、メイバムの排出口であるマイボーム腺開口部付近、長い中央導管、あるいは分泌腺房 (腺房細胞) など、いずれに病因があるか、また寄与度も不明である。一般的に、薬物の治療効果および副作用に組織中濃度は深く関与しており、MGD 治療薬の開発成功確度を高めるためには、適切な薬物を標的細胞へ選択的に届けることが重要である。したがって、MGD 病態メカニズムに基づく標的部位の特定は、MGD 治療薬開発における喫緊の課題である。なかでも、腺分泌はマイボーム腺の最も基本的な生理機能であるため、腺房細胞の機能障害は根本的かつ重大な問題となる可能性が高い。ところが、*in vivo* では分泌直後のメイバムを単離することは不可能に近いと、病巣部としての仮説検証には *in vitro* 実験系が不可欠である。しかしながら、マイボーム腺の腺分泌を再現出来る *in vitro* モデルは未だ確立されておらず、腺分泌の制御メカニズムや脂質の合成経路なども完全に解明されていない。

さらに、マイボーム腺への薬物動態評価系が未だ存在しないため、利用可能な薬物動態情報は皆無である。特に、マイボーム腺は中央導管を介して後部眼瞼縁 (グレイラインの後方、辺縁粘膜および結膜皮膚移行部を含む眼瞼縁) に開口しているため、薬物を点眼した時には比較的高い曝露を受けている可能性があるが、マイボーム腺自体はコラーゲン様の線維性結合組織で出来た瞼板という特殊構造に囲まれており¹³⁾、解剖学的にも特殊化した皮脂腺であるため、マイボーム腺における薬物動態プロファイルは想像の域を出ない。したがって、マイボーム腺における薬物動態評価系の欠落は、スクリーニング化合物の移行性に関する客観的な指標が無いばかりか、PK-PD 解析などを介して作用標的部位を絞り込むことも出来ないため MGD 治療薬の開発において致命的であると言える。

そこで本研究では、こうした MGD 治療薬の開発における主要なボトルネックを解消し、点眼剤など眼科用剤の開発に結び付く有益な知見を得るため、より生体環境に近い *in vitro* 三次元培養

系を活用した腺分泌モデルの基盤構築および *in vivo* ウサギマイボーム腺における薬物移行評価系の確立、さらに点眼時の薬物移行性の評価に取り組んだ。

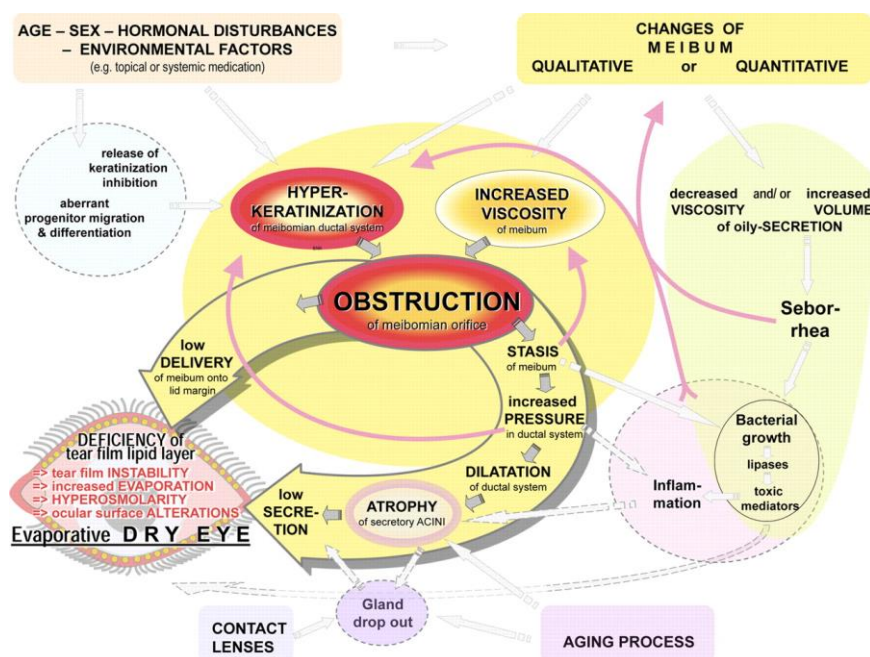


Figure 1-3. Pathophysiology of obstructive MGD.

(出典: Nichols KK *et al.*, Invest. Ophthalmol. Vis. Sci., 52, p. 1924, 2011⁴⁾ より引用)

第 1 章では、MGD 病態メカニズムの解明—特に腺分泌の関与を明らかにする *in vitro* 実験系の作成に向けて、ヒト由来不死化マイボーム腺細胞を用いて、腺分泌機能を保持した簡便な三次元培養モデルを作成した。

第 2 章では、薬物動態評価に先立ち、ウサギマイボーム腺の採取法を新規開発した。また MGD 治療選択肢の一つであるステロイド化合物を念頭に、マイボーム腺における薬物濃度推移およびマイボーム腺中央導管を介した薬物移行の可能性について評価した。

さらに第 3 章では、MGD 治療にオフラベルユースとして汎用されているアジスロマイシン点眼液に焦点を移し、マイボーム腺へのアジスロマイシン移行量および移行経路を MS イメージング等にて検討し、評価系としての有用性も併せて検証した。

以上、本研究によって、MGD の本質的な病巣部を絞り込むとともに、治療薬開発の成功確度向上へ繋がるマイボーム腺への薬物移行特性を明らかにしたので、以下に詳述する。

第1章 マイボーム腺細胞における三次元培養モデルの作成

第1節 緒言

効率的な薬剤スクリーニングおよびMGDの病態メカニズムの正確な理解には、優れた *in vitro* 実験系の構築が不可欠である。マイボーム腺は、皮脂腺と同じく全分泌腺であるため、最終的にはアポトーシスにより自己崩壊し、貯留した細胞内脂質をメイバムとして放出する。したがって、マイボーム腺細胞の初代培養系は長期間生存が難しく、実験的にも限界がある。一方、ヒト由来不死化マイボーム腺上皮細胞 (Human Meibomian Gland Epithelial Cell: HMGEC) は、分離したヒトマイボーム腺上皮細胞に hTERT (human telomerase reverse transcriptase) を導入した細胞株であり、長期間培養が可能であるほか形態の維持も確認されている。また脂質プロファイルとしてワックスエステル、コレステロールエステル、モノグリセリド、ジグリセリド、トリグリセリド、コレステロール等が検出されている。さらに、皮脂腺上皮細胞やマイボーム腺組織で検出されている脂質関連・ケラチン関連・プロテアーゼ関連の遺伝子発現が確認され、アンドロゲンに対する脂質関連遺伝子の発現変化も認められたことにより、マイボーム腺細胞としての性質を有していると考えられている¹⁴⁾。特に、不死化細胞は初代培養系とは異なり、培養維持が容易であり大量培養できるという利点があるため、マイボーム腺の生理機能を解明するツールとして使用されている¹⁵⁾。これまでに、培養条件¹⁶⁾¹⁷⁾、神経伝達物質¹⁸⁾、成長因子¹⁹⁾²⁰⁾、性ホルモン²¹⁾²²⁾ および薬剤処理²³⁾に関する影響が研究されてきたが、いずれも古典的な二次元単層培養法により検討されており、全容解明には至っていない。一方、制御された *in vitro* 実験環境下における三次元培養技術は進歩を遂げ、二次元の単層培養と比較して、細胞-細胞あるいは細胞-細胞外マトリクスの相互作用、上皮極性の形成、高度な細胞分化等、生体に近い微小環境を長期間再現することが可能であるため、複雑な生理機能の解析に有用である。そのため、三次元培養技術は、二次元の単層培養と生体組織との溝を埋めるための実験法として活用が期待されている²⁴⁾。

近年、皮脂腺上皮細胞を気液界面培養 (Air-liquid interface culture = Air-lift 培養) した報告が発表されたが²⁵⁾、興味深いことに、これら三次元培養された皮脂腺上皮細胞は自発的に分化し、重層化した皮脂腺細胞では脂肪滴が増加していた。さらに脂肪滴は表層に限局しており、併せて脂質合成関連遺伝子の発現増加も確認されたため、三次元培養された皮脂腺上皮細胞は、*in vivo* に近い全分泌過程を再現している可能性がある。一般に、マイボーム腺は特殊化した皮脂腺と考えられており、両者には幾つかの共通点も知られている。特に、マイボーム腺 (腺房) および皮脂腺は腺上皮細胞に分類されるものの、両者とも発生学的に表皮の陥入を起源としているため、マイボーム腺上皮細胞 (meibocyte) においても Air-lift 三次元培養時に重層化することは十分想定される。さらに、*in vivo* におけるマイボーム腺上皮細胞は明らかに増殖・分化しながら腺房中央へ移動するが、これを二次元単層培養で再現することは極めて難しい。一方、Air-lift 三

次元培養は、生体環境に比較的近いと考えられる高酸素濃度を反映していること、および上方に増殖可能な空間が広がるため、基底状態から過成熟に至るマイボーム腺の全分泌過程を再現できる可能性がある(Figure 1-4)。

そこで本章では、ヒト由来不死化マイボーム腺上皮細胞(HMGEC)を用いて、簡便かつ妥当な三次元培養法の構築および腺分泌過程の細胞分化・成熟に焦点を当て、培養条件の最適化、さらに三次元培養に伴うタンパク質発現分布、脂質分泌能の変化および形態学的特徴について解析した。また同時にハンギングドロップ法を用いたスフェロイド三次元培養に伴う形態学的変化も評価した(Figure 1-5)。

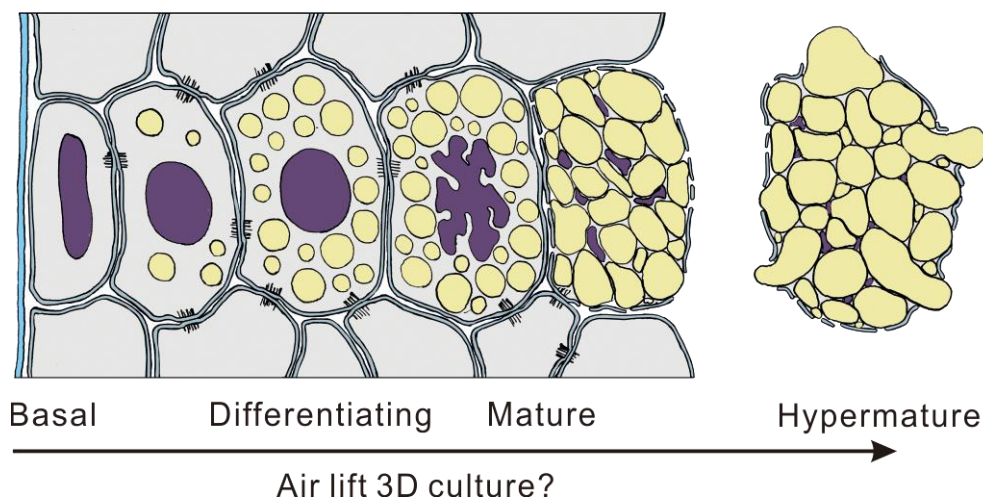
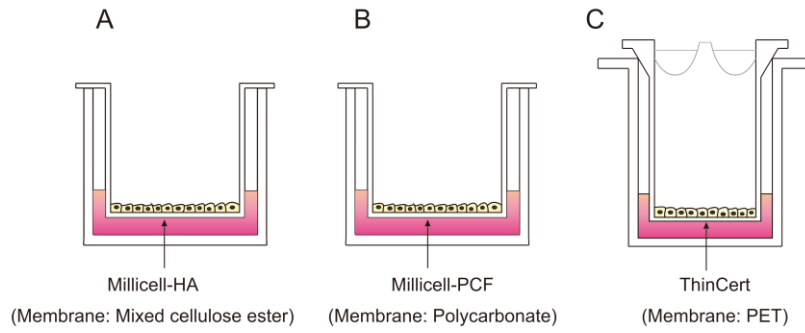
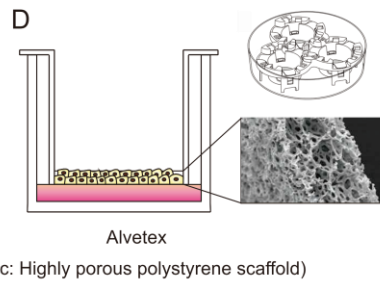


Figure 1-4. Schematic diagram of the meibocyte differentiation and maturation process *in vivo*.

Membrane-based 3D culture



Highly porous scaffold-based 3D culture



Hanging drop

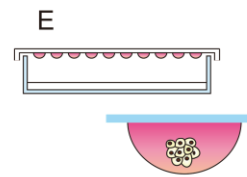


Figure 1-5. Three-dimensional culture models using HMGECs.

第2節 実験方法

細胞培養

細胞培養関連試薬

ヒト由来不死化マイボーム腺上皮細胞 (Human Meibomian Gland Epithelial Cells: HMGEC) は Harvard 大学医学部スケペンス眼研究所 Dr. Sullivan より供与された。ウシ胎児血清 (FCS)、は Biochrom AG (Berlin, Germany) から購入した。Keratinocyte Serum-free medium (KSFM) および Dulbecco's modified Eagle's medium-nutrient mixture F-12 (DMEM/F-12)、その他細胞培養に用いた試薬は、Gibco Life Technologies (Darmstadt, Germany) から購入した。上記以外の試薬は市販の特級品を用いた。

細胞培養

HMGEC の維持および継代には、通常培地 Keratinocyte serum-free medium (KSFM) (5 ng/mL Epidermal growth factor (EGF) および 50 ng/mL Bovine pituitary extract (BPE) 含有) を用いた。また HMGEC の細胞分裂を遅延させるが、アポトーシスおよび脂質合成を活性化することが報告されている Dulbecco's modified Eagle's medium + Ham's F12 (DMEM/F12) (10 ng/mL EGF、10% FCS 含有) を分化誘導培地として必要に応じて置換した。

メンブレンフィルターを細胞増殖の足場等に用いた三次元培養条件の検討

三次元培養

HMGEC は、Millicell-HA[®] (pore size: 0.45 μ m, diameter 12 mm, Millipore Corp., Billerica, MA, USA)、Millicell-PCF[®] (pore size: 0.4 μ m, diameter 12 mm, Millipore Corp.) および ThinCert[™] (pore size: 0.4 μ m, diameter 10.4 mm, Greiner Bio-one, Frickenhausen, Germany) に、 2×10^5 cells/cm² で播種した後、通常培地で 1 週間培養した。気液界面培養では、頂端膜側 (apical 側) の培地を吸引除去した後、最長 4 週間培養した。培養は、加湿された 5% CO₂/air、37°C で行い、培養液は 2 日毎に交換した。

細胞外マトリックスアレイ

製品添付の実験プロトコルに従った。 5×10^4 cells/mL へ調整した HMGEC 細胞懸濁液 5 mL を Micromatrix[™] 36 cell culture slide (Microstem Inc., San Diego, CA, USA) へ添加して播種した。36 時間培養した後、通常培地で洗浄して浮遊細胞を除去した。4% パラホルムアルデヒドで固定した後、位相差顕微鏡観察により細胞接着の程度をスコアリングした。(0: 細胞接着が認められない、3: 細胞接着が均一かつコロニーの形成が認められる)

多孔性スキャフォールド(Alvetex[®])を細胞増殖の足場等に用いた三次元培養の検討

三次元培養

製品添付の実験プロトコルに従った。Alvetex[®]インサート(Alvetex 12-well insert、Amsbio, Abingdon, UK)を70%エタノールで活性化させた後、通常培地で洗浄した。Alvetex[®]インサートを6-well plateへ移した後、 1×10^7 cells/mLへ調整したHMGE C細胞懸濁液50 μ Lをインサートへ添加して播種した。Alvetex[®]スキャフォールド内部への細胞遊走および十分な接着を促すため1時間培養した後、10 mLの通常培地を加えて1週間培養した。気液界面培養は、Alvetex[®]インサートをdeep petri dish(Well insert holder in a deep petri dish, Amsbio, Abingdon, UK)へ移した後、34 mLの通常培地を加えることで達成し(Alvetex[®]インサートの基底膜側(basal側)のみ培地が浸漬する)、最長5週間培養した。培養は、加湿された5% CO₂/air、37°Cで行い、培養液は2日毎に交換した。

免疫細胞化学

試料採取時間(気液界面培養直前および1、2、3および4週間後)にAlvetex[®]インサートをPhosphate buffered saline(PBS)で洗浄した後、4%パラホルムアルデヒドで固定した(室温、20分間)。PBSで3回洗浄した後、手術用メスを用いてAlvetex[®]スキャフォールドを摘出した。Alvetex[®]スキャフォールドを半割し、OCT Compoundに馴染ませた後、クリオスタット(Leica CM3050 S; Leica Microsystems, Wetzlar, Germany)(設定温度:-18°C)庫内に包埋皿ごと静置して凍結ブロックを作成した。凍結ブロックを凍結試料台に固定した後、10 μ m厚の連続凍結切片を作成し、ポリリジンコート済みのスライドガラス上に転写した。作成した薄切切片は使用まで-20°Cにて冷凍保存した。

薄切切片を室温に戻した後、PBSで3回洗浄した(各5分間)。20%血清含有PBS(二次抗体作製動物種由来の血清)でインキュベート(室温、2時間)した後、一次抗体(2%BSA、0.2%Triton-X 100含有PBSで希釈)で湿潤箱内にて反応させた(4°C、Overnight)。翌日、Tris buffered saline with Tween 20(TBST)で3回洗浄した(各5分間)後、二次抗体(20%血清含有PBSで希釈)で反応させた(室温、30分間)。TBSTで3回洗浄した(各5分間)後、AEC基質にて約5分間反応させた。適宜染色状態を確認しながら、蒸留水で3回洗浄して呈色反応を停止させた。ヘマトキシリン・エオジン染色した後、Aquatex[®]を滴下して封入した。なお陽性対照にはヒト眼瞼検体を使用した。一方、陰性対照は一次抗体のみ、および二次抗体のみ対照試料を作成した。全ての標本をオールインワン蛍光顕微鏡下(BZ-9000; Keyence, Osaka, Japan)、明視野にて観察した。

脂肪染色(スダン III 染色)

薄切切片を室温に戻した後、蒸留水を滴下した。ヘマトキシリン・エオジン染色した後、蒸留水で 10 分間洗浄した。50%エタノール溶液へ 30 秒間浸漬した後、スダン III 染色液(Merck Millipore, Darmstadt, Germany)で 15 分間染色した。50%エタノール溶液で 30 秒間洗浄した後、Aquatex[®]を滴下して封入した。全ての標本をオールインワン蛍光顕微鏡下、明視野にて観察した。

電子顕微鏡観察

試料採取時間(気液界面培養直前および 1、3、5 週間後)に Alvetex[®]インサートを PBS で洗浄した後、電子顕微鏡用固定液(pH 7.3、2.5%グルタルアルデヒド、2.5%パラホルムアルデヒド、0.3%ピクリン酸含有 PBS)で固定した(室温、1 時間)。PBS で 3 回洗浄した(各 10 分間)後、PBS に浸漬させて一昼夜静置した(室温、Overnight)。手術用メスを用いて Alvetex[®]スキャフォールドを摘出した後、1%四酸化オスミウムで後固定した(室温、30 分間)。PBS で 3 回洗浄した(各 10 分間)後、PBS に浸漬させて一昼夜静置した(室温、Overnight)。エタノール溶液で段階的に脱水した後、エポン樹脂へ包埋した。樹脂ブロックをウルトラミクロトーム(Ultracut E; Reichert Jung, Vienna, Austria)に設置した後、1 μm 厚で準超薄切片を作成した。トルイジンブルー染色した後、落射蛍光顕微鏡下(Aristoplan; Ernst Leitz, Wetzlar, Germany)にて目的部位が準超薄切片に含まれるか確認した。超薄切片(50 nm 厚)は酢酸ウラニルおよびクエン酸鉛で染色した後、透過型電子顕微鏡下(EM109, Carl Zeiss Mdrtec GmbH, Oberkochen, Germany)にて観察した。

ハンギングドロップ法による三次元培養の検討

三次元培養

HMGEc は通常培養した後、 5×10^5 cells/mL へ調整した HMGEc 細胞懸濁液 20 μL を細胞培養ディッシュの上蓋内側へ約 50 箇所滴下して播種した。慎重に上蓋を裏返した後、予め PBS を添加した細胞培養ディッシュへ戻した。液滴状の細胞培養は、加湿された 5% CO_2/air 、 37°C で行った。

電子顕微鏡観察

試料採取時間(培養後 16 および 48 時間後)に、0.1%ゼラチンコートされた新しい細胞培養ディッシュ上にて、通常培地を用いて細胞凝集塊を洗浄した後、電子顕微鏡用固定液で固定した(室温、1 時間)。以降の実験操作は、「多孔性スキャフォールド(Alvetex[®])を細胞増殖の足場等に用いた三次元培養の検討: 電子顕微鏡観察」にて前述した方法と同じである。

第3節 結果

1.3.1 メンブランフィルターを用いた三次元培養条件の検討

HMGEC の三次元培養に最適なメンブランフィルターを選択するために、3種類の異なるメンブランフィルター (Millicell-HA[®]: セルロース混合エステル素材、Millicell-PCF[®]: ポリカーボネート素材および ThinCert[™]: ポリエチレンテレフタレート素材) を用いて Air-lift 培養後の重層化度を比較した。その結果、Millicell-HA[®]、Millicell-PCF[®] 上に培養した HMGEC はメンブランフィルターへの親和性が低かったため、パラフィン包埋過程において高い確率で細胞層が剥がれた。一方、ThinCert[™] 上に培養した HMGEC はメンブランフィルターへの親和性が比較的高かったため、パラフィン包埋切片の形態観察においても細胞層が観察され、Air-lift 培養後の HMGEC は 6 層~7 層重層化していた (Figure 1-6)。

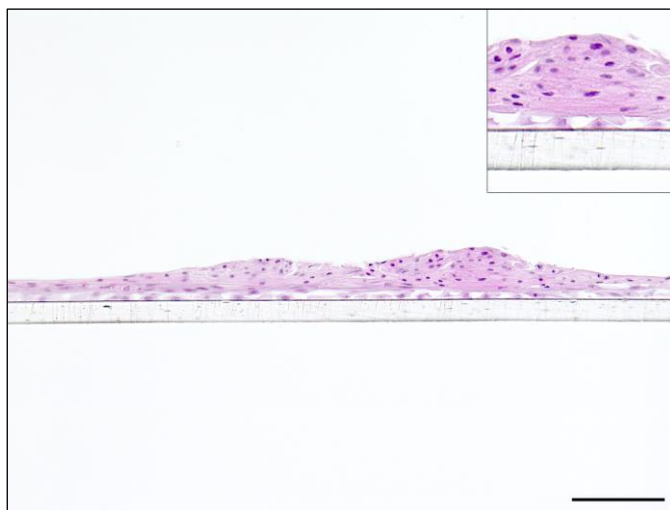


Figure 1-6. Vertical histological section through multi-layered HMGECs on ThinCert[™] after air-lift.

HMGECs were exposed to air (day 0) and cultured for further 10 days at the air-liquid interface. The cells were fixed with 4% PFA, following embedded in paraffin and the vertical sections were stained with hematoxylin and eosin. Scale bar: 100 μ m

続いて、ThinCert™を用いた HMGEC の三次元培養に最適な培養条件を検討するために、頂端膜側 (apical 側) および基底膜側 (basal 側) の培養液 (通常培地あるいは分化誘導培地) の組み合わせ、および Air-lift の有無による細胞増殖および重層化の様子を光学顕微鏡下にて経時的に観察した。その結果、basal 側に通常培地を使用した Air-lift 培養条件において、培養後 24 時間では部分的に細胞が上方へ盛り上がった様子が観察された。さらに、培養期間に伴い盛り上がった細胞の山は互いに繋がり合い、最終的に高い輝度を持つ山脈のような形態が観察された (Figure 1-7:A および E)。一方、apical および basal 両側に通常培地を用いた培養条件において、培養後 24 時間では細胞形態の変化は認められなかったが、培養後 4 週間では、細胞境界が不明瞭であり、紡錘状の細胞も認められたため上皮間葉転移 (Epithelial-Mesenchymal Transition: EMT) を起こしている可能性が示唆された (Figure 1-7:B および F)。また、basal 側に分化誘導培地を使用した Air-lift 培養条件において、培養後 24 時間では、細胞が上方へ盛り上がった様子が観察されたが、培養後 4 週間では、細胞境界が消失していた (Figure 1-7:C および G)。一方、apical 側に通常培地、basal 側に分化誘導培地を使用した培養条件において、培養後 24 時間では既に細胞形態像が全体的に不鮮明であり、培養後 4 週間では細胞の凝集塊や死細胞が認められた (Figure 1-7:D および H)。したがって、HMGEC の重層化には ThinCert™を用いて basal 側に通常培地を使用した Air-lift 培養条件が最適であった。

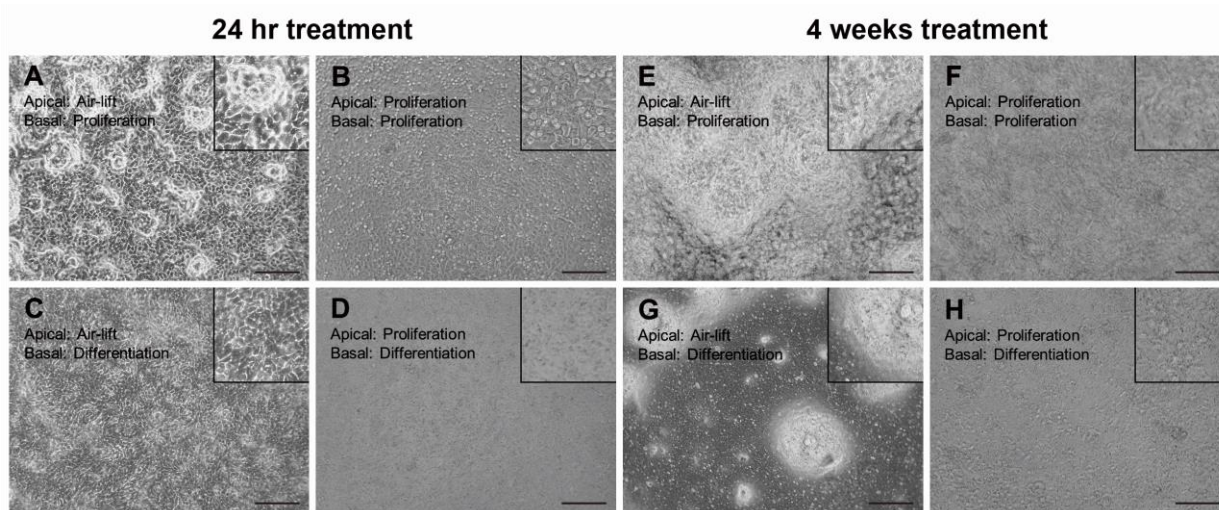


Figure 1-7. Microscopical top view on HMGECs cultured for different times and under different culture conditions on ThinCert™.

HMGECs were cultured on ThinCert™ until confluent. Growth characteristics and differentiation process were observed under the phase contrast microscope after 24 hours culture under air-lift where proliferation medium was supplied to the basal chamber only (A), in sub-merged condition with proliferation medium (B), under air-lift where differentiation medium was supplied to basal chamber only (C), in combination with proliferation medium in the apical chamber and differentiation medium in the basal chamber (D), and after 4 weeks culture of each corresponding condition (E-H). Scale bar: 200 μ m

また三次元培養は、従来の二次元単層培養と比較して多くの栄養素を必要とすることから、メンブランフィルター単位面積当たりの使用培地量を増加させ、細胞増殖および重層化への影響

を光学顕微鏡下にて経時的に観察した(Figure 1-8)。その結果、24-well insertを6-well plateで培養した条件において、盛り上がった細胞の山は最も顕著に観察され、重層化が示唆された(Figure 1-8:F)。しかしながら、培養期間に伴い細胞増殖および重層化の差は少なくなり、培養4週間後においては顕著な差は認められなかった。

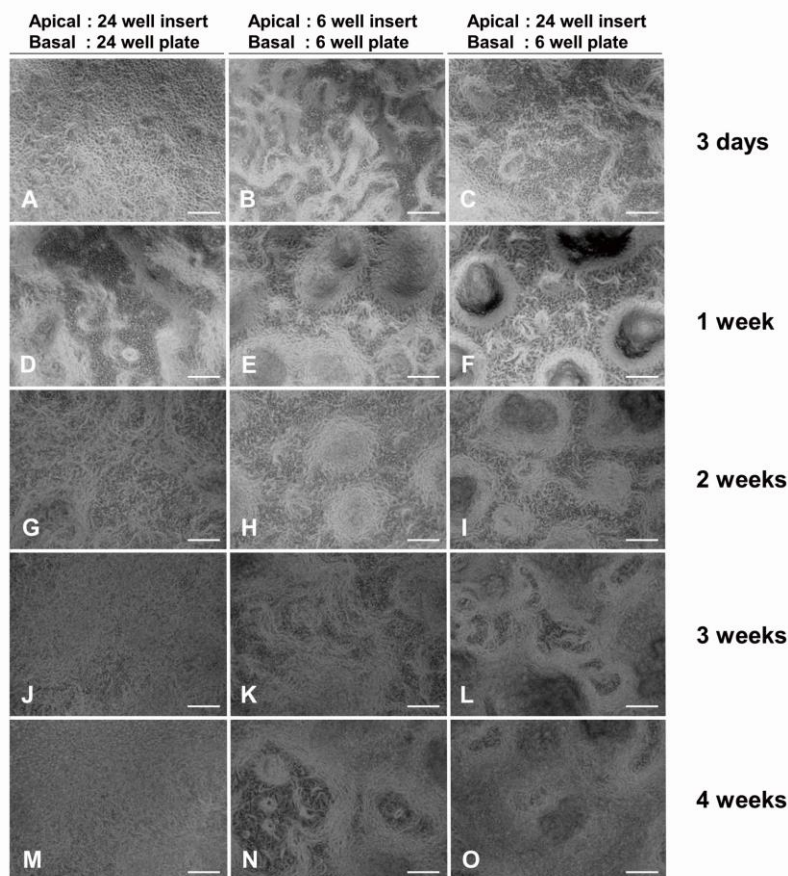


Figure 1-8. Microscopical view on 3D cultures of HMGECs in differently sized well plates after different cultivation periods.

HMGECs were cultivated on ThinCert™ membranes in submerged condition with air-lift in proliferation medium for up to 4 weeks. Influence of access to nutrition by insert size was tested on 24-well inserts that were placed in a single well of a 24-well plate each (A, D, G, J, M, left column), on 6-well inserts that were placed in a single well of a 6-well plate each (B, E, H, K, N, middle column) or on 24-well inserts that were placed in a single well of a 6-well plate (C, F, I, L, O, right column). The combination of bigger well size with smaller insert size improved the stratification outcome. Thus, best results were obtained when 24-well inserts were placed in 6-well plates. The stratification process reached a maximum after 1 week in all three investigated groups with strongest formation of “mountain-like” structures in the 24-in-6-well group (F). Thereafter, the difference decreased over time. After 3 weeks no difference was visible any longer between the 6-in-6-well group (K, N) and the 24-in-6-well group (L, O). Scale bar: 200 μm

1.3.2 三次元培養時の細胞外マトリックス選択

Figure 1-6 および Figure 1-7 に示した通り、HMGEC の三次元培養には ThinCert™を用いて basal 側に通常培地を使用した Air-lift 培養条件が最適であった。しかしながら、ThinCert™を用いた場合でも、パラフィン包埋過程において細胞層が剥離する現象が少なからず認められた。そこで、安定した組織化学実験を行うためには細胞外マトリックスによる基材コーティングが望ましいと考えられたため、種々の細胞外マトリックスに対する HMGEC の細胞接着性を評価した。その結果、Vitronectin、Collagen type IV および VI に対する親和性が高く、同細胞外マトリックスによる基材コーティングが最適であると考えられた (Table 1-1)。

Table 1-1. The HMGECs affinity to various extracellular matrix proteins.

HMGECs were cultured onto ECMP array for 36 hours to allow the sufficient cell attachment. The level of cell-adhesion was analyzed and subjectively graded from 0 (no cell adhesion, in white) to 3 (extensive growth with colony, in red)

| | 1 | 2 | 3 |
|---|--|---|--|
| A | Collagen I (250 µg/ml) | Collagen I (125 µg/ml) Collagen III (125 µg/ml) | Fibronectin (125 µg/ml) Collagen IV (125 µg/ml) |
| B | Collagen III (250 µg/ml) | Collagen I (125 µg/ml) Collagen IV (125 µg/ml) | Fibronectin (125 µg/ml) Collagen VI (125 µg/ml) |
| C | Collagen IV (250 µg/ml) | Collagen I (125 µg/ml) Collagen V (125 µg/ml) | Fibronectin (125 µg/ml) Laminin (125 µg/ml) |
| D | Collagen V (250 µg/ml) | Collagen I (125 µg/ml) Collagen VI (125 µg/ml) | Fibronectin (125 µg/ml) Vitronectin (125 µg/ml) |
| E | Collagen VI (250 µg/ml) | Collagen I (125 µg/ml) Fibronectin (125 µg/ml) | Laminin (125 µg/ml) Collagen IV (125 µg/ml) |
| F | Fibronectin (250 µg/ml) | Collagen I (125 µg/ml) Laminin (125 µg/ml) | Laminin (125 µg/ml) Collagen VI (125 µg/ml) |
| G | Laminin (250 µg/ml) | Collagen I (125 µg/ml) Vitronectin (125 µg/ml) | Vitronectin (125 µg/ml) Collagen IV (125 µg/ml) |
| H | Vitronectin (250 µg/ml) | Collagen I (125 µg/ml) Topoelastin (125 µg/ml) | Vitronectin (125 µg/ml) Collagen VI (125 µg/ml) |
| I | Topoelastin (250 µg/ml) | Laminin (83.3 µg/ml) Fibronectin (83.3 µg/ml) Collagen I (83.3 µg/ml) | Vitronectin (125 µg/ml) Laminin (125 µg/ml) |
| J | Collagen IV (125 µg/ml) Collagen VI (125 µg/ml) | Laminin (83.3 µg/ml) Fibronectin (83.3 µg/ml) Collagen IV (83.3 µg/ml) | Vitronectin (125 µg/ml) Topoelastin (125 µg/ml) |
| K | Collagen III (125 µg/ml) Collagen V (125 µg/ml) | Collagen I (62.5 µg/ml) Collagen IV (62.5 µg/ml) Laminin (62.5 µg/ml) Vitronectin (62.5 µg/ml) | Topoelastin (125 µg/ml) Collagen IV (125 µg/ml) |
| L | Negative control BSA (250 µg/ml) | Collagen I (62.5 µg/ml) Collagen IV (62.5 µg/ml) Laminin (62.5 µg/ml) Fibronectin (62.5 µg/ml) | Topoelastin (125 µg/ml) Collagen VI (125 µg/ml) |

1.3.3 多孔性スキャフォールド(Alvetex[®])を用いた三次元培養 -サイトケラチン発現量の変化-

Figure 1-6 および Figure 1-7 に示した通り、メンブランフィルターを用いた三次元培養では少なくとも細胞外マトリックスによる基材コーティングが必須であるほか、その取扱いには細心の注意が必要と考えられた。しかしながら、探索的に Collagen type I でコーティングした三次元培養においても、重層化した細胞層がメンブランフィルターから剥離する現象が少なからず認められており(data not shown)、依然として組織化学実験上の大きな課題であった。

一方、三次元培養技術には、多孔質スキャフォールド担体の応用、ハイドロゲルを利用した細胞凝集塊の形成、自動回転バイオリアクター、バイオ 3D プリンターによる細胞積層技術など幅広い選択肢がある。Alvetex[®]は 200 µm 厚のポリスチレン製ディスク内に極めて高い空隙率を有している多孔質スキャフォールド担体であり、生態環境に近い立体構造を取ることが可能とされている。本製品は、簡便かつ再現性良く、高機能な細胞が取得できる三次元培養プラットフォームであり、既に表皮角化細胞および線維芽細胞を共培養した三次元皮膚モデルなども報告されている。また Alvetex[®]スキャフォールド内部の上皮細胞は Air-lift 培養時にも極性を維持しており、200 µm という厚みはヒトマイボーム腺の腺房直径と近似しているなど、マイボーム腺上皮細胞を用いた腺分泌再現も十分期待できる。そこで、本製品を使用した三次元培養条件を検討した結果、ThinCert[™]を用いた細胞培養条件と比較して、Alvetex[®]ではスキャフォールドの表面積が大きく、高密度の多細胞層を形成するために約 10 倍の細胞数が必要であったが、細胞外マトリックスによる基材コーティングが不要であり、一旦細胞層が形成されると比較的安定していた。

皮脂腺では、全分泌の段階に応じた特徴的な遺伝子の発現が観察されている。例えば、未分化な皮脂腺上皮細胞ではサイトケラチン 7、および成熟した皮脂腺上皮細胞では Epithelia Membrane Antigen の特異的発現が認められている²⁵⁾。一方、マイボーム腺では、こうした腺分泌過程における特異的なバイオマーカーは確立されておらず細胞内脂肪滴が唯一の分化指標である。しかしながら、ヒトマイボーム腺(腺房、中央導管および開口部付近の粘膜移行部を含む)におけるサイトケラチン(Cytokeratin:CK)発現分布は網羅的に検討されており²⁶⁾²⁷⁾、バイオマーカーとしての活用が模索されているだけでなく、MGD 病態との関連性も指摘されている¹²⁾。したがって、CK 発現量および発現様式を検討することで、Air-lift 培養に伴うマイボーム腺細胞の分化状態や生理応答を多角的に評価することが可能である。特に、CK1、6、8、10 および 14 は、代表的なサイトケラチン分子種であり検討価値が高い(Table 1-2)。

Table 1-2. Characteristics of cytokeratins tested in a long-term 3D culture using Alvetex®.

| CK 分子種 | 特異的マーカーとしての活用例 | ヒトマイボーム腺における発現 ²⁷⁾ | 備考 |
|--------|----------------|-------------------------------|------------------|
| CK1 | 角質化 | なし(眼瞼表皮のみ) | - |
| CK6 | 増殖期の扁平上皮細胞 | 中央導管 | MGD 病態マウスでの発現増加 |
| CK8 | - | 腺房および中央導管 | - |
| CK10 | 角質化 | マイボーム腺開口部付近の中央導管 | CK1 発現様式との関連性が高い |
| CK14 | 基底細胞部 | 腺房および中央導管 | - |

Air-lift 培養に伴う CK の発現変化を経時的に検討した結果、Air-lift 培養 4 週間後においても CK1 の発現は認められなかった(data not shown)。CK1 は眼瞼表皮に豊富に存在するが、ヒトマイボーム腺での発現は認められていないため²⁷⁾、本結果は妥当と考えられた。一方、CK6 は Air-lift 培養直前(0 week)では Alvetex®スキャフォールド内部で一様に観察されたが、Air-lift 培養期間に伴い、空気暴露を受けている apical 側の細胞において強い発現増加を示した。さらに、Air-lift 培養 2~3 週間後にはスフェロイドの自然形成が認められた。同様に、CK8 発現も Air-lift 培養期間に伴い増加したが、basal 側から発現増加が始まり、次第に Alvetex®スキャフォールド内部へ拡大している様子が観察された。また CK10 は Air-lift 培養直前(0 week)では発現が認められなかったものの、Air-lift 培養期間に伴い、apical 側の細胞に発現増加が認められた。CK6 および CK10 は、ヒトマイボーム腺の中央導管に発現確認されている。したがって、CK6 および 10 の発現誘導が apical 側で認められたことは、Air-lift 培養によってマイボーム腺の中央導管に近い微小環境を再現している可能性が示唆された。なお CK14 は扁平上皮細胞の基底部に特徴的な分化マーカーであるため、Air-lift 培養時に減少あるいは basal 側で局所的に発現増強すると仮説を立てていた。しかしながら、CK14 は Air-lift 培養期間に伴い、主に apical 側の細胞に発現増加が認められた(Figure 1-9)。

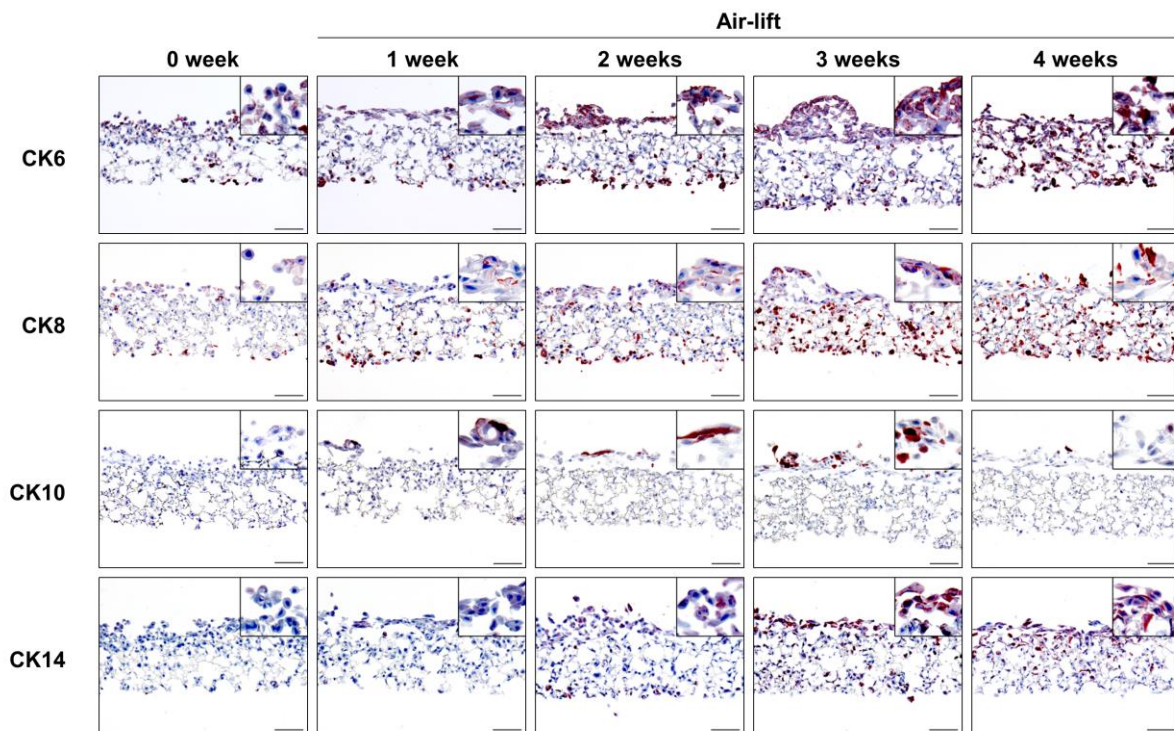


Figure 1-9. Expression patterns of cytokeratin 6, 8, 10 and 14 during long-term 3D culture in Alvetex[®].

HMGECs were cultured at the air-liquid interface and supplied with proliferation medium for up to 4 weeks. The time-course of cytokeratin expression was examined by immunohistochemistry. CK6 and CK8 showed immunoreactivity at week 0 that increased over the culture period until week 4. No CK10 staining was detectable at week 0. From week 1 onwards, CK10 reactivity was visible in the cells on the apical membrane surface. Reactivity intensified up to week 3 and diminished at week 4. Interestingly, CK14 expression showed a time-dependent and continuous increase, especially on the apical surface. All stainings were performed on 4% PFA-fixed cryosections. Scale bar: 100 μ m

1.3.4 多孔性スキャフォールド(Alvetex[®])を用いた三次元培養 -分化誘導時のサイトケラチン発現量の変化-

分化誘導時における CK の発現変化を検討するため、Air-lift 培養 3 週間後、basal 側の通常培地を分化誘導培地へ切り替えた。その結果、apical 側の細胞が球体から扁平な形態へと変化し、単層の上皮細胞層を形成した(Figure 1-10)。Alvetex[®]スキャフォールド内部の細胞も分化誘導前(day 0)は球体状の形態であったが、分化誘導後は多角形の形態が幾つか認められた。CK1 および CK10 は、いずれの状態においても発現は認められなかった。CK6 は分化誘導前(day 0)において細胞質内に強い発現が認められたが、分化促進に伴い、特に apical 側で形成された扁平上皮細胞層に強い発現が認められた。一方、CK14 発現量は分化誘導後にスキャフォールド内部における発現は減少したが、apical 側で形成された扁平上皮細胞層に一様に発現が認められた。

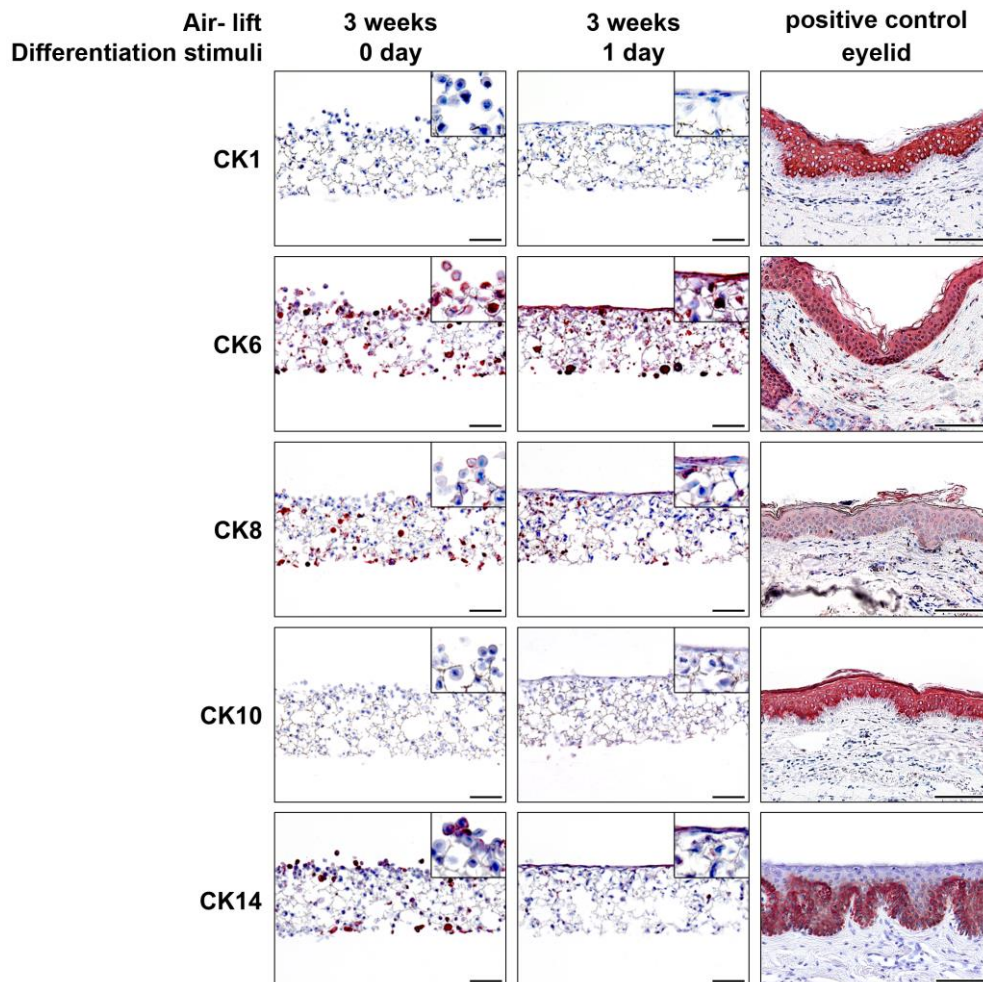


Figure 1-10. Cytokeratin expressions and morphological change in 3D culture following differentiation stimuli.

After 3 weeks of 3D HMGEC culture at the air-liquid interface, the culture medium was replaced into differentiation medium. The cells were then incubated for one further day, maintaining the air-liquid interface. Thereafter, cytokeratin expression was visualized with antibodies against CK1, 6, 8, 10, and 14. Scale bar: 100 μ m

1.3.5 多孔性スキャフォールド(Alvetex[®])を用いた三次元培養 -脂肪滴の発現量変化-

Figure 1-9 に示した通り、HMGEC の三次元培養(Air-lift 培養期間)に伴う CK の発現量および発現様式の変化が認められ、HMGEC の分化あるいは空気暴露環境へ適応した可能性などが示唆された。一方、脂肪滴は腺分泌の状態を把握できる最も重要な指標であり、Barrault らの報告によると、皮脂腺上皮細胞では Air-lift 培養に伴い細胞内脂肪滴が増加したが、表皮細胞では認められなかったため²⁵⁾、腺細胞特異的な応答である可能性が高い。そこで、同培養条件下における細胞内脂肪滴の発現量について検討した。その結果、Air-lift 培養直前(0 week)では Alvetex[®]スキャフォールド内部の細胞において脂肪滴はほとんど認められなかったが、Air-lift 培養期間に伴い細胞内脂肪滴は増加し、Air-lift 培養 3 週間後に最大値を迎えた後、4 週間後ではやや減少した(Figure 1-11)。なお、本実験において使用した Sudan III 染色液は、Alvetex[®]スキャフォールド内の極めて狭い間隙に捕捉される可能性が示唆されたため、Alvetex[®]スキャフォールドのみ(細胞無し)で染色したところ、確かに Alvetex[®]スキャフォールド内の間隙に捕捉されることを確認した(data not shown)。ただし、このトラップは入念な洗浄工程でも取り除けず、非特異的な染色として回避不可能と考えられた。さらに、本現象は Sudan III 特異的ではなく、別の脂質染色液(Sudan black および Oil red)でも認められた(Figure 1-12)。

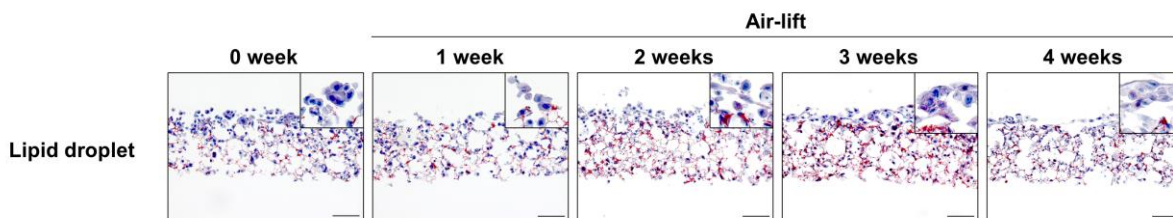


Figure 1-11. Lipid droplet accumulation during long-term 3D culture in Alvetex[®].

HMGECs were cultured at the air-liquid interface, supplied with proliferation medium only for up to 4 weeks. Intracellular lipid droplets were stained by Sudan III (red). 3D culture promoted intracellular lipid accumulation with a peak at 3 weeks. Scale bar: 100 μ m.

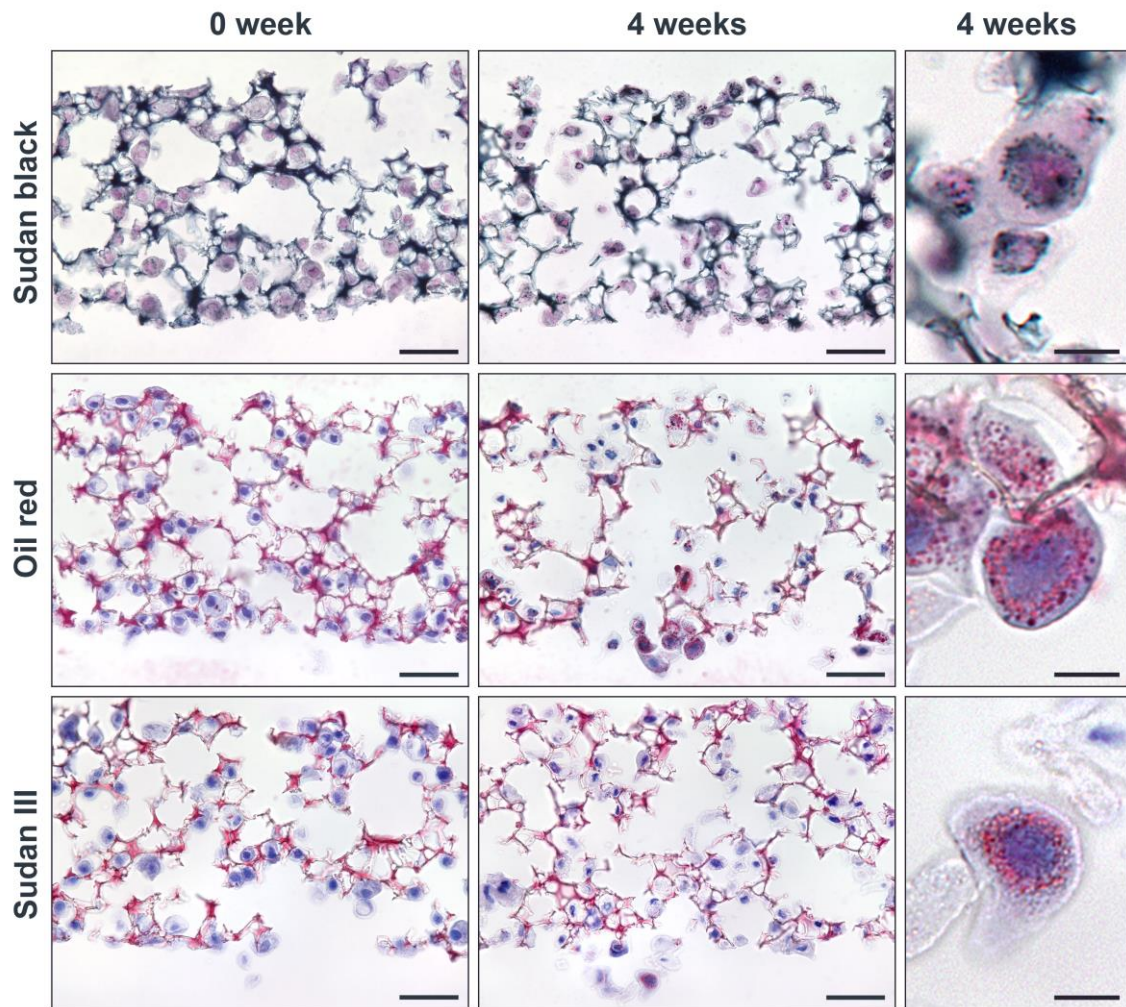


Figure 1-12. Lipid droplet accumulation during long-term 3D culture in Alvetex[®].

HMGECs were cultured at the air-liquid interface, supplied with proliferation medium only for up to 4 weeks. Intracellular lipid droplets were stained by Sudan black, Oil red or Sudan III. Staining within the scaffold represents an inevitable artifact due to reagent binding. Scale bar: 50 µm (left, middle), 10 µm (right-enlarged panel).

1.3.6 多孔性スキャフォールド(Alvetex[®])を用いた三次元培養 -電子顕微鏡観察-

HMGEC の三次元培養(Air-lift 培養期間)に伴う免疫組織学的検討および細胞内脂肪滴観察と併せて、電子顕微鏡下にて細胞内小器官および形態を観察した。その結果、Alvetex[®]を用いた三次元培養では、細胞同士は互いに密接して凝集塊を形成しているのではなく、細胞周囲には空間が認められた。また、個々の細胞は主に細胞突起を介してスキャフォールド担体に結合していた(Figure 1-13:a)。Air-lift 培養直前では、細胞形態は球体状であり、多くの液胞が観察された。幾つかの細胞では液胞内に細胞内老廃物が認められたが、多くの細胞では空であった(Figure 1-13:b)。Air-lift 培養1週間後では、細胞は紡錘状であり、基底膜全体を介してスキャフォールド担体へ結合していた。また液胞は多く認められたが(Figure 1-13:c)、脂質小胞も僅かに認められた(data not shown)。Air-lift 培養3週間および5週間後では、複数の脂質小胞が細胞質内に観察されたが、細胞質内を満たすほどの数と大きさでは無かった(Figure 1-13:d および e)。以上より、Air-lift 培養1週間後の細胞は、未分化のマイボーム腺上皮細胞と考えられるが、Air-lift 培養3 および 5 週間後の細胞は、分化途中のマイボーム腺上皮細胞と示唆された(Figure 1-14)。

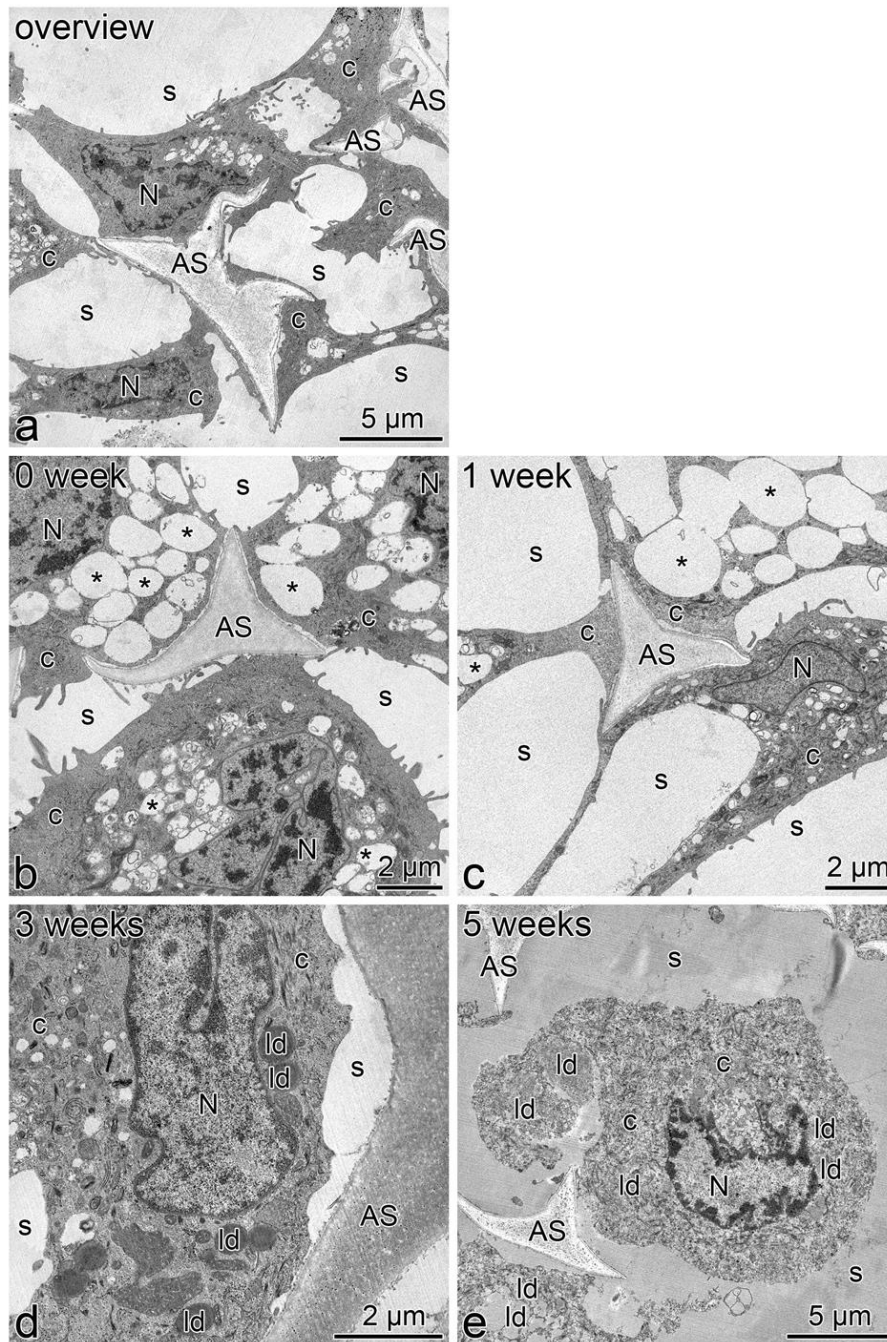


Figure 1-13. Electron microscopic images of the HMGECs during long-term 3D culture in Alvetex®.

HMGECs were cultivated until confluent in Alvetex®. Then, air-liquid interface culture was performed for up to 5 weeks with proliferation medium. 3D cultured cells were analyzed using transmission electron microscopy. AS = Alvetex® scaffold; c = cytoplasm; s = space; ld = lipid droplets; stars = “empty” intracellular vacuoles.

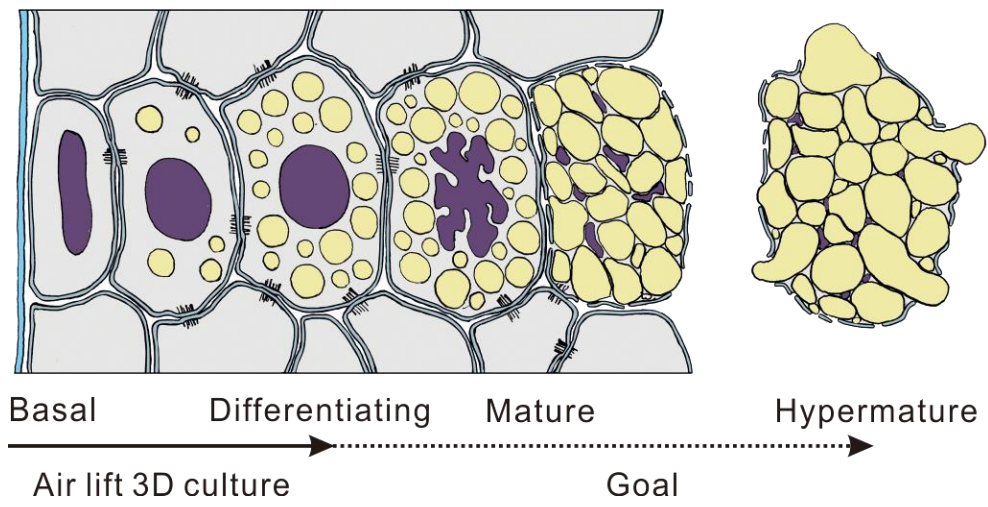


Figure 1-14. The progress in meibocytes differentiation achieved by a long-term 3D culture in Alvetex®.

1.3.7 ハンギングドロップ法による三次元培養 –電子顕微鏡観察–

Figure 1-9に示した通り、HMGECのAir-lift培養時には、apical側において明らかな重層化は確認されなかったが、スフェロイドの自然形成が認められた。この特徴的な知見は、HMGECにおけるスフェロイド形成が比較的容易である可能性を示唆している。また前述したとおり、三次元培養技術には様々な選択肢があるが、ハンギングドロップ法は簡便かつ均一なスフェロイド形成を迅速に行うことが可能であり、実際、涙腺²⁸⁾、乳腺²⁹⁾および汗腺³⁰⁾などの分泌腺においても培養スフェロイドを介した生理機能解析が行われている。したがって、スフェロイド培養はマイボーム腺の三次元特性を保持した腺分泌モデルとして応用できる可能性がある。

そこで、ハンギングドロップ法を用いたHMGECの三次元スフェロイド培養に伴う細胞内小器官および細胞形態の変化を電子顕微鏡下にて観察した。その結果、三次元培養16時間後では、脂質小胞が核の周囲に認められ(Figure 1-15:a および b)、細胞周囲には空間が比較的少なく、デスモソームによる細胞間結合も観察された(Figure 1-15:b および c)。また三次元培養48時間後では、複数の脂質小胞が細胞質内に観察されただけでなく、サイトケラチンフィラメントも認められた(Figure 1-15:d, e および f)。しかしながら、脂質小胞は細胞質内を満たすほどの数と大きさでは無かった。したがって、ハンギングドロップ法による三次元スフェロイド培養48時間後の細胞は、分化途中のマイボーム腺上皮細胞と示唆された。

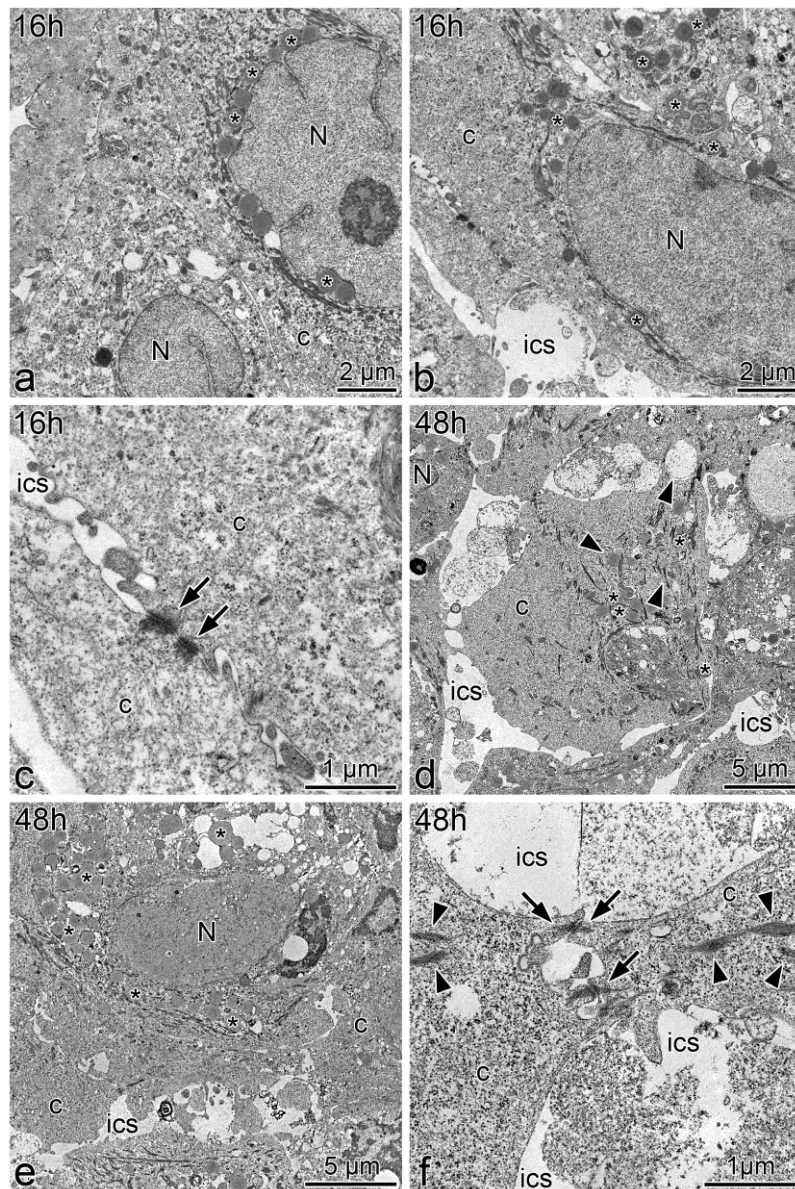


Figure 1-15. HMGECs during culture in hanging drop.

HMGECs were cultivated in hanging drops for up to 48 hours in proliferation medium. 3D cultured cells were analyzed using transmission electron microscopy. a: Close to the cell nucleus some small lipid droplets (stars) have formed. b: Small lipid droplets (stars) are visible in close proximity to the cell nucleus. c: Area between two meibocytes showing two desmosomes (arrows) bridging the intercellular space (ics). d: Several lipid droplets are visible within the cytoplasm. Next to the droplets, cyto keratin filaments are visible in the cytoplasm (c). e: The cytoplasm contains a lot of small lipid vesicles (stars) beside other vesicles and cyto keratin filaments in the cytoplasm. f: Contact area of two meibocytes that had been cultured for 48 hours. The cells are connected via desmosomes. Cyto keratin filaments (arrowheads) are increased in this area. c = cytoplasm; ics = intercellular space.

第4節 考察

ヒト由来不死化皮脂腺細胞(SB662)が自発的に分化し、生体組織の皮脂腺と類似した機能および構造を示したという報告²⁵⁾に基づき、HMGECの重層化の可能性を検討した結果、通常培地を用いたAir-lift培養時のみ山脈様に重層化した形態が観察された(Figure 1-6 および Figure 1-7)。しかしながら、いずれのメンブランフィルターを用いた場合においても重層化した細胞層は接着性が乏しく、組織学的実験には不向きであった。分化成熟したマイボーム腺細胞では発達したデスモソームが観察され、細胞-細胞間の相互作用(細胞接着性)が増加するとの報告がある¹⁷⁾³¹⁾。したがって、本章において重層化した細胞同士の接着は十分だったと考えられたが、メンブランフィルターに対する親和性は不十分であったと推察された。なお、SB662におけるAir-lift培養時には、細胞外マトリックスによる基材コーティングは不要であり、重層化した細胞層も安定であった(論文著者の私信)。一方、ThinCert™を用いたHMGECにおけるAir-lift培養時には、Vitronectin等の細胞外マトリックスによる基材コーティングが必須であると判明したため(Table 1-1)、より直接的な細胞同士の相互作用を可能にし³²⁾、積極的な細胞分化が誘導され³³⁾³⁴⁾、自然な微小環境を再現し、生体に近い機能発現が期待できる³⁵⁾³⁶⁾三次元培養プラットフォームとして、Alvetex®スキャフォールドを用いた三次元培養を試みた。本製品を用いた三次元培養では、組織学的解析により、Alvetex®スキャフォールド内部の細胞は同一の形態を示した。一方、Air-lift培養時には、apical側において明らかな重層化は確認されなかったが、スフェロイドの自然形成が認められた。この特徴的な知見は、HMGECにおけるスフェロイド形成が比較的容易である可能性を示唆している。近年、ヒト初代培養皮脂腺および不死化皮脂腺細胞を用いたハイスループット三次元スフェロイド培養モデルが報告されており³⁷⁾、脂質生合成関連の遺伝子発現上昇および最終分化マーカーの発現も確認されているため、HMGECにおいても、スフェロイド培養は分化制御メカニズムの解明に有用である可能性がある。実際、ハンギングドロップ法を用いた三次元培養においては、16時間後に脂肪小胞の蓄積が認められているため(Figure 1-15)、Alvetex®スキャフォールドを用いた三次元培養と比較して、細胞分化が早い可能性がある。ただし、培養スフェロイドは通常、内側の細胞群が酸欠および栄養欠乏に陥りやすく、形質転換を起こさずに長期間培養するためには改善の余地があると推察される。

CK1は眼瞼表皮に豊富に存在する角化マーカーとして広く知られているが²⁷⁾、Alvetex®スキャフォールドを用いたAir-lift培養時にCK1発現が認められなかったため(Figure 1-9)、角質化は起きていないと考えられた。

CK10は、CK1発現様式と関連性が高く、表皮角化部に共発現することが多い³⁸⁾。またCK10は結膜³⁹⁾、角膜輪部⁴⁰⁾のAir-lift培養時に発現上昇が報告されているが、角膜周辺部⁴⁰⁾、皮脂腺⁴¹⁾、マイボーム腺の腺房⁴²⁾では認められない。一方、CK10はマウス⁴³⁾およびヒト²⁷⁾において、マイボーム腺開口部付近の中央導管のみに発現確認されている。したがって、CK10はマイボーム腺中央導管の上皮分化マーカーとして科学的エビデンスが確立されつつある。そのため、

Alvetex[®]スキャフォールドを用いた Air-lift 培養時に CK10 の発現誘導が apical 側で認められたことは、Air-lift 培養によってマイボーム腺中央導管に近い微小環境を再現している可能性を示唆するのみならず、HMGEC が導管上皮周辺の細胞へ分化可能であるという報告¹⁷⁾とも合致する。

CK14 は扁平上皮細胞の基底層マーカーとして広く知られており³⁸⁾、ヒトマイボーム腺の腺房および中央導管の両方に発現しているが²⁷⁾、CK14 は細胞骨格フィラメントとしての役割を除き、その他の生物学的な機能は明らかではない。加えて、CK14 遺伝子欠損マウスは出生後致死を示すことが知られている⁴⁴⁾。一方で、基底層の細胞が表皮側に向かい移動・分化成熟する過程で CK14 は徐々に消失しながら異なる CK 発現様式へと変化するため、CK14 の発現調節は厳密に制御されている可能性が高い⁴⁵⁾。当初、表皮角化細胞の Air-lift 培養時と同じく、CK14 は Air-lift 培養時に減少あるいは basal 側で局所的に発現増強すると仮説を立てていたが、実際は、CK14 は Air-lift 培養時に増加した (Figure 1-9)。本結果の要因として、Alvetex[®]スキャフォールド内部の細胞が重層化しておらず分化成熟過程を限定的にしか反映していない可能性が考えられた。いずれにせよ、正確な要因を解明するためには更なる検討が必要であると考えられる。

CK6 は、増殖期の扁平上皮細胞のマーカーとして知られており、マイボーム腺中央導管に発現確認されている¹⁴⁾⁴⁶⁾。Alvetex[®]スキャフォールド内部の細胞に発現が認められたが、特に、Air-lift 培養 2~3 週間後、apical 側に形成された球状のスフェロイドにおいて、CK6 の強い発現が確認されたため、Air-lift 培養によってマイボーム腺中央導管に近似した微小環境を再現し、細胞分化を促した可能性がある。また Alvetex[®]スキャフォールドを用いた Air-lift 培養において、分化誘導処理 1 日後では、CK 発現および局在に顕著な変化は認められなかったが、apical 側の細胞形態が球状から扁平へ劇的に変化していた。その結果、apical 側では単層の扁平上皮細胞層が形成されており、強い CK6 発現も認められた (Figure 1-10)。HMGEC は、上皮増殖因子を含む通常培地による培養では CK 遺伝子発現が著しく抑制されており、細胞増殖性が優位になっていることが報告されている²⁰⁾。この所見を裏付けるように、HMGEC を血清存在下で長期間分化誘導した場合、CK1 と CK6 の発現上昇が認められている¹⁷⁾。したがって、分化誘導後の特徴的な細胞形態の変化は、細胞骨格を構成する CK6 の発現量変化に起因する可能性がある。また apical 側の細胞のみ顕著な形態変化が認められたため、Air-lift 培養による空気暴露環境も必要条件の一つかもしれない。あるいは、apical 側の細胞は足場構造による機械的ストレスを受けにくく、ある程度自由に細胞形態を変化させる環境下にあるのに対して、Alvetex[®]スキャフォールド内部の細胞は、分化誘導刺激に対しても球状の細胞形態を維持せざるを得ないとも考えられる。

マイボーム腺における脂質分泌作用は、眼表面における涙液層安定化のため極めて重要である。この生理的役割を果たすために、マイボーム腺細胞は細胞質内に脂肪滴が充満するまで脂肪小胞を蓄え続け、最終的にはアポトーシスにより腺細胞自体が崩壊し、内部の脂肪滴を放出する。Alvetex[®]スキャフォールドを用いた Air-lift 培養において、脂肪滴の増加は認められたが、

細胞の大きさ(直径)、形態までは変化しなかった(Figure 1-11)。したがって、この細胞は分化途中のマイボーム腺細胞と考えられ、分化成熟(過成熟)には達していなかった。また電子顕微鏡観察においても、脂肪小胞の増加が認められたものの、脂肪滴で充満する像は観察されなかったため(Figure 1-13)、分化途中のマイボーム腺細胞であると支持した(Figure 1-14)。一方、成熟あるいは過成熟のマイボーム腺細胞に至らなかった理由として、全分泌を制御する何らかのシグナル伝達経路が活性化されていない可能性が考えられる。最新の研究によると、皮脂腺における全分泌では、細胞が巨大化し細胞内脂質が増加する様子が観察されるが、ホロクリン崩壊(細胞死)は、細胞の巨大化自体がトリガーではなく、アポトーシスとは無関係な酵素的 DNA 断片化とオートファジーが関与すると報告されている⁴⁷⁾⁴⁸⁾。さらに、CD147 が MMP-9 の発現上昇を介してマイボーム腺細胞の増殖・分化を制御している可能性⁴⁹⁾、および Notch シグナル伝達経路がマイボーム腺のホメオスタシスに関与している可能性など⁵⁰⁾、マイボーム腺細胞の分化マーカーが新たに同定されつつあり、本章で開発した三次元培養モデルにおいても、上記のシグナル伝達経路あるいは分化候補マーカーを用いた有用性の検証および更なる特徴付けが必要と考える。また近年、ホロクリン分泌に関与する CK 分子種をプロジェニターとして免疫組織学的に追跡し、得られた蛍光染色画像を立体的に再構築した報告⁵¹⁾、およびフーリエドメイン型光干渉断層画像診断法(Optical Coherence Tomography:OCT)を用いて三次元的にマイボグラフィ撮影して、健常人とMGD患者のマイボーム腺状態を観察した報告⁵²⁾など、マイボーム腺構造の三次元的な理解や診断解析が徐々に進展しつつあるが、本報告は、*in vitro*で初めてマイボーム腺細胞を用いた腺分泌機能を保持する三次元培養モデルに関する研究である。

以上、本章での結果から、多孔質スキャフォールド(Alvetex[®])を用いた三次元培養において、血清非存在下でも Air-lift 培養時に複数のサイトケラチン分子種の発現量および発現様式の変化が確認されただけでなく、細胞内脂肪滴の増加も認められたため、マイボーム腺細胞の分化過程を部分的に再現している可能性がある。

第2章 マイボーム腺への点眼時薬物移行性の検証

第1節 緒言

マイボーム腺は眼瞼縁という特殊な位置に埋没しているため、動物実験における技術的課題が多い。これまでに酵素処理等によるマイボーム腺採取法は報告されているものの⁵³⁾、処理時間が長い、あるいは煩雑な作業を伴うことから、薬剤スクリーニングへの応用は難しいと考えられる。さらに、組織中薬物濃度測定においては周辺組織のコンタミネーションを避けることが最も重要であるが、既存のマイボーム腺採取法は、この点を考慮しておらず、薬物動態評価を誤った方向へ導く可能性が高い。したがって、薬物動態実験に最適化されたマイボーム腺採取法の開発が第一に不可欠である。さらに、現時点ではMGDの本質的な病巣部が明らかではないため、標的組織の絞り込みや将来的なPK-PD解析への展開を考慮すると、単純なマイボーム腺採取よりも可能な限り組織を分離採取できる方法であれば、その有用性は一段と高まると考えられる。

MGDの正確な病態生理については、依然として不明な点が多いものの、後部眼瞼縁における炎症は臨床学的に重要なMGDの他覚所見の一つとして認識されている。実際、ステロイド点眼液は抗生物質(内服あるいは点眼)と併用してMGD治療の選択肢の一つとして提唱されている。ステロイド点眼液は強力な抗炎症作用を示すが、眼圧上昇や感染症など副作用が問題となるため、使用は短期間に限定される場合が多い。一方、近年報告された選択的グルココルチコイド受容体アゴニスト(Selective Glucocorticoid Receptor Agonist: SEGRA)は、受容体に対する選択性を高めることで、優れた抗炎症作用を維持しつつ、眼圧上昇の副作用を分子的に乖離させた化合物であり、MGDを含む炎症性眼疾患に対する理想的な眼科用剤として期待されている。しかし、今までにマイボーム腺における点眼時薬物動態を評価した報告は一切無かった。したがって、マイボーム腺におけるステロイド化合物およびSEGRA点眼時の薬物動態プロファイルは、MGD治療薬開発における有益なベンチマーク情報となり得る可能性がある。

そこで本章では、薬物動態評価に適した簡便かつ高精度なウサギマイボーム腺採取法を開発し、ステロイド化合物およびSEGRAをモデル化合物として、ウサギ単回点眼時におけるマイボーム腺中薬物濃度推移を明らかにすること、さらに、マイボーム腺への薬物移行経路に関する分布情報、特にマイボーム腺中央導管を介した点眼時薬物移行の有無を明らかにすることを目的とした。なおステロイド化合物としてリン酸ベタメタゾン水溶液、SEGRAとしてSA22465懸濁液を用いた。またウサギは眼球の大きさや構造、涙液量などが、ヒトとほぼ同じであるため⁵⁴⁾、眼科における薬物動態研究で汎用される動物種である。さらに、眼瞼の大きさや厚みも、他の動物種と比べるとヒトに近く、またマイボーム腺の数や基本的な構造的も類似しているため、本研究でもウサギを選択した。

第2節 実験方法

試薬

化合物(放射性標識化合物を含む)

SA22465、SA22313 および内標準物質(各化合物における d3-重水素置換体)は参天製薬 奈良研究開発センターにおいて合成された。リン酸ベタメタゾンナトリウムおよびプレドニゾロンは Sigma Chemical (St. Louis, MO, USA) から購入した。 $[^{14}\text{C}]$ -SA22465 (2.15MBq/mg) は積水メディカル (Ibaraki, Japan) から購入した。なお HPLC 面積値から算出された $[^{14}\text{C}]$ -SA22465 の放射化学的純度は 99.6%であった。

点眼液

1%リン酸ベタメタゾン水性点眼液はリン酸ベタメタゾンナトリウムを生理食塩液に溶解して調製した。1%SA22465 および $[^{14}\text{C}]$ -SA22465 懸濁性点眼液は、参天製薬において開発された点眼液基剤に懸濁して調製した。なお点眼液基剤は、緩衝剤としてリン酸二水素ナトリウム、懸濁化剤としてポリソルベート 80、浸透圧調整剤としてグリセリン、pH 調整剤として塩酸、防腐剤として塩化ベンザルコニウムを含む。また外部標準法により算出された 1%SA22465 懸濁性点眼液の SA22465 含量は 97.6%であり、不純物としての SA22313 含量は 0.16%であった。また 1%SA22465 懸濁性点眼液における SA22465 の平均粒子径は 2.9 μm であった。

実験動物

使用動物及び飼育方法

雄性日本白色ウサギ(約 1.6~2.1 kg)は、参天製薬株式会社 奈良研究開発センターにて、雄性ニュージーランド白色ウサギ(約 2.3~2.5 kg)は、Covance Laboratories Ltd. (Harrogate, UK)にて自由に水及び固形飼料を摂取させて飼育した。なお、実験動物の取り扱いについては参天製薬株式会社 動物実験委員会が作成した「動物実験倫理指針」に従った。

点眼方法

マイクロピペットを用いて、点眼液を各ウサギの両眼角膜上に点眼した(50 $\mu\text{L}/\text{eye}$)。

眼瞼結膜上皮、マイボーム腺開口部、マイボーム腺中 SA22465 および SA22313 濃度の測定 組織採取

点眼後、試料採取時間(点眼後 5 および 30 分、1、2、4、8 および 24 時間)にペントバルビタールナトリウム(商品名:ソムノペンチル[®])約 4 mL をウサギ耳静脈に投与し、過剰投与による安楽殺処分した。動物の死亡確認後、手術用ハサミ(直剪刀)を用いて内眼角および外眼角を数 mm 切開した。内眼角および外眼角付近の眼瞼縁を固定鑷子で保定しながら、眼瞼縁からマイボーム腺が含まれる眼瞼部分を内眼角から外眼角に向かって切開・摘出した。摘出した眼瞼組織から余分な眼輪筋を、手術用ハサミを用いて切除した後、マイボーム腺直下の眼瞼結膜をゴルフナイフで削り、眼瞼結膜上皮として採取した。残った組織は眼瞼皮膚側を表面にしてスライドガラスに載せた。スライドガラスをドライアイスに載せて、急冷させて眼瞼組織とスライドガラスを密着させた。バックライトを用いて適宜凍結状態を確認・調節しながら、マイクロームナイフおよび替刃メスを用いて眼瞼皮膚および筋肉を除去した後、マイボーム腺開口部を切断・採取および瞼板(マイボーム腺)を薄切・採取して、試料採取容器に移した。採取した眼瞼結膜上皮、マイボーム腺開口部およびマイボーム腺試料は、重量測定までドライアイス下あるいは-80°C にて凍結保存した。なお SA22465 はエステル化合物であり、試料ホモジネート液中にて速やかに SA22313 へと代謝される可能性があるため、分解抑制のため試料採取容器には予め 10%ギ酸溶液/アセトニトリル(33:67, vol%) 250 μ L およびステンレスビーズ(ϕ 5 mm:2 粒)を添加した。

LC-MS/MS 分析法バリデーション

LC-MS/MS(Liquid chromatography tandem-mass spectrometry)分析法バリデーションにおける許容基準は、各国の Bioanalytical Method Validation(BMV)ガイドラインと併せて、以下の値で設定した。

- 真度(%): $\pm 15\%$ 以内(定量下限界は $\pm 20\%$)
- 精度(%): $\pm 15\%$ 以内(定量下限界は $\pm 20\%$)
- 安定性(%): 85~115%

開発した分析法は、特異性、直線性、日内再現性およびキャリーオーバーについて確認した。

前処理法

凍結保存した組織試料を融解した後、組織重量を測定した。ビーズ式多検体細胞破碎装置 (Shake Master Auto; Biomedical Science, Tokyo, Japan) を用いてホモジナイズ (1,100 rpm, 10 分間) した後、10 mM ギ酸アンモニウム溶液 250 μ L およびアセトニトリル 500 μ L を添加して攪拌した。11,000 g、10 分間、4°C で遠心分離した後、上清を眼瞼結膜上皮、マイボーム腺開口部およびマイボーム腺ホモジネート液として褐色エッペンチューブへ移した。次表に従い、エッペンチューブにブランク検板ホモジネート液 50 あるいは 10 μ L、混合標準溶液 50 μ L、内標準溶液 50 μ L、2%ギ酸溶液 500 μ L の順に添加し、攪拌した (各濃度 n=1)。

1) 定量範囲 0.02~10 ng/mL の場合

| Sample Name | SA22465、SA22313 混合標準溶液 | | | 内標準溶液 (μ L) | 2%ギ酸溶液 (μ L) | ブランク検板 (μ L) | 組織中濃度 (ng/sample) |
|-------------|------------------------|------------|----------------|------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| | ID | 濃度 (ng/mL) | 添加量 (μ L) | | | | |
| Low STD8 | Low WSS9 | 10 | 50 | 50 | 500 | 50 | 10 |
| Low STD7 | Low WSS7 | 2 | 50 | 50 | 500 | 50 | 2 |
| Low STD6 | Low WSS6 | 1 | 50 | 50 | 500 | 50 | 1 |
| Low STD5 | Low WSS5 | 0.5 | 50 | 50 | 500 | 50 | 0.5 |
| Low STD4 | Low WSS4 | 0.2 | 50 | 50 | 500 | 50 | 0.2 |
| Low STD3 | Low WSS3 | 0.1 | 50 | 50 | 500 | 50 | 0.1 |
| Low STD2 | Low WSS2 | 0.05 | 50 | 50 | 500 | 50 | 0.05 |
| Low STD1 | Low WSS1 | 0.02 | 50 | 50 | 500 | 50 | 0.02 |
| Low Zero | DMSO | | 50 | 50 | 500 | 50 | 0 |
| DB | DMSO | | 50 | DMSO (50) | 500 | 50 | - |

2) 定量範囲 5~1000 ng/mL の場合

| Sample Name | SA22465、SA22313 混合標準溶液 | | | 内標準溶液 (μ L) | 2%ギ酸溶液 (μ L) | ブランク検板 (μ L) | 組織中濃度 (ng/sample) |
|-------------|------------------------|------------|----------------|------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| | ID | 濃度 (ng/mL) | 添加量 (μ L) | | | | |
| High STD8 | High WSS9 | 200 | 50 | 50 | 500 | 10 | 1000 |
| High STD7 | High WSS7 | 100 | 50 | 50 | 500 | 10 | 500 |
| High STD6 | High WSS6 | 50 | 50 | 50 | 500 | 10 | 250 |
| High STD5 | High WSS5 | 20 | 50 | 50 | 500 | 10 | 100 |
| High STD4 | High WSS4 | 10 | 50 | 50 | 500 | 10 | 50 |
| High STD3 | High WSS3 | 5 | 50 | 50 | 500 | 10 | 25 |
| High STD2 | High WSS2 | 2 | 50 | 50 | 500 | 10 | 10 |
| High STD1 | High WSS1 | 1 | 50 | 50 | 500 | 10 | 5 |
| High Zero | DMSO | | 50 | 50 | 500 | 10 | 0 |
| DB | DMSO | | 50 | DMSO (50) | 500 | 50 | - |

ダブルブランク試料、ゼロ試料、検量線用標準試料、QC 試料および測定試料を 11,000 g、10 分間、4°C で遠心分離した後、得られた上清 100 μ L または 600 μ L を予めコンディショニングした OASIS μ Elution plate (MCX) へアプライした。2%ギ酸溶液、アセトニトリル各 300 μ L で順次洗浄した後、1%アンモニアアセトニトリル 100 μ L で溶出した。溶出液に 2%ギ酸溶液 100 μ L を添加して希釈し、攪拌した。また定量範囲 5~1000 ng/mL の場合は、2%ギ酸溶液/アセトニトリル (50:50, vol%) 400 μ L を添加して希釈し、攪拌した。

LC-MS/MS 分析条件

質量分析装置は、ESI プローブを装着した三連四重極型質量分析計 API4000 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) を使用した。さらに、高速液体クロマトグラフィー Agilent1100 system (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) およびオートサンプラー CTC PAL (CTC Analytics, Zwingen, Switzerland) を連結させて Analyst1.4.2 (Applied Biosystems) を用いて制御した。その他、測定イオンや各種パラメータ(ガス流量、温度)およびクロマトグラフィー分離等の LC-MS/MS 測定条件は次表に示した。

| | | | | |
|--------------------------------|--|-------|-------|---------------------------|
| Analyte | SA22465, SA22313 | | | |
| Column | TSK-GEL ODS-100V, 3 μ m, 2.0 mm i.d.x50 mm (TOSOH) | | | |
| Column temperature | 40°C | | | |
| Injection volume | 4 μ L | | | |
| Sample cooler | 4°C | | | |
| Mobile phase | (A) 0.1% formic acid | | | |
| | (B) 0.1% formic acid acetonitrile | | | |
| Gradient program and flow rate | Time (min) | A (%) | B (%) | Flow rate (μ L/min.) |
| | 0.00 | 55 | 45 | 500 |
| | 2.00 | 2 | 98 | 500 |
| | 4.00 | 2 | 98 | 500 |
| | 4.01 | 55 | 45 | 800 |
| | 5.50 | 55 | 45 | 800 |
| Ion source | Turbo ion spray (positive mode) | | | |
| Curtain gas | 22 | | | |
| Ion source gas 1 | 60 | | | |
| Ion source gas 2 | 80 | | | |
| Ion spray voltage | 5000V | | | |
| Temperature | 600°C | | | |
| Collision gas | 6 | | | |
| Interface heater | On | | | |
| Monitoring ions | SA22313: m/z 434.15 \rightarrow m/z 308.30 SA22465: m/z 528.35 \rightarrow m/z 402.20 SA26261: m/z 437.15 \rightarrow m/z 311.30 SA26262: m/z 531.35 \rightarrow m/z 405.20 | | | |
| Divert valve | 0.0-1.0 min: To waste 1.0-4.5 min: To MS 4.5-5.5 min: To waste | | | |
| Run time per sample | 5.5 min | | | |

データ処理方法

ピークの同定、ピーク面積値の算出、検量線の作成には Analyst 1.4.2 を用いた。各組織中濃度は、各測定対象標準物質と対応する内標準物質のピーク面積比による内標準法を用いて算出した。検量線は内標準物質に対する各測定対象標準物質のピーク面積比 (y) と設定濃度 (x) との関係から、最小二乗法により作成した。重み付けは $1/x^2$ とした。

$$y = ax + b$$

x: 設定濃度
y: ピーク面積比
a: 検量線の傾き
b: y 軸切片

組織中 SA22465 および SA22313 濃度の算出

組織中 SA22465 および SA22313 濃度の算出には Analyst 1.4.2 を用いた。検量線の逆回帰値、QC 試料及び測定試料の測定値は、次式に従い算出した。

$$X = (Y - b) / a$$

X: 検量線の逆回帰値あるいは QC 試料および測定試料の測定値
Y: 検量線、QC 試料あるいは測定試料のピーク面積比

眼瞼結膜上皮、マイボーム腺開口部、マイボーム腺中ベタメタゾン濃度の測定

組織採取

眼瞼結膜上皮、マイボーム腺開口部およびマイボーム腺採取方法は、「眼瞼結膜上皮、マイボーム腺開口部、マイボーム腺中 SA22465 および SA22313 濃度の測定」の項目にて前述した方法とほぼ同じである。なおリン酸ベタメタゾンは、試料ホモジネート液中にて代謝される可能性が低いため、試料採取容器には有機溶媒を含めず、10 mM ギ酸アンモニウム溶液 250 μ L およびステンレスビーズ (ϕ 5 mm: 2 粒) を予め添加した。

LC-MS/MS 分析法バリデーション

LC-MS/MS 分析法バリデーションにおける許容基準は、各国の BMV ガイドラインと併せて、以下の値で設定した。

- 真度 (%) : $\pm 15\%$ 以内 (定量下限界は $\pm 20\%$)
- 精度 (%) : $\pm 15\%$ 以内 (定量下限界は $\pm 20\%$)
- 安定性 (%) : 85 ~ 115%

開発した分析法は、特異性、直線性、日内再現性およびキャリーオーバーについて確認した。

前処理法

凍結保存した組織試料を融解した後、組織重量を測定した。ビーズ式多検体細胞破碎装置 (Shake Master Auto) を用いてホモジナイズ (1,100 rpm, 10 分間) した後、10 mM ギ酸アンモニウム溶液 250 μ L およびアセトニトリル 500 μ L を添加して攪拌した。11,000 g、10 分間、4°C で遠心分離した後、上清を眼瞼結膜上皮、マイボーム腺開口部およびマイボーム腺ホモジネート液として褐色エッペンチューブへ移した。次表に従い、ガラス製試験管にブランク瞼板ホモジネート液 100 μ L、ベタメタゾン標準溶液 50 μ L、内標準溶液 50 μ L の順に添加し、攪拌した (各濃度 n=1)。

| Sample Name | ベタメタゾン標準溶液 | | | 内標準溶液 (μ L) | ブランク瞼板 (μ L) | 組織中濃度 (ng/sample) |
|-------------|------------|------------|----------------|------------------|-------------------|-------------------|
| | ID | 濃度 (ng/mL) | 添加量 (μ L) | | | |
| STD8 | WSS9 | 200 | 50 | 50 | 100 | 100 |
| STD7 | WSS7 | 40 | 50 | 50 | 100 | 20 |
| STD6 | WSS6 | 20 | 50 | 50 | 100 | 10 |
| STD5 | WSS5 | 4 | 50 | 50 | 100 | 2 |
| STD4 | WSS4 | 2 | 50 | 50 | 100 | 1 |
| STD3 | WSS3 | 1 | 50 | 50 | 100 | 0.5 |
| STD2 | WSS2 | 0.4 | 50 | 50 | 100 | 0.2 |
| STD1 | WSS1 | 0.2 | 50 | 50 | 100 | 0.1 |
| Zero | MeOH | | 50 | 50 | 100 | - |
| DB | MeOH | | 50 | MeOH (50) | 100 | - |

ダブルブランク試料、ゼロ試料、検量線用標準試料、QC 試料および測定試料に t-ブチルメチルエーテル 1 mL を加えた後、攪拌し、3,000 rpm、10 分間、4°C で遠心分離した。得られた上清を遠心エバポレーターにて減圧乾固した後、移動相 100 μ L で添加・再溶解した。

LC-MS/MS 分析条件

質量分析装置は、「眼瞼結膜上皮、マイボーム腺開口部、マイボーム腺中 SA22465 および SA22313 濃度の測定」の項目にて前述した装置と同一の構成システムを使用した。その他、測定イオンや各種パラメータ(ガス流量、温度)およびクロマトグラフィー分離等の LC-MS/MS 測定条件は次表に示した。

| | |
|---------------------|---|
| Analyte | Betamethasone |
| Column | Xterra MS C18 5 μ m, 2.1 i.d. \times 150 mm (Waters) |
| Column temperature | 30°C |
| Injection volume | 10 μ L |
| Sample cooler | 4°C |
| Mobile phase | 10 mM ammonium formate/0.1% formic acid/acetonitrile (20:20:60, vol%) |
| Flow rate | 0.2 mL/min |
| Ion Source | Turbo ion spray (positive mode) |
| Curtain gas | 15 |
| Ion source gas 1 | 60 |
| Ion source gas 2 | 40 |
| Ion spray voltage | 5500 V |
| Temperature | 500°C |
| Collision gas | 7 |
| Interface heater | On |
| Monitoring ions | Betamethasone: m/z 393.3 \rightarrow m/z 373.2 Prednisolone: m/z 361.2 \rightarrow m/z 343.0 |
| Wash solvent 1 | Water/Acetonitrile |
| Wash solvent 2 | 10 mM ammonium formate/0.1% formic acid/acetonitrile (20:20:60, vol%) |
| Run time per sample | 5 min |

薬物動態パラメータの算出

WinNonlin[®] professional version 7.0 (Certara, Princeton, NJ, USA)を用いて、個体ごとに次のパラメータを算出した。最高組織中濃度 (C_{max} 、実測値)は各組織中濃度の最大値とし、最高濃度到達時間 (T_{max} 、実測値)はそのときの時間とした。最終消失相が観察された場合には、消失速度定数 k_{el} および半減期 $t_{1/2}$ を算出した。 k_{el} は最終消失相の各濃度の対数値を時間に対してプロットしたときの傾き(重みなしの線形最小二乗法により算出)の絶対値とし、 $t_{1/2}$ は $\ln 2/k_{el}$ とした。

[¹⁴C]-SA22465 懸濁液点眼後のウサギ眼球および眼瞼オートラジオグラフィー

3% [¹⁴C]-SA22465 懸濁性点眼液の調製

[¹⁴C]-SA22465 を点眼液基剤に懸濁した後、pH を確認した(許容範囲:6.0~8.0)。調製した点眼液について、含量、放射能濃度、均一性、放射化学的純度および室温安定性を確認した。

組織採取

点眼後、試料採取時間(点眼後 1、4、8 および 24 時間)にペントバルビタールナトリウム約 4 mL をウサギ耳静脈に投与し、過剰投与による安楽殺処分した。動物の死亡確認後、手術用ハサミを用いて眼球および上下眼瞼を採取した。生理食塩液約 50 mL を用いて眼球および眼瞼表面に付着している余剰な点眼液を洗浄した。

マクロオートラジオグラフィー

眼球および眼瞼を包埋剤(2%カルボキシメチルセルロース)に馴染ませた後、ヘキサンドライアイスに浸漬して凍結ブロックを作成した。凍結ブロックをマイクローム(Leica CM3600; Leica Microsystems, Milton Keynes, UK)(設定温度:-20°C)に設置した後、薄切面に粘着フィルム(Filmolux 610 Tape; Neschen, UK)を密着させ、30 μm 厚で薄切しながら凍結切片を作製・回収した。粘着フィルムに付着した凍結切片はマイクローム内で一昼夜以上凍結乾燥させた後、イメージングプレート(Type BAS-MS; Raytek scientific Ltd., Sheffield, UK)に密着させ、遮蔽箱内で 7 日間露光した。全てのイメージングプレートには、既知濃度に調製した検量線試料も添加した。露光後、イメージングプレート内に生じた潜像を、バイオイメージングアナライザー(FUJI FLA-5000; Raytek scientific Ltd., Sheffield, UK)で読取り、感光量を算出した。なお読取り時の解像度は 100 μm に設定し、イメージング画像化には、Seescan 2 software(LabLogic Ltd., Sheffield, UK)を使用してオートラジオグラムを得た。

マイクロオートラジオグラフィー

マイクロオートラジオグラフィーは Thaw-mount 法に従い実施した。眼球および眼瞼を、包埋剤 (OCT Compound) に馴染ませた後、ヘキサンドライアイスに浸漬して凍結ブロックを作成した。赤色光下 (Ilford No.902 safelight filter)、凍結ブロックをマイクローム (Leica CM3050; Leica Microsystems) (設定温度: -12°C) に設置した後、 $5\ \mu\text{m}$ 厚で連続薄切しながら凍結切片を作成し、予め原子核乳剤 (Ilford K5 ^{14}C nuclear emulsion; Agar Scientific, Stansted, UK) を塗布したスライドガラスに密着させた。赤色光下の暗箱内 (設定温度: -10°C 未満) にて 28 日間露光させた。室温へ移した後、赤色光下にて Kodak D19 現像剤を用いて 4 分間現像処理した。1% 酢酸溶液において現像を停止した後、Kodak Unifix を用いて 4 分間定着処理した。蒸留水で 10 分間洗浄および風乾した後、ヘマトキシリン・エオジン染色した。光学顕微鏡下にて標本を観察し、 ^{14}C -SA22465 に由来する放射能によって還元された銀粒子集積部位および分布量 (黒化度) を指標としてスコア化した。

統計解析

実験データは、平均値 \pm 標準誤差 (mean \pm SE) で示した。ただし、定量下限界未満の値は BLQ と表示し、BLQ を 0 として平均値を算出した。また過半数例以上が BLQ の場合、平均値は算出せず BLQ と報告した。

第3節 結果

2.3.1 ウサギマイボーム腺採取法の開発

MGD の本質的な病巣部はマイボーム腺付近であろうと考えられており、特に、閉塞所見が観察されるマイボーム腺開口部、あるいは腺分泌障害が関与するマイボーム腺(導管および腺房を含む)であるかは大きな関心事である。また後部眼瞼縁(辺縁粘膜および結膜皮膚移行部を含む眼瞼縁)における炎症は、臨床学的に重要なMGDの他覚所見の一つとして認識されているため、眼瞼結膜における病変もMGDとの関連性が疑われている。さらに、眼瞼結膜上皮は、通常点眼時に高濃度の薬物に曝露される眼組織であり、マイボーム腺の直下(数百 μm)に位置するため、マイボーム腺への点眼時薬物移行性を判断するための比較対照組織として適切と考えられる。したがって、本章では、マイボーム腺開口部、マイボーム腺(導管および腺房を含む)および眼瞼結膜上皮を分離採取できる組織採取法の開発を目指した。

一般的に、非凍結下における組織採取は簡便かつ自由度が高いが、手術器具等を介したコンタミネーションの拡散リスクが高く、組織中薬物濃度のバラつきに繋がる恐れがある。一方、凍結下における組織採取はコンタミネーションの拡散リスクは低いものの、ミクロトームなどの組織切片作製装置が必要となる場合が多く、極端にスループットが悪い。コンタミネーションの観点からは、マイボーム腺直下の眼瞼結膜表面は点眼液に長期間曝露されているため、眼瞼結膜側からの組織採取は避けるべきである。また解剖学的には、マイボーム腺は眼瞼内部に直列に存在しているため直線的に採取する方が好ましい。そこで、組織切片作製装置を用いないマイボーム凍結切片作成の可能性を検討した。

従来の凍結切片作成は、固定後、凍結包埋剤による包埋処理が一般的であるが、高感度薬物濃度測定を志向した薬物動態評価系では、固定液あるいは凍結包埋剤によるMSシグナルのイオンサプレッションが懸念されるため不適切である。そこで、組織中に含まれる水分を凍結した際に生じる氷によって作業台へ確実に密着させるという着想に基づき、新規ウサギマイボーム腺採取法を開発した。具体的には、採取した眼瞼の結膜面を下にしてスライドガラスと密着させた後、さらに下方からドライアイスで近接させ眼瞼とスライドガラスを急速凍結させた。凍結時に、組織表面の水分が凝固して氷となり、眼瞼結膜とスライドガラスは強固に接着した。その結果、高濃度に曝露された眼瞼結膜側に触れることなく、かつ直線的に眼瞼組織を凍結させることで、マイボーム腺へのアクセスが容易となった。また点眼された点眼液は瞬目あるいは涙液メニスカスにより、眼瞼皮膚表面を曝露している可能性が高い。すなわち、眼瞼皮膚および眼瞼縁(マイボーム腺開口部)は薬物濃度が高いと仮定した。そこで、まず眼瞼皮膚表面および眼輪筋を手動により薄切・除去した。眼輪筋および周囲の余剰結合組織を薄切すると、瞼板の背後に走行する血管(辺縁動脈弓)が観察され、同時に白色様の瞼板が次第に出現した。その段階で一旦薄切を中断した。次に、眼瞼縁(マイボーム腺開口部)を手術用メスで切断した後、逆側の余剰結合組

織も同様に切断した。その後、凝固した眼瞼結膜は最後までスライドガラスと密着させたまま、瞼板(マイボーム腺を含む)を複数枚の薄切切片として採取した(Figure 2-1)。採取したマイボーム腺の組織重量は約 10 mg であり、実験者および採取動物による組織重量の差は小さかった。また、ウサギマイボーム腺の組織採取に掛かる作業時間は 10 分未満であり、特殊な器具・機械を必要としないため薬物動態評価に適している採取法と考えられた。

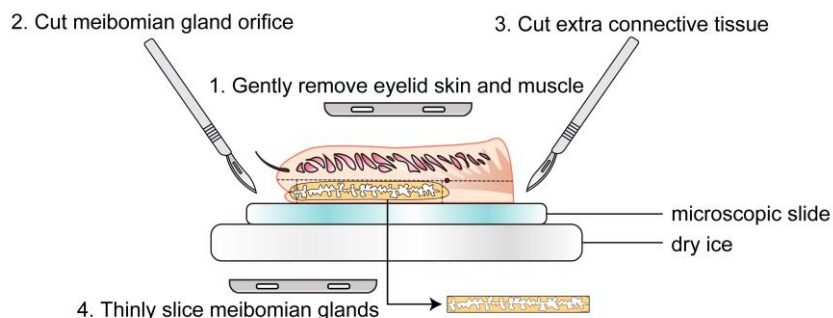


Figure 2-1. Schematic illustration of the meibomian gland collection method.

Rabbit upper eyelids were placed onto chilled glass slides maintained on dry ice. Eyelid skin was gently removed via manual slicing with a microtome blade until the peripheral tarsal arcade became visible. Meibomian gland orifices and extra connective tissues were removed to avoid potential contamination, and the meibomian glands within the tarsal plate were collected as multiple thin tissue slices.

2.3.2 SA22465 懸濁液単回点眼後の眼瞼結膜上皮、マイボーム腺開口部、マイボーム腺中 SA22465 および SA22313 濃度の測定

開発したウサギマイボーム腺採取法を用いて、1%SA22465 懸濁液単回点眼後の眼瞼結膜上皮、マイボーム腺開口部およびマイボーム腺中濃度を測定した(

Figure 2-2 および Figure 2-3)。その結果、眼瞼結膜上皮中には未変化体 SA22465 および代謝物 SA22313 が両方検出され、SA22465 濃度は、全ての測定時点において SA22313 濃度より高かった。眼瞼結膜上皮中 SA22465 濃度は、個体差が大きく濃度推移の妥当性にやや疑問が残るものの、増減を繰り返した後、投与後 4 時間に C_{max} 12,711 ng/g を示したが、明確な吸収相や消失相は認められなかった。一方、眼瞼結膜上皮中 SA22313 濃度は、投与後 5 分に C_{max} 783 ng/g を示した後、二相性の消失を示した。 α 相での眼瞼結膜上皮中 SA22313 濃度の減少は速やかであり、投与後 1 時間に 182 ng/g を示し、 C_{max} の約 23%まで減少した。その後、投与後 24 時間まで緩徐な β 相が継続し、78~221 ng/g を維持した。またマイボーム腺開口部中には未変化体 SA22465 および代謝物 SA22313 が両方検出され、SA22465 濃度は、いずれの測定時点においても SA22313 濃度より約 200 倍高かった。マイボーム腺開口部中 SA22465 濃度は、投与後 5 分に C_{max} 119,318 ng/g を示した後、投与後 1 時間に 44,554 ng/g まで減衰したもの

の、以降の消失傾向は認められなかった。またマイボーム腺開口部中 SA22313 濃度は、投与後 5 分に C_{max} 534 ng/g を示した後、投与後 1 時間に 218 ng/g まで減衰したものの、SA22465 と同様に以降の消失傾向は認められなかった。またマイボーム腺中には代謝物 SA22313 は検出されず、未変化体 SA22465 のみ検出された。マイボーム腺中 SA22465 濃度は、投与後 30 分に C_{max} 171 ng/g を示したが、明確な吸収相や消失相は認められなかった。以上より、SA22465 懸濁液単回点眼後の各組織中濃度推移を比較すると、未変化体 SA22465 は、マイボーム腺開口部 > 眼瞼結膜上皮 > マイボーム腺であり、各組織間では約 100 倍程度の濃度差が認められた。

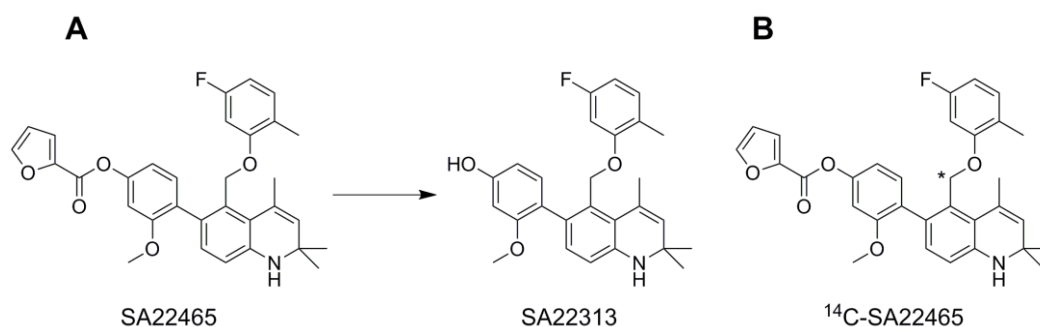


Figure 2-2. Chemical structure of SA22465 and SA22313.

(A) SA22465 (MW 527.6) is the selective glucocorticoid receptor agonist and metabolized into SA22313 (MW 433.5). (B) ^{14}C -SA22465: The asterisk signifies the position of radiolabel.

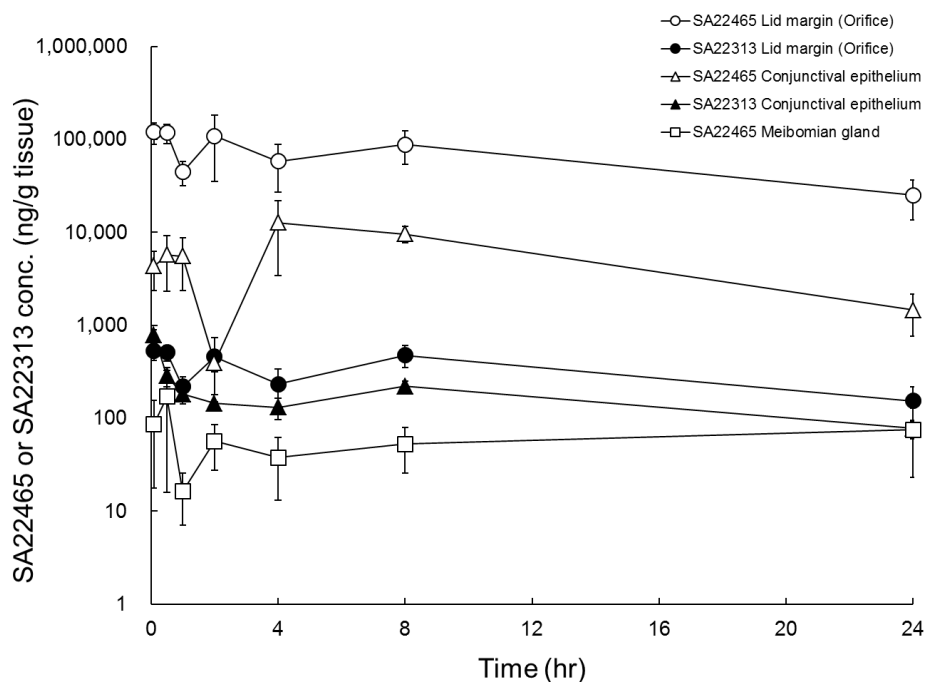


Figure 2-3. Lid margin, conjunctival epithelium and meibomian gland concentration of SA22465 and SA22313 following a single instillation of a 1% SA22465 ophthalmic suspension to rabbits (0.5 mg/50 μL /eye).

SA22313 concentrations in meibomian glands were below the limit of quantification at all time points. Values represent the means \pm SE (n = 6 eyes per group).

2.3.3 リン酸ベタメタゾン水溶液単回点眼後の眼瞼結膜上皮、マイボーム腺開口部、マイボーム腺中ベタメタゾン濃度の測定

懸濁型点眼時のみならず溶解型点眼時の眼瞼における薬物濃度推移の特性を明らかにするため、1%リン酸ベタメタゾン水溶液単回点眼後の眼瞼結膜上皮、マイボーム腺開口部およびマイボーム腺中濃度を測定した(Figure 2-4)。その結果、眼瞼結膜上皮中ベタメタゾン濃度は、投与後5分に C_{max} 37,268 ng/gを示した後、急速に減少した。さらに投与後30分に740 ng/gを示し、 C_{max} の約2%まで減少した。一方、投与後30分以降の眼瞼結膜上皮中ベタメタゾン濃度は緩やかに減少し、投与後8時間に73 ng/gを示したが、投与後24時間では定量下限界未満であった。マイボーム腺開口部中ベタメタゾン濃度は、投与後1時間に C_{max} 3,810 ng/gを示した後、緩やかに減少し、投与後8時間に276 ng/gまで減衰したものの、以降の消失傾向は認められなかった。マイボーム腺中ベタメタゾン濃度は、投与後1時間に C_{max} 189 ng/gを示した後、投与後1時間以降より緩やかな消失が認められ、投与後8時間に22 ng/gを示したが、投与後24時間では定量下限界未満であった。以上より、リン酸ベタメタゾン水溶液単回点眼後の各組織中濃度推移を比較すると、マイボーム腺中ベタメタゾン濃度は眼瞼結膜上皮およびマイボーム腺開口部中濃度より約4~16倍程度低い推移を示した。

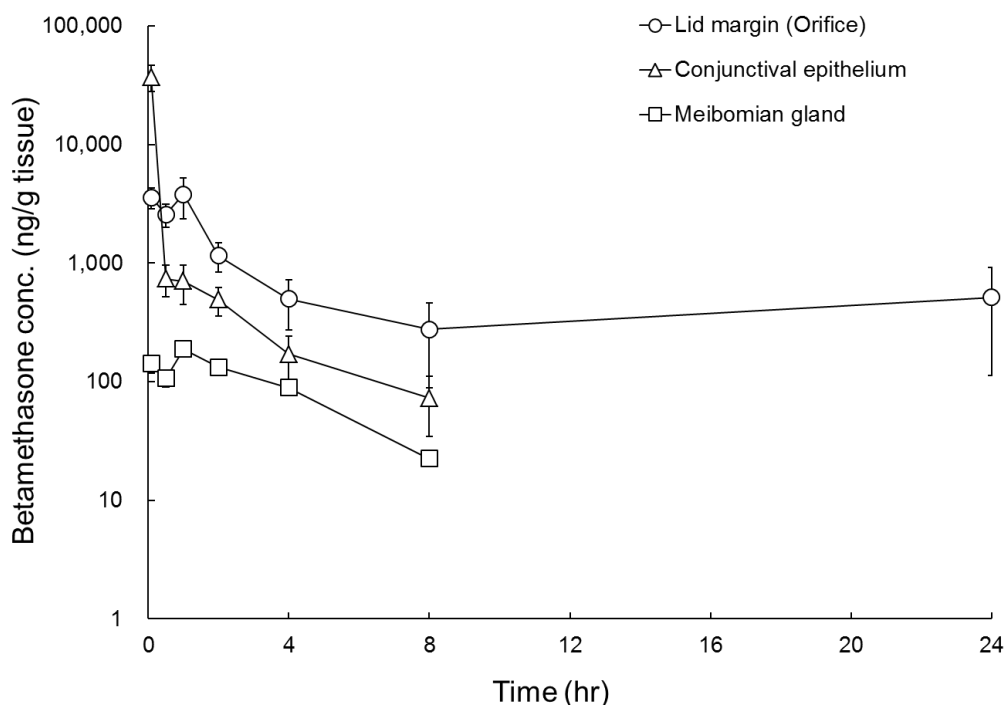


Figure 2-4. Lid margin, conjunctival epithelium and meibomian gland concentration of betamethasone following a single instillation of a 1% betamethasone sodium phosphate solution to rabbits (0.5 mg/50 μ L/eye).

Values represent the means \pm SE (n = 6 eyes per group).

2.3.4 3%¹⁴C-SA22465 懸濁液点眼後の眼球および眼瞼オートラジオグラフィー

Figure 2-3 および Figure 2-4 に示した通り、マイボーム腺中薬物濃度は周囲の眼瞼組織と比較して約 10～100 倍程度低い推移を示した。そこで、マイボーム腺への薬物移行経路に関する分布情報、特にマイボーム腺中央導管を介した点眼時薬物移行の可能性を評価するため、眼球および眼瞼オートラジオグラフィーを実施した(Figure 2-5 および Table 2-1)。

定量的眼球オートラジオグラフィーの結果、角膜には高い放射能濃度が認められた(176～590 ng eq/g)。続いて、強膜、網膜、脈絡膜および視神経付近にも放射能濃度が認められたが(10～278 ng eq/g)、幾つかの採取時点では定量下限界未満であった。一方、内眼部の組織である、水晶体、虹彩、毛様体および房水における放射能濃度は極めて低く(10～18 ng eq/g)、多くの採取時点では定量下限界未満であった。さらに、硝子体中放射能濃度は、全ての採取時点において定量下限界未満であった。各採取時点において個体差が認められた場合もあったが、全体的な分布量および分布状態は等しく比較可能だと考えられた。一方、定量的眼瞼オートラジオグラフィーの結果、眼瞼組織表面に著しく高い放射能濃度が広範囲に検出され、点眼液の存在が示唆された。しかしながら、この極めて高い放射能が周囲の組織へも干渉している可能性が強く疑われたため、眼瞼皮膚およびマイボーム腺における正確な放射能濃度の定量は出来なかった。

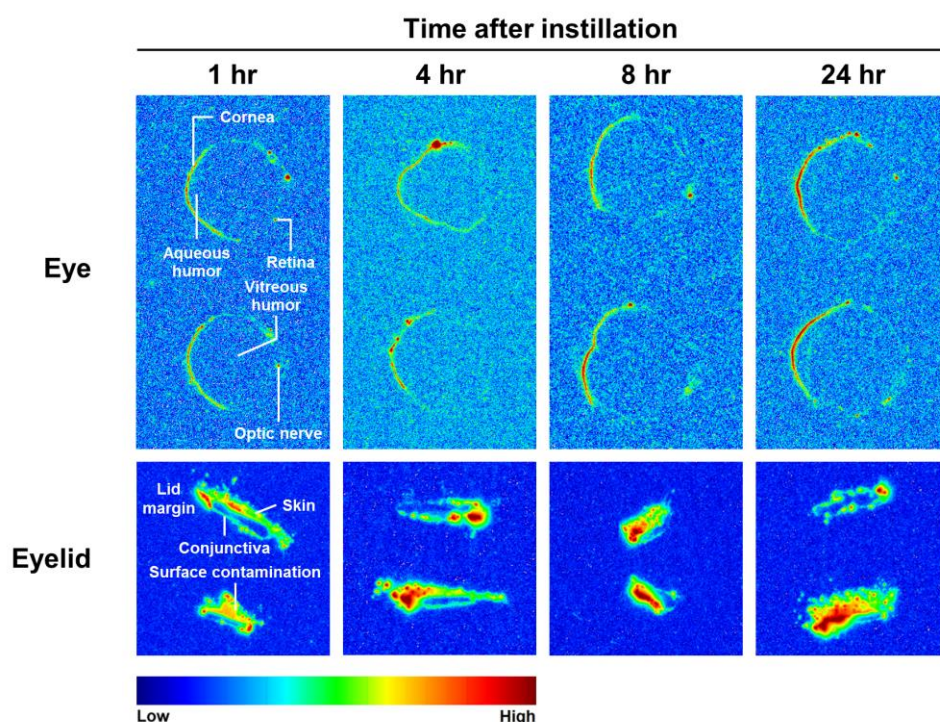


Figure 2-5. Time-course autoradiograms of eye and eyelid sections indicating the distribution of ¹⁴C-SA22465 following a single ocular administration (1.5 mg/50 µL/eye).

Table 2-1. Concentrations of radioactivity in the eyeballs and eyelids of male albino rabbits after ocular administration of [¹⁴C]-SA22465 at a nominal dose level of 1.5 mg/eye (Macroautoradiography)

| Animal number and gender | µg equivalents of SA22465/g of tissue | | | | | | | |
|--------------------------|---------------------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | 1, M | 2, M | 3, M | 4, M | 5, M | 6, M | 7, M | 8, M |
| Tissue | 1 hr | | 4 hr | | 8 hr | | 24 hr | |
| Aqueous humor | 0.015 | 0.010 | 0.011 | BLQ | BLQ | BLQ | BLQ | BLQ |
| Choroid | 0.038 | 0.018 | 0.023 | 0.012 | 0.013 | 0.043 | 0.019 | BLQ |
| Ciliary body | BLQ | BLQ | BLQ | BLQ | BLQ | BLQ | BLQ | BLQ |
| Cornea | 0.362 | 0.294 | 0.243 | 0.205 | 0.213 | 0.590 | 0.406 | 0.176 |
| Iris | BLQ | BLQ | 0.010 | BLQ | BLQ | BLQ | 0.012 | BLQ |
| Lens | 0.013 | BLQ | BLQ | BLQ | BLQ | BLQ | BLQ | BLQ |
| Optic nerve | 0.087 | 0.278 | 0.010 | 0.014 | 0.057 | 0.156 | BLQ | 0.231 |
| Pupil | 0.011 | BLQ | BLQ | BLQ | 0.018 | BLQ | BLQ | BLQ |
| Retina | 0.037 | BLQ | 0.018 | 0.015 | 0.020 | 0.018 | BLQ | 0.020 |
| Sclera | 0.093 | BLQ | 0.020 | 0.015 | 0.020 | 0.050 | BLQ | 0.021 |
| Vitreous humor | BLQ | BLQ | BLQ | BLQ | BLQ | BLQ | BLQ | BLQ |
| Lower eyelid | 32.9 | 3.61 | 9.29 | 12.6 | 33.7 | 5.61 | 15.3 | 27.6 |
| Meibomian gland | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND |
| Skin | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND |
| Upper eyelid | 7.03 | 2.65 | 0.462 | 3.97 | 0.192 | 1.08 | 0.351 | 0.952 |

Upper limit of quantification: 36.04 µg equiv/g for all measurements

Lower limit of quantification: 0.009 µg equiv/g for all measurements

BLQ - Tissue concentration below lower limit of quantification

ND - Not discernible

2.3.5 3% ¹⁴C-SA22465 懸濁液点眼後の眼球および眼瞼マイクロオートラジオグラフィー

Figure 2-5 に示した通り、定量的オートラジオグラフィーでは、眼瞼における薬物分布情報を正確に得ることは難しかった。そこで、相対的な半定量的評価法であるものの、検出感度が極めて高く、高解像度にて放射性化合物の局在および分布量を推定することが可能なマイクロオートラジオグラフィーを実施した (Figure 2-6 および Table 2-2)。

定量的眼球オートラジオグラフィーと同様に、角膜には最も多くの銀粒子が認められた。続いて、外眼部の組織である強膜、網膜、脈絡膜および視神経付近には中程度の銀粒子が認められ時間依存的な増加傾向も観察された。毛様体および虹彩にも同程度の銀粒子が認められたが、内眼部の組織である水晶体、房水および硝子体には銀粒子は少なかった。また眼瞼組織表面には極めて多くの銀粒子が観察され、点眼液の存在が示唆された。また、毛髪および毛根にも比較的多くの銀粒子が観察されただけでなく、瞬膜にも銀粒子が認められた。一方、マイボーム腺には中程度の銀粒子が認められたが、マイボーム腺中央導管には、銀粒子はほとんど認められなかった。各採取時点において個体差は認められず、全体的な放射性化合物の局在および分布量は比較可能だと考えられた。なお、陽性対象試料は光暴露により黒化させ、マイクロオートラジオグラフィーの操作手技が問題無かったことを確認した。

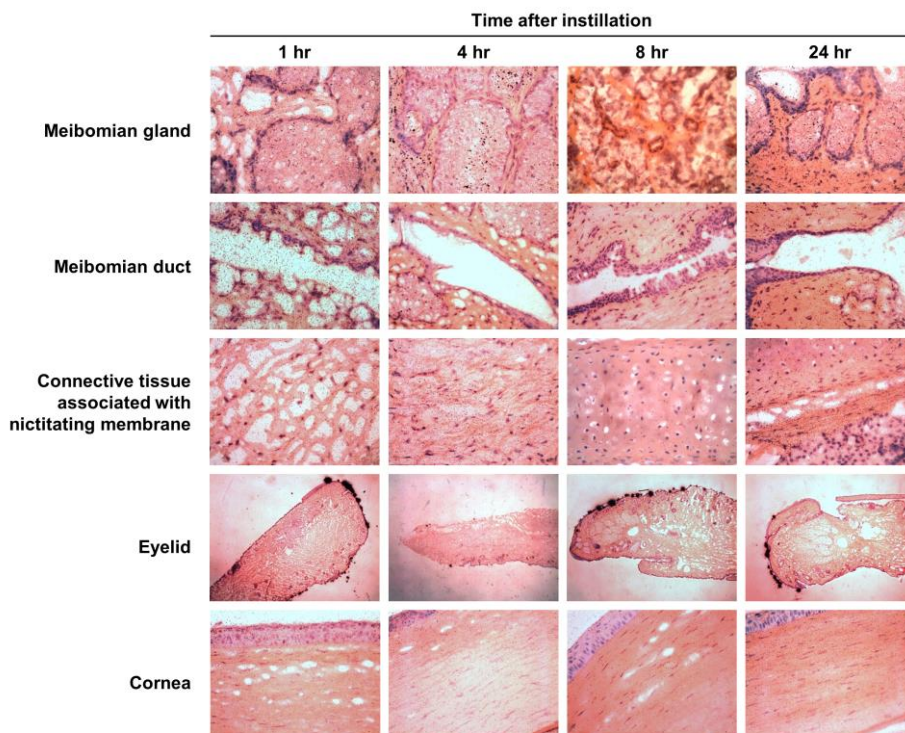


Figure 2-6. Time-course micrographic distribution of ¹⁴C-SA22465 in the meibomian gland, meibomian duct, connective tissue associated with nictitating membrane, eyelid and cornea following a single ocular administration. Magnification: × 2.5 for eyelids, × 20 for other tissues

Table 2-2. Qualitative assessment of radioactivity in the eyeball and eyelid after ocular administration of [¹⁴C]-SA22465.

| Animal number and gender | 1, M | 2, M | 3, M | 4, M | 5, M | 6, M | 7, M | 8, M |
|---------------------------|----------------------------------|------|------|------|------|------|-------|------|
| Tissue | 1 hr | | 4 hr | | 8 hr | | 24 hr | |
| Eye | | | | | | | | |
| Lens | + | + | + | + | + | + | + | + |
| Cornea | ++ | ++ | ++ | +++ | ++ | ++ | ++ | + |
| Ciliary body ¹ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | ++ | ++ | ++ |
| Iris | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ |
| Pupil | + | + | + | + | + | + | + | + |
| Choroid | ++ | ++ | +++ | +++ | +++ | ++ | ++ | ++ |
| Retina | + | + | +++ | +++ | ++ | ++ | ++ | ++ |
| Sclera | +++ | +++ | +++ | +++ | ++ | ++ | ++ | ++ |
| Optic nerve | ++ | ++ | +++ | +++ | + | + | ++ | ++ |
| Aqueous humor | + | + | + | + | + | + | + | + |
| Vitreous humor | + | + | + | + | + | + | + | + |
| Eyelids | | | | | | | | |
| Meibomian gland | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ |
| Meibomian duct | + | + | + | + | 0 | 0 | + | + |
| Connective tissue | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ |
| Nictitating membrane | ++ | ++ | +++ | +++ | ++ | ++ | ++ | NS |
| Hair follicles | ++ | ++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ |
| Surface contamination | ++++ | ++++ | ++++ | ++++ | ++++ | ++++ | ++++ | ++++ |
| Positive control | ++++ slides completely blackened | | | | | | | |

++++ = very high levels of silver grains present
 +++ = high levels of silver grains present
 ++ = moderate levels of silver grains present
 + = low levels of silver grains present
 0 = Background levels of silver grains
¹ = Elevated levels compared to quantitative assessment due to pressure artifacts caused by creasing/folding of the tissue against the nuclear emulsion.
 NS - Not sectioned

第4節 考察

本章では、マイボーム腺における薬物動態評価に先立ち、ウサギマイボーム腺の組織採取法を開発した(Figure 2-1)。新規確立したマイボーム腺採取法により、マイボーム腺中薬物濃度を簡便、正確かつ高い再現性で測定することが可能となった。従来法(非凍結下にて、手術用ハサミおよび固定鑷子を用いてマイボーム腺を採取)にて実施した過去の社内検討では、各測定値における標準誤差は大きく、薬物濃度推移に急激な増減が認められるなど、妥当性は乏しかった(data not shown)。一方、本研究において確立したマイボーム腺採取法は、眼瞼組織表面に存在するコンタミネーション要因を可能な限り排除しているため、各測定値における標準誤差は明らかに小さくなった。さらに、得られた薬物濃度推移も周囲の眼瞼組織と類似していたことから信頼性の高い測定値が得られたと判断出来る。

SA22465 およびリン酸ベタメタゾンの両化合物点眼時における、各組織中濃度を比較すると、マイボーム腺開口部中濃度が最も高かった(Figure 2-3 および Figure 2-4)。本結果は、点眼液量および瞬目で説明可能と考える。まず眼組織におけるウサギとヒトの解剖学および生理学的な種差は、角膜の厚みや瞬膜の有無、涙液のターンオーバーなどが挙げられるものの、大きさや構造および涙液量は類似している⁵⁴⁾。そのため、ウサギは眼内薬物動態研究で最も汎用されている実験動物である。ヒトにおける一般的な点眼液量は、25~75 μL になるよう調整されているが、約 20 μL の点眼液量で涙液中薬物濃度は最大に達するとの報告がある⁵⁵⁾。また瞬目一回により約 2 μL の涙液が鼻涙管を介して排出されると報告されているが、同時に過剰な液量は眼表面より溢れ出る⁵⁶⁾。すなわち、本研究において設定したウサギにおける点眼液量 50 μL では、点眼直後は表面張力により眼表面に滞留しているが、瞬目で溢れた点眼液は眼瞼縁に接触して高濃度の曝露を引き起こしている可能性が高い。さらに眼瞼縁(睫毛を含む)は、通常涙液が接触せずクリアランス効果が期待できないため、長期間高濃度を維持しながら点眼液が結晶化する可能性すらある。実際、リン酸ベタメタゾン水溶液点眼時のマイボーム腺開口部(眼瞼縁)中濃度が、点眼直後、約 2.3 時間の半減期で消失したにも関わらず、投与後 8 時間以降において消失しなかったことは、眼瞼縁においてリン酸ベタメタゾン点眼液が結晶化した可能性を支持している。したがって、マイボーム腺中薬物濃度を過大評価せずに正確に測定するためには、眼瞼縁(マイボーム腺開口部)を切除することが極めて重要と言える。また眼瞼結膜上皮中濃度は、マイボーム腺開口部未満、マイボーム腺以上の濃度推移を示した。眼瞼結膜上皮は外眼部組織であり点眼後初期は高濃度の薬物に曝露されるが、涙液で希釈されつつ鼻涙管を経て次第に消失するため、本結果は妥当と考えられた。

リン酸ベタメタゾン水溶液点眼時におけるマイボーム腺中濃度は、眼瞼結膜上皮と比較して約 4 倍低かった(Figure 2-4)。マイボーム腺は、眼瞼結膜上皮から内側へ約 400 μm に位置し、線維性結合組織である瞼板に囲まれているため、マイボーム腺中薬物濃度はフィックの拡散法則に基づき濃度勾配的に減少すると推測される。したがって、眼瞼結膜上皮とマイボーム腺におけ

る濃度差自体は妥当な結果である。しかしながら、約 4 倍の濃度差について、瞼板を移行し難い薬物透過障壁と捉えるか、距離的な濃度勾配(単純拡散)のみで説明可能と考えるかは、化合物の物理化学的性質にも左右されるため難しい。一方、点眼時における薬物吸収は、点眼液の基剤成分にも影響されることは広く知られており、一概に、異なる製剤間における薬物吸収を論じることは難しいものの、Garasone[®]点眼液(リン酸ベタメタゾンナトリウムと硫酸ゲンタマイシンの配合点眼液)の添付文書には、リン酸ベタメタゾンの吸収は速く、房水および角膜中濃度は 0.48 および 1.76 $\mu\text{g/g}$ へ到達したと記載されている⁵⁷⁾。房水と角膜の濃度差は、眼瞼結膜上皮とマイボーム腺の濃度差と同じく約 4 倍であるが、興味深いことにウサギの角膜厚も約 400 μm であり⁵⁸⁾、眼瞼結膜上皮からマイボーム腺中央導管までの距離と等しい。さらに角膜は、組織学的にも瞼板と同じく線維性結合組織が豊富である。したがって、眼瞼結膜上皮からマイボーム腺に至るまでに存在する瞼板は、薬物透過障壁としては角膜に近い可能性が考えられた。なお導かれた仮説は、リン酸ベタメタゾン水溶液点眼時のみならず SA22465 懸濁液点眼時においても当てはまった。つまり、SA22465 点眼時における眼瞼結膜上皮とマイボーム腺における濃度差(約 100 倍、Figure 2-3)は、過去の社内実験において確認された房水と角膜における濃度差(約 200 倍、data not shown)と近かった。しかしながら、眼瞼結膜上皮からマイボーム腺に至るまでの薬物透過障壁の本質は、本章の結果のみで判断することは難しく、今後の更なる検証が必要と考えられた。なお、SA22465 のグルココルチコイド受容体に対する IC_{50} は *in vitro* 実験系において 23.6 ng/mL と算出されている。したがって、1 $\text{mL} = 1 \text{g}$ と仮定した場合、単回点眼後のマイボーム腺中濃度推移は IC_{50} を若干上回る程度(16~171 ng/g)であった。同様に、リン酸ベタメタゾンナトリウムの IC_{50} は 67.1 ng/mL である。したがって、単回点眼後のマイボーム腺中濃度推移は、投与後 4 時間までは IC_{50} を上回ったものの(C_{max} : 189 ng/g)、投与後 8 時間では IC_{50} 未満であった。

マイクロオートラジオグラフィーにより、点眼時の眼瞼における詳細な薬物分布が視覚的に解明された(Figure 2-6、Table 2-2)。例えば、毛根には高い放射能が確認され、微量の点眼液が毛穴へ堆積したためと推察されたが、同時に毛根を介した薬物移行の可能性も示唆している。実際、オクタノール/水分配係数($\text{Log } K_{\text{o/w}}$)が 0 未満の化合物は、局所投与された場合、毛根を介した薬物移行の寄与が比較的大きいと考えられている⁵⁹⁾⁶⁰⁾。しかしながら、本章において使用した SA22465 および代謝物である SA22313 は、 $\text{Log } K_{\text{o/w}}$ が 5 以上の脂溶性化合物である。またマイボーム腺は皮脂腺とは異なり瞼板中に埋没しており、毛根との直接的な関連性も乏しいため、¹⁴C-SA22465 点眼時において毛根に高い放射能が確認されたものの、毛根を介したマイボーム腺への薬物移行の寄与度は低いと考えられた。一方、瞬膜は眼球と眼瞼の間にある半透明の膜であり、眼瞼結膜および眼球結膜と連動して眼球を保護・保湿する役割を担っているが、瞬膜および付随する眼瞼結合組織においても比較的高い放射能が認められ、¹⁴C-SA22465 が吸収された結果と推察された。実際、瞬膜が点眼時の薬物貯蔵庫として働く可能性を示唆する報告⁶¹⁾もあり妥当性が高い。しかしながら、霊長類は瞬膜を有していない。したがって、瞬膜の代わり

に眼瞼結膜および眼球結膜への薬物曝露が相対的に増加すると予測されるため、特にヒトでは、マイボーム腺への点眼時薬物移行として経結膜的経路の関与が示唆された。一方、マイボーム腺中央導管における放射能はほとんど認められず、マイボーム腺中央導管を介したマイボーム腺への点眼時薬物移行の可能性は極めて低いと考えられた。本結果は、マイボーム腺における脂質分泌で説明可能と考える。一般的な皮脂腺では、1つの導管に対して1つの腺房が連結しているが、マイボーム腺では、1つの中央導管に対して15以上の腺房が連結しているため、基本的な脂質分泌能は活発であると判断出来る。さらに、マイボーム腺開口部付近に存在するリオラン筋の収縮により脂質供給は更に積極的に促されるため⁶²⁾、マイボーム腺中央導管には恒常的に脂質が満たされており、その結果、薬物移行が妨げられている可能性が高い。

前述したとおり、マイボーム腺への点眼時薬物移行として経結膜的経路の関与が示唆されたが、結膜は血管およびリンパ管が発達しており、全身循環血への薬物移行経路としても働くため、眼局所 Bioavailability の観点からは非効率と考えられている⁶³⁾。したがって、結膜嚢挿入剤あるいはフィルム製剤など、投与後結膜における薬物滞留性を意図的に高められる剤型が望ましい。また上記の製剤は点眼液とは異なり、眼瞼縁への Overflow が無いため、不要な薬物曝露(副作用)を回避できる利点もある。一方、眼瞼皮膚は生体内で最も薄い皮膚組織であり⁶⁴⁾、透過障壁が少ないと推定されるため、美容的な課題を解決すれば、眼瞼皮膚を介したマイボーム腺への薬物移行戦略もあり得る。特に、眼瞼皮膚を介した局所投与では、薬剤は涙液で希釈されず、結膜の毛細血管系による薬物全身移行を抑えられる、さらに投与が比較的簡便であるなど利点も多い。ただし、皮膚のバリア機能は表皮角質細胞の数だけでなく大きさにも依存するため⁶⁵⁾、今後の更なる検証が必要と考えられる。その他、マイボーム腺への薬物移行性を高める工夫として、油性基剤を用いた点眼液が有用であるとの報告があり⁶⁶⁾、メイバム構成成分と物理化学的性質が近い油性基剤を用いることで、薬効を最大限に出来ると主張している。一般的に、薬効は薬理学的作用と薬物濃度の総和として表現されるが、上記の報告では、薬物動態学的な検討は一切実施されていないため、本研究において確立された薬物移行評価系を用いて更なる検証が必要である。このように、本研究において確立された薬物移行評価系は、化合物の選択だけでなく、処方や剤型の最適化を含めた様々な研究開発での展開が可能であり実用性も高い。さらに、疾患モデル動物を用いた薬物移行評価も、本研究で開発したマイボーム腺採取法を活用することで技術的には十分可能である。しかしながら、MGD 疾患モデル動物は眼瞼の炎症あるいは浮腫を併発している可能性が高く、個体によっては腫脹および裂傷などが認められる場合も考えられる。このような病態の個体差は過剰な薬物曝露へ繋がり、結果としてマイボーム腺中薬物濃度を過大評価する恐れがある。したがって、本研究において確立された薬物移行評価系を疾患モデル動物に応用する場合、眼瞼の組織学的状態を最も考慮すべきである。

以上、本章では、簡便かつ頑健性の高いウサギマイボーム腺採取法を開発して、マイボーム腺における薬物動態評価に最適な動物実験系を確立した。さらに、本評価系を用いて、ウサギ

単回点眼時におけるマイボーム腺への薬物移行量は、点眼液の処方（溶解型点眼液あるいは懸濁型点眼液）に関わらず、周辺の眼瞼組織と比較して 10～100 倍低いことを明らかにした。さらに、点眼時におけるマイボーム腺への薬物移行はマイボーム腺中央導管を介している可能性は低く、結膜を介した寄与が示唆された。

第3章 アジスロマイシン点眼時のマイボーム腺への移行性評価

第1節 緒言

近年、質量分析計(Mass spectrometry: MS)の発展は目覚ましく、優れた特異性、高い検出感度および分析網羅性という理由から、生命科学分野において不可欠な研究ツールとなっている。また既に、質量分析と形態学的解析を組み合わせた概念は MS イメージングとして注目を集めており、最先端の MS イメージング法としてマトリックス支援レーザー脱離イオン化法(Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization: MALDI)、脱離エレクトロスプレーイオン化法(Desorption ElectroSpray Ionization: DESI)あるいはイオンモビリティ分光法(IonMobility Spectrometry: IMS)などが知られている。このうち MALDI は、高解像度の組織イメージング画像が得られる反面、試料をイオン化するためマトリックスの塗布が必須であり、標本を真空下で分析する必要がある。一方、DESI は大気圧下での直接分析が可能だけでなく、試料へのマトリックスの塗布も不要であり、試料調製の手間が最小限で済むためコンタミネーションが発生する確率が低い⁶⁷⁾。したがって、DESI イメージングは、第1章で実施したオートラジオグラフィーの結果および知見を補完するだけでなく、解像度が許容範囲内であれば、短時間かつ効率的に組織イメージング画像が得られるため、MGD 治療薬開発における薬剤スクリーニングに活用できる可能性もある。さらに、眼瞼における MS イメージングは広範囲かつ詳細にマイボーム腺中濃度のダイナミクスを追える可能性があるため、作用標的部位の絞り込みにおいても複合的な判断が可能となる。

アジスロマイシン点眼液(AzaSite[®])は、米国にて結膜炎に対する治療剤として承認されているが、MGD に対して最も頻繁に適用外使用されている薬剤である⁶⁸⁾⁶⁹⁾。アジスロマイシンは幅広い抗菌スペクトルを有するほか、炎症性サイトカインの産生抑制、脂質組成の正常化などの幾つかの薬理作用が知られており、実際、複数の臨床試験でアジスロマイシン点眼液による MGD の自覚症状と他覚所見の有意な改善が報告されているが⁷⁰⁾⁷¹⁾⁷²⁾、マイボーム腺中濃度を検討した報告は無い。アジスロマイシンは、一般的に組織移行性が良いと考えられており、過去の臨床試験において認められている有効性を考察するうえで、アジスロマイシン点眼時におけるマイボーム腺での薬物動態情報は極めて興味深い。

そこで本章では、確立したウサギマイボーム腺採取法を用いて、アジスロマイシン点眼時におけるマイボーム腺への薬物移行量を正確かつ定量的に評価すること、さらに DESI イメージングを用いて周辺の眼瞼組織と分布量の差を可視化するのみならず、創薬研究ツールとしての有用性を検証することを目的とした。

第2節 実験方法

試薬

化合物

アジスロマイシンは東京化成工業(Tokyo, Japan)から購入した。内標準物質(エリスロマイシン)は参天製薬 奈良研究開発センターにおいて合成された。

点眼液

AzaSite[®](1%アジスロマイシン水性点眼液)は Inspire Pharmaceuticals (Raleigh, NC, USA) から入手した。

実験動物

使用動物及び飼育方法

雄性日本白色ウサギ(約 1.6~2.1 kg)は、参天製薬株式会社 奈良研究開発センターにて、自由に水及び固形飼料を摂取させて飼育した。なお、実験動物の取り扱いについては参天製薬株式会社 動物実験委員会が作成した「動物実験倫理指針」に従った。

点眼方法

マイクロピペットを用いて、点眼液を各ウサギの両眼角膜上に点眼した(50 μ L/eye)。

Azasite[®]点眼後のウサギ眼瞼結膜、眼瞼結膜上皮、マイボーム腺開口部およびマイボーム腺中アジスロマイシン濃度の測定

組織採取

眼瞼結膜、眼瞼結膜上皮、マイボーム腺開口部およびマイボーム腺採取方法は、「眼瞼結膜上皮、マイボーム腺開口部、マイボーム腺中 SA22465 および SA22313 濃度の測定」の項目にて前述した方法とほぼ同じである。なお眼瞼結膜は、動物の死亡確認直後、手術用ハサミ(直剪刃)および固定鑷子を用いて採取した。またアジスロマイシンは、試料ホモジネート液中にて代謝される可能性が低いと見られるため、試料採取容器には有機溶媒を含めず、超純水 100 μ L およびステンレスビーズ(ϕ 3 mm: 2 粒)を予め添加した。

LC-MS/MS 分析法バリデーション

LC-MS/MS 分析法バリデーションにおける許容基準は、各国の BMV ガイドラインと併せて、以下の値で設定した。

- 真度(%) : $\pm 15\%$ 以内(定量下限界は $\pm 20\%$)
- 精度(%) : $\pm 15\%$ 以内(定量下限界は $\pm 20\%$)
- 安定性(%) : 85~115%

開発した分析法は、特異性、直線性、日内再現性およびキャリーオーバーについて確認した。

前処理法

凍結保存した組織試料を融解した後、組織重量を測定した。ビーズ式多検体細胞破碎装置 (Shake Master Auto) を用いてホモジナイズ (1,100 rpm, 30 分間) した後、アセトニトリル 400 μL を添加して攪拌した。11,000 g、10 分間、4°C で遠心分離した後、上清を眼瞼結膜、眼瞼結膜上皮、マイボーム腺開口部およびマイボーム腺ホモジネート液としてエッペンチューブへ移した。次表に従い、エッペンチューブにブランク眼瞼板ホモジネート液 5 μL 、アジスロマイシン標準溶液 20 μL 、内標準溶液 20 μL 、水/アセトニトリル (50:50, vol%) 100 μL の順に添加し、攪拌した (各濃度 n=1)

| Sample Name | アジスロマイシン標準溶液 | | | 内標準溶液 (μL) | ブランク眼瞼板 (μL) | 組織中濃度 (ng/mL) |
|-------------|--------------|------------|-----------------------|-------------------------|---------------------------|---------------|
| | ID | 濃度 (ng/mL) | 添加量 (μL) | | | |
| STD8 | WSS8 | 1000 | 20 | 20 | 5 | 4000 |
| STD7 | WSS7 | 500 | 20 | 20 | 5 | 2000 |
| STD6 | WSS6 | 250 | 20 | 20 | 5 | 1000 |
| STD5 | WSS5 | 50 | 20 | 20 | 5 | 200 |
| STD4 | WSS4 | 25 | 20 | 20 | 5 | 100 |
| STD3 | WSS3 | 10 | 20 | 20 | 5 | 40 |
| STD2 | WSS2 | 5 | 20 | 20 | 5 | 20 |
| STD1 | WSS1 | 2.5 | 20 | 20 | 5 | 10 |
| Zero | MeOH | | 20 | 20 | 5 | - |
| DB | MeOH | | 20 | MeOH (20) | 5 | - |

LC-MS/MS 分析条件

質量分析装置は、ESI プローブを装着した三連四重極型質量分析計 TSQ Quantum Ultra (Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA) を使用した。さらに、高速液体クロマトグラフィー (Prominence UFLC system, Shimadzu, Kyoto, Japan) を連結させて LC quan ver. 2.5 および Xcalibur1.4 (Thermo Fischer Scientific) を用いて制御した。その他、測定イオンや各種パラメータ (ガス流量、温度) およびクロマトグラフィー分離等の LC-MS/MS 測定条件は次表に示した。

| | | | | |
|--------------------------------|--|-------|-------|---|
| Analyte | Azithromycin | | | |
| LC-MS/MS system | UFLC / TSQ Quantum Ultra | | | |
| Column | Xbridge Phenyl, 2.5 μm , 2.1 mm i.d.x30 mm (Waters) | | | |
| Column temperature | 40°C | | | |
| Injection volume | 5 μL | | | |
| Sample cooler | 4°C | | | |
| Mobile phase | (A) 0.1% formic acid (B) 0.1% formic acid acetonitrile | | | |
| Gradient program and flow rate | Time (min) | A (%) | B (%) | Flow rate ($\mu\text{L}/\text{min.}$) |
| | 0.00 | 70 | 30 | 250 |
| | 8.00 | 57 | 43 | 250 |
| Ion source | Turbo ion spray (positive mode) | | | |
| Monitoring ions | Azithromycin: m/z 749.5 \rightarrow m/z 591.30 | | | |
| Divert valve | 0.0-0.3 min: To waste 0.3-8.0 min: To MS | | | |
| Run time per sample | 8.0 min | | | |

データ処理方法

ピークの同定、ピーク面積値の算出、検量線の作成には LC quan ver. 2.5 (Thermo Electron, Bremen, Germany) を用いた。各組織中濃度は、各測定対象標準物質と対応する内標準物質のピーク面積比による内標準法を用いて算出した。検量線は内標準物質に対する各測定対象標準物質のピーク面積比 (y) と設定濃度 (x) との関係から、最小二乗法により作成した。重み付けは $1/x^2$ とした。

$$y = ax + b$$

x: 設定濃度
y: ピーク面積比
a: 検量線の傾き
b: y 軸切片

組織中アジスロマイシン濃度の算出

組織中アジスロマイシン濃度の算出には LC quan ver. 2.5 を用いた。検量線の逆回帰値、QC 試料及び測定試料の測定値は、次式に従い算出した。

$$X = (Y - b) / a$$

X: 検量線の逆回帰値あるいは QC 試料および測定試料の測定値
Y: 検量線、QC 試料あるいは測定試料のピーク面積比

MS イメージングによる Azasite[®] 点眼後のウサギ眼瞼中アジスロマイシン局在の解析

組織採取

Azasite[®] 点眼後 2 時間にペントバルビタールナトリウム (商品名: ソムノペンチル[®]) 約 4 mL をウサギ耳静脈に投与し、過剰投与により安楽殺処分した。動物の死亡確認後、電動バリカンを用いて眼瞼周囲の毛を刈った。さらにディスポーザブルシリンジに充填した生理食塩液 50 mL を用いて眼表面を洗眼した後、角膜および眼瞼を採取した。採取した角膜および眼瞼は、生理食塩液 10 mL が充填されたチューブにて Voltex により組織表面を洗浄した後に、上皮細胞の剥離に注意しながら、液体を濾紙で拭き取り、液体窒素あるいはドライアイスにより急速凍結させた。なお角膜は半割した後、水平を保つよう急速凍結させた。一方、眼瞼も水平を保つよう急速凍結させたが、必要に応じて中央より半割し、端を切断した後に凍結させた。凍結した各組織は、サランラップで包み、乾燥を避けるためチャック付ビニール袋へ入れてドライアイス下にて凍結保存した。さらに、予め冷やした少量の氷と共に、凍結切片作成まで -80°C にて凍結保存した。

凍結切片の作成:眼瞼(水平面)、眼瞼および角膜(横断面)

水平に凍結された眼瞼は、生理食塩液を用いて凍結試料台に固定した。薄切は結膜面より行い、30 μm 厚の凍結切片を伸ばしながら作成し、スライドガラス上に貼付した。なお、マイボーム腺付近の連続切片作製が終了したら、150 μm 毎に(30 μm 厚の連続切片 5 枚を廃棄する毎に) 30 μm 厚の凍結切片を採取した。

予め半割および水平に凍結された眼瞼は、OCT Compound を用いて、試料の半分程度を埋没させながら凍結試料台に固定した。薄切は 30 μm 厚の凍結切片を伸ばしながら作成し、スライドガラス上に貼付した。適宜、顕微鏡にて標本を観察しながら、マイボーム腺開口部が認められるまで貼付を続けた。

予め半割および水平に凍結された角膜は、OCT Compound を用いて、試料の半分程度を埋没させながら凍結試料台に固定した。薄切は 30 μm 厚の凍結切片を伸ばしながら作成し、スライドガラス上に貼付した。採取した全ての凍結切片は、冷風にて完全に乾燥させた。乾燥後、シリカゲルを入れたプレパラートボックス内へ収納し、ビニールテープで密封した後、DESI イメージングまで -80°C にて凍結保存した。

DESI イメージング

DESI イメージングは 2D Omni spray(Prosolia Inc., Indianapolis, IN, USA)をイオン源として装着したりニアイオントラップ型質量分析計(LTQ, Thermo Fisher Scientific)を使用した。イメージングデータ形式の変換は FireFly(Prosolia)で行った。また質量イメージング画像は BioMAP(Novartis, Basel, Switzerland)を使用して構築した。DESI イメージングに先立ち、ピーク同定および検出感度確認のため、50 ng/mL アジスロマイシン標準溶液 2 μL をブランク試料へ塗布して標準試料を作成した。検出されたイオン強度は相対比(0~100%)として疑似色により表示した。

統計解析

実験データは、平均値 \pm 標準誤差(mean \pm SE)で示した。ただし、定量下限界未満の値は BLQ と表示し、BLQ を 0 として平均値を算出した。また過半数例以上が BLQ の場合、平均値は算出せず BLQ と報告した。

第3節 結果

3.3.1 アジスロマイシン水溶液(AzaSite[®])点眼後の眼瞼結膜、眼瞼結膜上皮、マイボーム腺開口部、マイボーム腺中アジスロマイシン濃度の測定

開発したウサギマイボーム腺採取法を用いて、1%アジスロマイシン水溶液(AzaSite[®])単回点眼後の眼瞼結膜、眼瞼結膜上皮、マイボーム腺開口部およびマイボーム腺中濃度を測定した(Figure 3-1)。その結果、眼瞼結膜上皮中アジスロマイシン濃度は、投与後 30 分に 1032.8 $\mu\text{g/g}$ を示した。また眼瞼結膜、マイボーム腺開口部およびマイボーム腺中アジスロマイシン濃度は、各々226.1、82.0 および 0.8 $\mu\text{g/g}$ を示した。いずれの組織においてもアジスロマイシン濃度は投与後 30 分から2時間にかけて大きく変わらず、同程度の濃度を維持した。以上より、アジスロマイシン水溶液単回点眼後の各組織中濃度推移を比較すると、アジスロマイシン濃度は、眼瞼結膜上皮 > 眼瞼結膜 > マイボーム腺開口部 > マイボーム腺であり、各組織間では約 5~100 倍程度の濃度差が認められた。

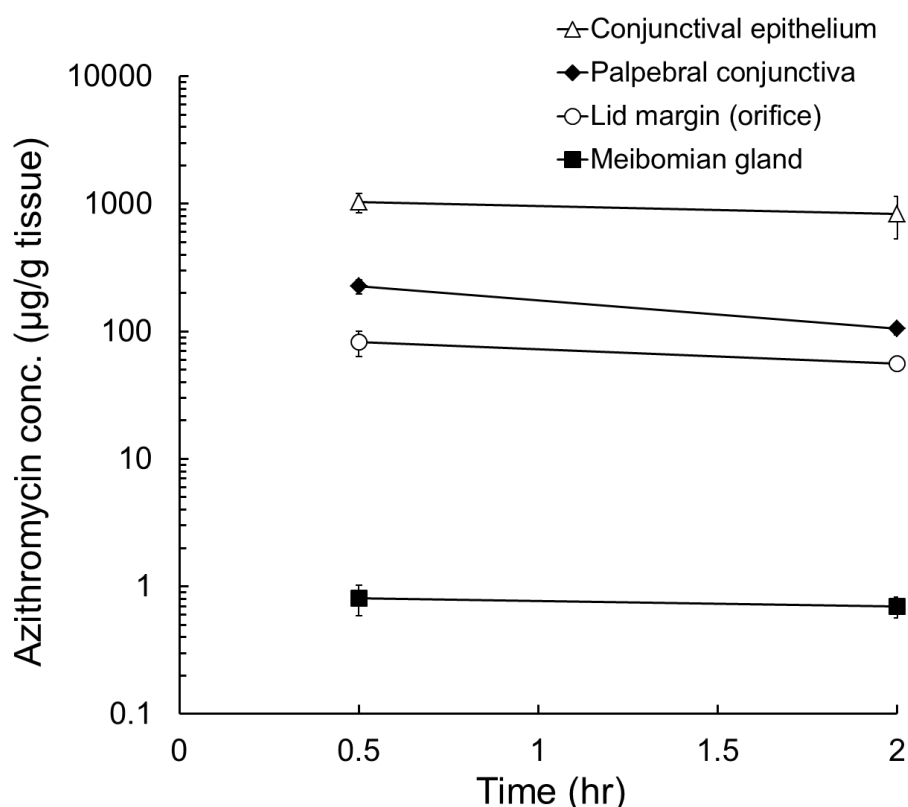


Figure 3-1. Azithromycin concentrations in the conjunctival epithelium, palpebral conjunctiva, lid margin, and meibomian glands following a single instillation of AzaSite ophthalmic solution in rabbits.

Values represent the means \pm SE (n = 4 eyes per group).

3.3.2 アジスロマイシン水溶液 (AzaSite®) 点眼後の角膜および眼瞼中薬物の MS イメージング

Figure 3-1 に示した通り、マイボーム腺中アジスロマイシン濃度は周囲の眼瞼組織と比較して約 100 倍以上低い推移を示した。そこで、異なる分析手法を用いて本結果の再現性と妥当性を確認しつつ、さらにマイボーム腺への移行経路に関する分布情報を得るため MS イメージングを実施した。

MS イメージングの結果、高濃度の点眼液に直接曝露される角膜において、角膜上皮側では強い MS シグナルが検出されたが、角膜内皮側では MS シグナルは検出されなかった (Figure 3-2:A)。さらに眼瞼矢状断面において、MS シグナルは眼瞼結膜および睫毛に認められたが、眼瞼内部のマイボーム腺および中央導管付近には認められなかった (Figure 3-2:B)。眼瞼水平面においても、マイボーム腺には MS シグナルは検出されなかったが、背後の眼瞼結膜には比較的強い MS シグナルが検出された (Figure 3-2:C)。加えて、やや眼瞼皮膚側で薄切された眼瞼水平面において、眼瞼縁には強い MS シグナルが検出されたが、眼瞼内部の眼輪筋では認められなかった (Figure 3-2:D)。

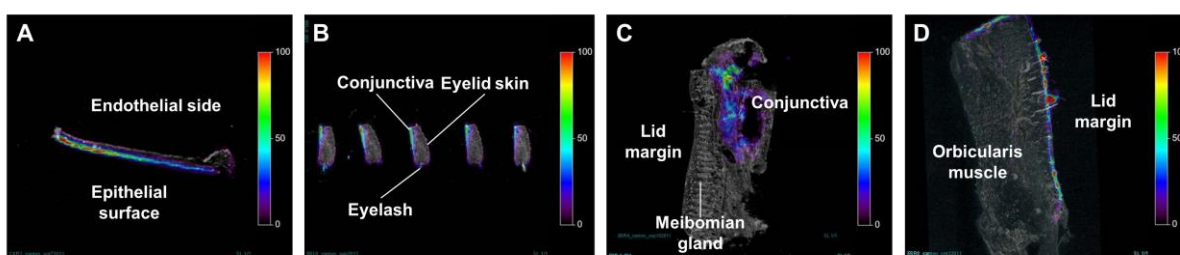


Figure 3-2. DESI-MS/MS imaging of azithromycin in the cornea (A), sagittal eyelid sections (B), and horizontal eyelid sections (C: tarsal plate level, D: orbicularis muscle level) 2 hours after a single ocular administration.

Each image represents the relative abundance of azithromycin molecular ion.

第4節 考察

本章では、確立した薬物移行評価系を用いてマイボーム腺および周辺の眼瞼組織中アジスロマイシン濃度を測定した(Figure 3-1)。アジスロマイシンは薬理学的特徴が比較的明らかなマクロライド系抗生物質であり、その薬理効果は抗菌活性と抗炎症作用に基づくと考えられている⁶⁸⁾。また一般的な細菌性結膜炎の起炎菌に対するアジスロマイシンの MIC₉₀ (Minimum Inhibitory Concentration 90)は 4 µg/mL 未満と報告されている⁷³⁾。米国食品医薬品局(Food and Drug Administration: FDA)が薬事承認している AzaSite[®]の用法・用量は、1日2回2日間点眼後、1日1回5日間点眼とされており、上記の用法にしたがって7日間反復点眼後におけるウサギ眼瞼中アジスロマイシン濃度は、C_{max}として 180 µg/g と報告されている⁷⁴⁾。しかしながら、本章において単回点眼後におけるマイボーム腺中アジスロマイシン濃度は 0.8 µg/g であり、MIC₉₀にも到達していなかった(Figure 3-1)。本結果は、第2章で考察したとおり、新規開発したマイボーム腺採取法は眼瞼表面のコンタミネーション要因を排除しているため、正確な定量値を示した結果と考えられる。一方、眼瞼結膜上皮、眼瞼結膜およびマイボーム腺開口部は、MIC₉₀よりも高い濃度を示したため、アジスロマイシンは上記の眼瞼組織においては十分な抗菌作用を示すと考えられた。

またアジスロマイシンには、直接的な抗菌効果とは別の免疫調節および抗炎症作用が知られており、実際に、ヒト眼瞼縁および結膜において、炎症性サイトカインである Interleukin (IL)-1β、IL-8 および Matrix Metalloproteinase (MMP)-9 の発現抑制、さらに Transforming Growth Factor (TGF)-β1 の発現正常化が報告されている⁷⁵⁾。しかしながら、上記の報告で使用されているヒト眼瞼縁および結膜試料は、インプレッションサイトロジー法を用いて数層の上皮細胞を剥離・採取しているに過ぎず、当然、高濃度の薬物曝露を受けていると容易に想定される。実際、本章で測定した組織中アジスロマイシン濃度においても、眼瞼結膜上皮が最も高く、1032.8 µg/g であった(Figure 3-1)。上記の炎症性サイトカインに対して発現抑制作用が期待されるアジスロマイシンの有効濃度は *in vitro* 実験系において 20 µM と報告されている⁷⁶⁾⁷⁷⁾。したがって 1 mL = 1 g と仮定した場合、アジスロマイシン 20 µM は約 16 µg/g と換算されるため、アジスロマイシンの免疫調節作用および抗炎症作用は、外眼部組織である眼瞼結膜上皮、眼瞼結膜、マイボーム腺開口部では期待できるものの、眼瞼内部に存在するマイボーム腺では期待できない可能性が示唆された。

さらに近年、ヒト由来不死化マイボーム腺上皮細胞に対するアジスロマイシンの脂質合成あるいは改善作用が報告されている²³⁾⁷⁸⁾。実際、アジスロマイシン点眼治療により、MGD の自覚症状および他覚所見が改善され、メイバムの物理化学的性質も正常に回復したとの臨床報告も存在する⁷¹⁾⁷⁹⁾。また、特殊飼料給餌により誘発した MGD 疾患マウスにおいてもアジスロマイシン点眼により、マイボーム腺開口部の閉塞および腺房の萎縮が改善したとの報告もある¹²⁾。上記一連の報告は、マイボーム腺の分泌腺房へ必要十分量のアジスロマイシンが移行しているとい

う前提に基づけば解釈可能であるが、脂質改善作用が認められるアジスロマイシンの有効濃度は、*in vitro* 実験系において 10 µg/mL と報告されており⁷⁸⁾、単回点眼後におけるマイボーム腺中アジスロマイシン濃度が 0.8 µg/g であったため、必要有効濃度には到達していなかった (Figure 3-1)。したがって、アジスロマイシン単回点眼後におけるマイボーム腺中濃度は、マイボーム腺開口部および眼瞼結膜上皮と比較して、100~1000 倍低く、十分な薬理作用を発揮するほど曝露されていない可能性がある。なお本結果は正常動物を使用した薬物移行評価系により導かれたものであり、薬理効果の考察は、本来病態モデルを使用することが適切である。しかしながら、本結果は今後の MGD 治療薬開発において薬物動態の重要性を改めて裏付ける重要な知見と言える。

さらに本章では、DESI イメージングにより眼瞼組織中アジスロマイシンの詳細な分布状態を確認し、マイボーム腺への薬物移行経路を推定した (Figure 3-2)。角膜では、薬物点眼部位の角膜上皮側に強い MS シグナルが認められたが、角膜内皮側には認められなかった。アジスロマイシン点眼時の房水中濃度は極めて低いことが報告されているため⁸⁰⁾⁸¹⁾、本結果は妥当と考えられた。また、マイクロオートラジオグラフィーと同じく、特にマイボーム腺の背後に存在する眼瞼結膜に比較的強い MS シグナルが認められたため、眼瞼結膜はマイボーム腺への薬物移行経路として働いている可能性が一層高まった。一方、眼瞼内部のマイボーム腺には MS シグナルは認められなかった。本章において、検量線は作成しなかったため DESI イメージングの MS シグナルは各イメージにおける相対強度として示される。しかしながら、定量下限界を推定するために作成した標準試料 (既知濃度のアジスロマイシン標準溶液を既知量添加して作成した) の分析により、DESI イメージングの定量下限界は約 10 µg/g と算出された。したがって、マイボーム腺に MS シグナルが認められなかったことは、マイボーム腺中アジスロマイシン濃度 (実測値: 0.8 µg/g) と DESI イメージングの定量下限界 (10 µg/g) で説明可能と考えられる。一般的に、質量分析においてシグナル強度が低い場合、組織特異的に含まれる夾雑物による感度低下 (特にイオンサプレッション) が懸念される。特に、マイボーム腺は多量の脂質を含むため感度低下が危惧されたものの、結膜上に塗布された標準試料における MS シグナル強度と、マイボーム腺上に塗布された標準試料における MS シグナル強度は同程度だったため、マイボーム腺特異的にイオンサプレッションが起きている可能性は低いと考えられた。

眼科に関係する MS イメージングは、水晶体⁸²⁾、網膜⁸³⁾、視神経⁸⁴⁾ など幾つか報告があるものの、眼瞼における DESI イメージングは実施例が無い。本研究において設定した DESI イメージング解像度 150 µm は、ウサギ眼瞼における投与化合物の局在および分布量を相対評価するためには十分であった。一方、マウスやラットなど小動物の眼瞼 MS イメージングでは、150 µm 以上の高い解像度、併せて、最先端の質量分析装置および検出方法の最適化により更なる高感度化が必要となる可能性が高い。しかしながら、既存のマイクロオートラジオグラフィーでは、暗室下での作業が絶対条件であり実験の難易度が高いだけでなく、長期間 (1~2 ヶ月) 露光が必要であるのに対して、DESI イメージングでは、暗室下での実験操作や露光は必要無く、データ取

得に要する時間も著しく短いため、マイボーム腺における薬物分布を評価する創薬研究ツールとしての有用性は高いと考えられた。

以上、本章では、アジスロマイシン単回点眼後のマイボーム腺中濃度は、眼瞼結膜上皮あるいはマイボーム腺開口部と比較して 100~1000 倍低く、十分な薬理作用を発揮するほど曝露されていない可能性を示唆した。また、眼瞼組織切片の DESI イメージングにより、マイボーム腺へのアジスロマイシン移行量は限定的であるが、マイボーム腺の背後に存在する眼瞼結膜から移行している可能性が高いと示唆された。さらに、DESI イメージングは、マイボーム腺における薬物分布を視覚的に評価する創薬研究ツールとして有用性が高いことを明らかにした。

総括

マイボーム腺機能不全症候群(MGD)は、ドライアイの原因疾患と考えられており、全世界で数億人の潜在患者が存在するとも言われているが、確立された治療法が無いため治療薬に対するアンメットニーズが高い疾患である。MGDは40年以上前から臨床現場で認識されており、今なお積極的な臨床研究が行われているが、基礎研究は大きく遅れておりMGD治療薬の開発を妨げている。特に、MGDの原因は複雑であり、その病態メカニズムは依然として全容解明されておらず本質的な病巣部については不明な点が多い。とりわけ腺房の腺分泌障害が関連するかどうかは根本的であり、薬物送達の観点からも大きな関心事であるが、その寄与度は不明である。さらに、マイボーム腺が眼瞼の瞼板内という特殊な環境に位置しており、その組織採取も困難であることから薬物移行性に関する情報も皆無であり、標的部を絞り込むことが出来ない。一般的に、薬物の治療効果および副作用に組織中濃度は深く関与しているため、標的部位の特定および薬物動態情報の充実はMGD治療薬の開発において喫緊の課題とも言える。

そこで本研究では、MGD治療薬の開発におけるボトルネックを解消し、優れた眼科用剤(特に点眼液)の早期開発に有益な知見を得るため、より生体環境に近い*in vitro*三次元培養系を活用した腺分泌モデルの基盤構築および*in vivo*ウサギマイボーム腺における薬物移行評価系の確立、さらに点眼時の薬物移行性の評価に取り組んだ。

まず、第1章において、ヒト由来不死化マイボーム腺細胞を用いた*in vitro*三次元培養条件を最適化した。またAlvetex[®]を用いた三次元培養において、複数のサイトケラチン分子種において発現量の増加が確認されただけでなく、同時に細胞内脂肪滴の増加も観察されたため、マイボーム腺の分化・成熟過程を部分的ではあるが再現しており、*in vitro*腺分泌モデルとして発展的に使用出来る可能性を示した。

第2章では、簡便なウサギマイボーム腺採取法を独創的なアイデアで実現した。本研究において確立した採取法は、組織中に含まれる水分を急速凍結した際に生じる氷を接着剤として応用する着想に基づき、特殊な器具が不要であり、高いスループットが期待されるだけでなく、周辺組織からのコンタミリスクが極小化されるなど、マイボーム腺における薬物動態評価に適した画期的な手法と言える。次に、本採取法を活用して頑健性の高い薬物移行評価系を確立し、マイボーム腺への点眼時薬物移行量が著しく制限されていることを世界で初めて明らかにした。さらに、オートラジオグラフィーを施行し、眼瞼における点眼時薬物分布を検討した結果、マイボーム腺への薬物移行経路としてマイボーム腺中央導管は考えにくく、眼瞼結膜の寄与が高いことを明らかにした。また、DESIイメージングを実施したところ、上記の結論を支持するだけでなく、実用に耐える十分な解像度も確認された。さらにDESIイメージングは既存のオートラジオグラフィーと比較して、データ取得に掛かる時間が著しく短縮されたため、マイボーム腺における薬物分布を評価する創薬研究ツールとして有用であることを明らかにした。

本研究において開発した *in vitro* 三次元培養法は、生体環境下に近い状態にてマイボーム腺上皮細胞の分化・成熟が部分的に起きている可能性が示唆された。一方、医薬品開発における評価系として考えた際には、ヒトへの外挿性など現時点では情報が不足しており、改善・議論の余地がある。しかしながら、マイボーム腺と同じく全分泌腺であるヒト由来不死化皮脂腺上皮細胞の三次元培養作製を足がかりとして皮脂腺での病態メカニズムの詳細が明らかになりつつあるように、本研究で開発された三次元培養法についても検討を重ねることで MGD の病態メカニズムの一端、特に MGD と腺分泌能の関連性が明らかになることが期待できる。

従来のマイボーム腺を標的組織とした薬物治療は、いかなる作用機序の薬剤であっても、結膜や眼瞼中濃度を中心に議論されており、実際のマイボーム腺中薬物濃度は不明であった。本研究で確立した薬物移行評価系は、正確にマイボーム腺中濃度を測定することが可能であり、しかも、スループットにも優れることから、MGD の治療薬開発における薬物動態スクリーニング系として十分展開出来る可能性を示した。さらに、得られた薬物動態学的知見は、これまで評価が不可能であったマイボーム腺における薬物移行が予想外にも限定的であり、治療効果に制限をかけていた可能性を示唆しており、薬理学的考察において新たな着眼点を示した。特に、MGD の本質的な病巣部については不明な点が多いため、マイボーム腺における詳細な薬物分布情報および新規確立した薬物移行評価系は、作用標的部位の絞り込みに向けて大きく前進したと言える。また同時に、マイボーム腺における限定的な薬物移行は、開発候補化合物の薬物動態を過大評価していた可能性も示唆している。一方、今後の展開としてマイボーム腺への効率的なドラッグデリバリー戦略を思案すると、一般的な点眼液の場合、本研究の知見から、マイボーム腺中央導管を介した薬物移行は期待出来ないが、経結膜的な薬物移行は、点眼液の添加剤変更あるいは粘度調節等により実用化の可能性が比較的高いと考えられる。こうした処方あるいは剤型の最適化プロセスにおいても、本研究において確立した薬物移行評価系は活用できるため、マイボーム腺への優れた移行性を持ち、有効性と安全性を両立した化合物の開発や、効率的なドラッグデリバリーシステムへの展開が一層加速化されると期待される。

以上、本研究では、マイボーム腺細胞における全分泌過程を部分的に再現できる三次元培養モデルを作成した。さらに、頑健性の高いマイボーム腺における薬物移行評価系を新規確立し、薬物点眼時のマイボーム腺への移行量が著しく制限されていることを明らかにした。また本研究で得られた成果により、MGD 病態メカニズム—特に腺分泌との関連性について理解が深まるほか、作用標的部位の絞り込みに貢献するだけでなく、効率的な薬物動態スクリーニングを介して MGD 治療薬の早期開発へ一歩近づいたと考えられる。冒頭にも述べた通り、MGD は 40 年以上前から認識されており、今なお積極的な臨床研究が実施されている。この豊富な臨床学的知見を基礎研究に反映させ、また本研究で得られた新たな知見や評価系を駆使して、両者が持続

的に循環することで科学的なエビデンスに裏付けされた優れた医薬品を臨床現場へ届けられると強く期待される。

本論文内容の誌上発表

本学位論文は、下記の原著論文を基に作成され、昭和薬科大学大学院 薬学研究科に提出されたものである。

1. **Asano N**, Ueda K, and Kawazu K. Penetration route of the selective glucocorticoid receptor agonist SA22465 and betamethasone into rabbit meibomian gland based on pharmacokinetics and autoradiography. **Drug Metab Dispos.** 45: 826-833 (2017).
2. **Asano N**, Wiseman JM, Tsuji F and Kawazu K. Limited azithromycin localization to rabbit meibomian glands revealed by LC-MS-based bioanalysis and DESI imaging. **Biol. Pharm. Bull.** 40: 1586-1589 (2017).
3. **Asano N**, Hampel U, Garreis F, Schröder A, Schicht M, Hammer CM, Paulsen F. Differentiation patterns of immortalized human meibomian gland epithelial cells in three-dimensional culture. **Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.** in revision.

謝辞

本論文は筆者が参天製薬株式会社 研究開発本部においてマイボーム腺機能不全症候群に対する薬剤開発に関する基盤研究の成果をまとめたものです。本論文の主査および副査として、ご審査賜りました昭和薬科大学 薬学部 薬物動態学研究室 教授 山崎 浩史 先生および同大学 生化学研究室 教授 伊東 進 先生並びに同大学 薬物治療学研究室 教授 水谷 顕洋 先生に厚く御礼申し上げます。また薬剤学教室 教授 宇都口 直樹 先生には、本論文の作成にあたりご指導を頂くとともに、成果発表の機会を与えて頂きました。謹んで御礼申し上げます。

研究の機会を与えて頂くと共に、終始多大なるご支援とご助言をいただきました参天製薬株式会社 トランスレーショナルサイエンス統括部 統括部長 中村 雅胤 博士、非臨床研究統括部 統括部長 松木 雄 博士に深謝の意を表します。

また、本研究の遂行、本論文の作成にあたり、ご指導、ご助言いただきました、参天製薬株式会社 河津 剛一 博士、共に研究を遂行いただきました、同社 上田 健治 氏ならびに辻 文雄 博士、および同社 薬物動態部門の皆様、心から感謝の意を表します。

また業務留学中における本研究の遂行にあたり、終始ご指導頂いた Friedrich Alexander University 解剖学教室 教授 Friedrich Paulsen 先生、Fabian Garreis 博士、Martin Schicht 博士、同研究室の皆様ならびに Mainz University 眼科学教室 Urike Hample 博士に心より感謝申し上げます。

本研究のなかで オートラジオグラフィー実験を実施頂いた Covance Laboratories UK Phil Fernyhough 氏、Brian Whitby 博士、DESI Imaging 解析を実施頂いた Prosolia Inc. Justin Wiseman 博士にも厚くお礼申し上げます。ここにお名前を記させていただいた他にも、数多くの方々に支えていただいたおかげで本論文が完成できましたことに、改めまして心よりお礼申し上げます。

最後に、これまでの長い研究生活をあたたかく見守り、経済的にも精神的にも支えてくださった家族と両親に深い感謝の意を表して、謝辞といたします。

引用文献

- 1) Craig JP, Nichols KK, Nichols JJ, Caffery B, Dua HS, Akpek EK, Tsubota K, Joo CK, Liu Z, Nelson JD, Stapleton F. TFOS DEWS II Definition and Classification Report. *Ocul. Surf.*, **15**, 276–283 (2017).
- 2) Lemp MA, Crews LA, Bron AJ, Foulks GN, Sullivan BD. Distribution of aqueous-deficient and evaporative dry eye in a clinic-based patient cohort. *Cornea*, **31**, 472–478 (2012).
- 3) Korb DR, Henriquez AS. Meibomian gland dysfunction and contact lens intolerance. *J. Am. Optom. Assoc.*, **51**, 243–251 (1980).
- 4) Nichols KK, Foulks GN, Bron AJ, Glasgow BJ, Dogru M, Tsubota K, Lemp MA, Sullivan DA. The international workshop on meibomian gland dysfunction: executive summary. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **52**, 1922–1929 (2011).
- 5) Geerling G, Tauber J, Baudouin C, Goto E, Matsumoto Y, O'Brien T, Rolando M, Tsubota K, Nichols KK. The international workshop on meibomian gland dysfunction: report of the subcommittee on management and treatment of meibomian gland dysfunction. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **52**, 2050–2064 (2011).
- 6) Maskin SL. Intraductal meibomian gland probing relieves symptoms of obstructive meibomian gland dysfunction. *Cornea*, **29**, 1145–1152 (2010).
- 7) Finis D, Hayajneh J, König C, Borrelli M, Schrader S, Geerling G. Evaluation of an automated thermodynamic treatment (LipiFlow[®]) system for meibomian gland dysfunction: a prospective, randomized, observer-masked trial. *Ocul. Surf.*, **12**, 146–154 (2014).
- 8) Qiao J, Yan X. Emerging treatment options for meibomian gland dysfunction. *Clin. Ophthalmol.*, **7**, 1797–1803 (2013).
- 9) Tong L, Gupta PK. Need for animal models of meibomian gland dysfunction. *Ophthalmol. Ther.*, **5**, 129–134 (2016).
- 10) McMahan A, Lu H, Butovich IA. A role for ELOVL4 in the mouse meibomian gland and sebocyte cell biology. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **55**, 2832–2840 (2014).
- 11) Wang Y-C, Li S, Chen X, Ma B, He H, Liu T, Yu J, Zhang L, Chen Y, Liu Z, Li W. Meibomian Gland Absence Related Dry Eye in Ectodysplasin A Mutant Mice. *Am. J. Pathol.*, **186**, 32–42 (2016).
- 12) Miyake H, Oda T, Katsuta O, Seno M, Nakamura M. Meibomian gland dysfunction model in hairless mice fed a special diet with limited lipid content. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **57**, 3268–3275 (2016).
- 13) Milz S, Neufang J, Higashiyama I, Putz R, Benjamin M. An immunohistochemical study of the extracellular matrix of the tarsal plate in the upper eyelid in human beings. *J. Anat.*, **206**, 37–45 (2005).
- 14) Liu S, Hatton MP, Khandelwal P, Sullivan DA. Culture, immortalization, and characterization of human meibomian gland epithelial cells. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **51**, 3993–4005 (2010).
- 15) Hampel U, Garreis F. The human meibomian gland epithelial cell line as a model to study meibomian gland dysfunction. *Exp. Eye Res.*, 1–7 (2017).

- 16) Hampel U, Krüger M, Kunnen C, Garreis F, Willcox M, Paulsen F. In vitro effects of docosahexaenoic and eicosapentaenoic acid on human meibomian gland epithelial cells. *Exp. Eye Res.*, **140**, 139–148 (2015).
- 17) Hampel U, Schröder A, Mitchell T, Brown S, Snikeris P, Garreis F, Kunnen C, Willcox M, Paulsen F. Serum-induced keratinization processes in an immortalized human meibomian gland epithelial cell line. *PLoS One*, **10**, e0128096 (2015).
- 18) Kam WR, Sullivan DA. Neurotransmitter influence on human meibomian gland epithelial cells. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **52**, 8543–8548 (2011).
- 19) Ding J, Sullivan DA. The effects of insulin-like growth factor 1 and growth hormone on human meibomian gland epithelial cells. *JAMA Ophthalmol.*, **132**, 593–599 (2014).
- 20) Liu S, Kam WR, Ding J, Hatton MP, Sullivan DA. Effect of growth factors on the proliferation and gene expression of human meibomian gland epithelial cells. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **54**, 2541–2550 (2013).
- 21) Schröder A, Abrar DB, Hampel U, Schicht M, Paulsen F, Garreis F. In vitro effects of sex hormones in human meibomian gland epithelial cells. *Exp. Eye Res.*, **151**, 190–202 (2016).
- 22) Khandelwal P, Liu S, Sullivan DA. Androgen regulation of gene expression in human meibomian gland and conjunctival epithelial cells. *Mol. Vis.*, **18**, 1055–1067 (2012).
- 23) Liu Y, Kam WR, Ding J, Sullivan DA. Effect of azithromycin on lipid accumulation in immortalized human meibomian gland epithelial cells. *JAMA Ophthalmol.*, **132**, 226–228 (2014).
- 24) Horning JL, Sahoo SK, Vijayaraghavalu S, Dimitrijevic S, Vasir JK, Jain TK, Panda AK, Labhassetwar V. 3-D tumor model for in vitro evaluation of anticancer drugs. *Mol. Pharm.*, **5**, 849–862 (2008).
- 25) Barrault C, Dichamp I, Garnier J, Pedretti N, Juchaux F, Deguercy A, Agius G, Bernard F-X. Immortalized sebocytes can spontaneously differentiate into a sebaceous-like phenotype when cultured as a 3D epithelium. *Exp. Dermatol.*, **21**, 314–316 (2012).
- 26) Liu S, Li J, Tan DTH, Beuerman RW. The eyelid margin: a transitional zone for 2 epithelial phenotypes. *Arch. Ophthalmol.*, **125**, 523–532 (2007).
- 27) Tektaş OY, Yadav A, Garreis F, Schlötzer-Schrehardt U, Schicht M, Hampel U, Bräuer L, Paulsen F. Characterization of the mucocutaneous junction of the human eyelid margin and meibomian glands with different biomarkers. *Ann. Anat.*, **194**, 436–445 (2012).
- 28) Ackermann P, Hetz S, Dieckow J, Schicht M, Richter A, Kruse C, Schroeder IS, Jung M, Paulsen FP. Isolation and investigation of presumptive murine lacrimal gland stem cells. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **56**, 4350–4363 (2015).
- 29) Shamir ER, Ewald AJ. Three-dimensional organotypic culture: experimental models of mammalian biology and disease. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **15**, 647–664 (2014).
- 30) Klaka P, Grüdl S, Banowski B, Giesen M, Sättler A, Proksch P, Welss T, Förster T. A novel organotypic 3D sweat gland model with physiological functionality. *PLoS One*, **12**, e0182752 (2017).
- 31) Rötzer V, Egu D, Waschke J. Meibomian gland cells display a differentiation-dependent composition of desmosomes. *Histochem. Cell Biol.*, **146**,

685–694 (2016).

- 32) Smith I, Haag M, Ugbo C, Tams D, Rattray M, Przyborski S, Bithell A, Whalley BJ. Neuronal-glia populations form functional networks in a biocompatible 3D scaffold. *Neurosci. Lett.*, **609**, 198–202 (2015).
- 33) Stevanato L, Sinden JD. The effects of microRNAs on human neural stem cell differentiation in two- and three-dimensional cultures. *Stem Cell Res. Ther.*, **5**, 49 (2014).
- 34) Ugbo C, Hirst WD, Rattray M. Astrocytes grown in Alvetex[®] three dimensional scaffolds retain a non-reactive phenotype. *Neurochem. Res.*, **41**, 1857–1867 (2016).
- 35) Bokhari M, Carnachan RJ, Cameron NR, Przyborski SA. Novel cell culture device enabling three-dimensional cell growth and improved cell function. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **354**, 1095–1100 (2007).
- 36) Arslan SY, Yu Y, Burdette JE, Pavone ME, Hope TJ, Woodruff TK, Kim JJ. Novel three dimensional human endocervix cultures respond to 28-day hormone treatment. *Endocrinology*, **156**, 1602–1609 (2015).
- 37) Compton S, Wolf R, Buehrer B. 3D sebocyte spheroids induce terminal differentiation markers and lipogenesis offering an improved model for drug testing. *J. Invest. Dermatol.*, **134**, S41 (2014).
- 38) Lane EB, McLean WHI. Keratins and skin disorders. *J. Pathol.*, **204**, 355–366 (2004).
- 39) Lin H, Qu Y, Geng Z, Li C, Wu H, Dong N, Liu Z, Li W. Air exposure induced characteristics of dry eye in conjunctival tissue culture. *PLoS One*, **9**, e87368 (2014).
- 40) Li W, Hayashida Y, Chen Y-T, He H, Tseng DY, Alonso M, Chen S-Y, Xi X, Tseng SCG. Air exposure-induced squamous metaplasia of human limbal epithelium. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **49**, 154–162 (2008).
- 41) Reichelt J, Breiden B, Sandhoff K, Magin TM. Loss of keratin 10 is accompanied by increased sebocyte proliferation and differentiation. *Eur. J. Cell Biol.*, **83**, 747–759 (2004).
- 42) Ong B-L, Hodson SA, Wigham T, Miller F, Larke JR. Evidence for keratin proteins in normal and abnormal human meibomian fluids. *Curr. Eye Res.*, **10**, 1113–1119 (1991).
- 43) Call M, Fischesser K, Lunn MO, Kao WW-Y. A unique lineage gives rise to the meibomian gland. *Mol. Vis.*, **22**, 168–176 (2016).
- 44) Lloyd C, Yu QC, Cheng J, Turksen K, Degenstein L, Hutton E, Fuchs E. The basal keratin network of stratified squamous epithelia: Defining K15 function in the absence of K14. *J. Cell Biol.*, **129**, 1329–1344 (1995).
- 45) Fuchs E, Green H. Changes in keratin gene expression during terminal differentiation of the keratinocyte. *Cell*, **19**, 1033–1042 (1980).
- 46) Parfitt GJ, Xie Y, Geyfman M, Brown DJ, Jester JV. Absence of ductal hyper-keratinization in mouse age-related meibomian gland dysfunction (ARMGD). *Aging (Albany. NY)*, **5**, 825–834 (2013).
- 47) Fischer H, Fumicz J, Rossiter H, Napirei M, Buchberger M, Tschachler E, Eckhart L. Holocrine secretion of sebum is a unique DNase2-dependent mode of programmed cell death. *J. Invest. Dermatol.*, **137**, 587–594 (2017).

- 48) Zouboulis CC. Further evidence of sebaceous differentiation uniqueness: Holocrine secretion of sebocytes is a multistep, cell-specific lysosomal DNase2-mediated mode of programmed cell death. *J. Invest. Dermatol.*, **137**, 537–539 (2017).
- 49) Mauris J, Dieckow J, Schob S, Pulli B, Hatton MP, Jeong S, Bauskar A, Gabison E, Nowak R, Argüeso P. Loss of CD147 results in impaired epithelial cell differentiation and malformation of the meibomian gland. *Cell Death Dis.*, **6**, e1726 (2015).
- 50) Gidfar S, Afsharkhamseh N, Sanjari S, Djalilian AR. Notch signaling in meibomian gland epithelial cell differentiation. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **57**, 859–865 (2016).
- 51) Parfitt GJ, Xie Y, Reid KM, Dervillez X, Brown DJ, Jester JV. A novel immunofluorescent computed tomography (ICT) method to localise and quantify multiple antigens in large tissue volumes at high resolution. *PLoS One*, **7**, e53245 (2012).
- 52) Hwang HS, Shin JG, Lee BH, Eom TJ, Joo C-K. In vivo 3D meibography of the human eyelid using real time imaging fourier-domain OCT. *PLoS One*, **8**, e67143 (2013).
- 53) Maskin SL, Tseng SC. Culture of rabbit meibomian gland using collagen gel. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **32**, 214–223 (1991).
- 54) Schoenwald RD. Ophthalmic Drug Delivery Systems. Second ed. (Mitra Ashim K ed.) Chap. 5, Marcel Dekker, Inc, New York, pp.135–179 (2003).
- 55) Nagataki S, Mishima S. Pharmacokinetics of instilled drugs in the human eye. *Int. Ophthalmol. Clin.*, **20**, 33–49 (1980).
- 56) Maurice DM. Factors influencing the penetration of topically applied drugs. *Int. Ophthalmol. Clin.*, **20**, 21–32 (1980).
- 57) GARASONE® (betamethasone sodium phosphate and gentamicin sulfate), Product monograph (2013) Quebec, Merck Canada Inc.
- 58) Li HF, Petroll WM, Møller-Pedersen T, Maurer JK, Cavanagh HD, Jester JV. Epithelial and corneal thickness measurements by in vivo confocal microscopy through focusing (CMTF). *Curr. Eye Res.*, **16**, 214–221 (1997).
- 59) Horita D, Yoshimoto M, Todo H, Sugibayashi K. Analysis of hair follicle penetration of lidocaine and fluorescein isothiocyanate-dextran 4 kDa using hair follicle-plugging method. *Drug Dev. Ind. Pharm.*, **40**, 345–351 (2014).
- 60) Mohd F, Todo H, Yoshimoto M, Yusuf E, Sugibayashi K. Contribution of the hair follicular pathway to total skin permeation of topically applied and exposed chemicals. *Pharmaceutics*, **8**, 32 (2016).
- 61) Mindel JS, Smith H, Jacobs M, Kharlamb AB, Friedman AH. Drug reservoirs in topical therapy. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **25**, 346–350 (1984).
- 62) Knop E, Knop N, Millar T, Obata H, Sullivan DA. The international workshop on meibomian gland dysfunction: report of the subcommittee on anatomy, physiology, and pathophysiology of the meibomian gland. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **52**, 1938–1978 (2011).
- 63) Gaudana R, Ananthula HK, Parenky A, Mitra AK. Ocular drug delivery. *AAPS J.*, **12**, 348–360 (2010).
- 64) Hwang K, Kim DJ, Hwang SH. Thickness of Korean upper eyelid skin at different

- levels. *J. Craniofac. Surg.*, **17**, 54–56 (2006).
- 65) Rougier A, Lotte C, Corcuff P, Maibach HI. Relationship between skin permeability and corneocyte size according to anatomic site, age, and sex in man. *J Soc Cosmet Chem*, **39**, 15–26 (1988).
 - 66) Maskin SL. inventor, MELBJ Holdings, LLC, assignee. Treatment for meibomian gland dysfunction or obstruction. U.S. patent 8,455,016. 2013 Jan 6.
 - 67) Takáts Z, Wiseman JM, Gologan B, Cooks RG. Mass spectrometry sampling under ambient conditions with desorption electrospray ionization. *Science*, **306**, 471–473 (2004).
 - 68) Luchs J. Azithromycin in DuraSite[®] for the treatment of blepharitis. *Clin. Ophthalmol.*, **4**, 681–688 (2010).
 - 69) Lemp MA, Nichols KK. Blepharitis in the United States 2009: a survey-based perspective on prevalence and treatment. *Ocul. Surf.*, **7**, S1–S14 (2009).
 - 70) Haque RM, Torkildsen GL, Brubaker K, Zink RC, Kowalski RP, Mah FS, Pflugfelder SC. Multicenter open-label study evaluating the efficacy of azithromycin ophthalmic solution 1% on the signs and symptoms of subjects with blepharitis. *Cornea*, **29**, 871–877 (2010).
 - 71) Foulks GN, Borchman D, Yappert M, Kakar S. Topical azithromycin and oral doxycycline therapy of meibomian gland dysfunction: a comparative clinical and spectroscopic pilot study. *Cornea*, **32**, 44–53 (2013).
 - 72) Opitz DL, Tyler KF. Efficacy of azithromycin 1% ophthalmic solution for treatment of ocular surface disease from posterior blepharitis. *Clin. Exp. Optom.*, **94**, 200–206 (2011).
 - 73) Asbell PA, Colby KA, Deng S, McDonnell P, Meisler DM, Raizman MB, Sheppard JD, Sahm DF. Ocular TRUST: nationwide antimicrobial susceptibility patterns in ocular isolates. *Am. J. Ophthalmol.*, **145**, 951–958 (2008).
 - 74) Akpek EK, Vittitow J, Verhoeven RS, Brubaker K, Amar T, Powell KD, Boyer JL, Crean C. Ocular surface distribution and pharmacokinetics of a novel ophthalmic 1% azithromycin formulation. *J. Ocul. Pharmacol. Ther.*, **25**, 433–439 (2009).
 - 75) Zhang L, Su Z, Zhang Z, Lin J, Li D-Q, Pflugfelder SC. Effects of azithromycin on gene expression profiles of proinflammatory and anti-inflammatory mediators in the eyelid margin and conjunctiva of patients with meibomian gland disease. *JAMA Ophthalmol.*, **133**, 1117–1123 (2015).
 - 76) Ianaro A, Ialenti A, Maffia P, Sautebin L, Rombolà L, Carnuccio R, Iuvone T, D'Acquisto F, Di Rosa M. Anti-inflammatory activity of macrolide antibiotics. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **292**, 156–163 (2000).
 - 77) Banjanac M, Munić Kos V, Nujić K, Vrančić M, Belamarić D, Crnković S, Hlevnjak M, Eraković Haber V. Anti-inflammatory mechanism of action of azithromycin in LPS-stimulated J774A.1 cells. *Pharmacol. Res.*, **66**, 357–362 (2012).
 - 78) Liu Y, Kam WR, Ding J, Sullivan DA. One man's poison is another man's meat: using azithromycin-induced phospholipidosis to promote ocular surface health. *Toxicology*, **320**, 1–5 (2014).
 - 79) Foulks GN, Borchman D, Yappert M, Kim S-H, McKay JW. Topical azithromycin therapy for meibomian gland dysfunction: clinical response and lipid alterations.

Cornea, **29**, 781–788 (2010).

- 80) Amar T, Caillaud T, Elena P-P. Ocular pharmacokinetic study following single and multiple azithromycin administrations in pigmented rabbits. *Curr. Eye Res.*, **33**, 149–158 (2008).
- 81) Stewart WC, Crean CS, Zink RC, Brubaker K, Haque RM, Hwang DG. Pharmacokinetics of azithromycin and moxifloxacin in human conjunctiva and aqueous humor during and after the approved dosing regimens. *Am. J. Ophthalmol.*, **150**, 744–751.e2 (2010).
- 82) Grey AC. MALDI imaging of the eye: Mapping lipid, protein and metabolite distributions in aging and ocular disease. *Int. J. Mass Spectrom.*, **401**, 31–38 (2016).
- 83) Pallitto P, Ablonczy Z, Jones EE, Drake RR, Koutalos Y, Crouch RK, Donello J, Herrmann J. A2E and lipofuscin distributions in macaque retinal pigment epithelium are similar to human. *Photochem. Photobiol. Sci.*, **14**, 1888–1895 (2015).
- 84) Anderson DMG, Mills D, Spraggins J, Lambert WS, Calkins DJ, Schey KL. High-resolution matrix-assisted laser desorption ionization-imaging mass spectrometry of lipids in rodent optic nerve tissue. *Mol. Vis.*, **19**, 581–592 (2013).