

MALDI imaging mass spectrometry revealed atropine distribution in the ocular tissues and its transit from anterior to posterior regions in the whole-eye of rabbit after topical administration

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2021-08-24 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 森, 直人 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10271/00003893

博士（医学） 森 直人

論文題目

MALDI imaging mass spectrometry revealed atropine distribution in the ocular tissues and its transit from anterior to posterior regions in the whole-eye of rabbit after topical administration

(マトリックス支援レーザー脱離イオン化質量分析イメージング法はウサギへのアトロピン点眼後の眼球組織におけるアトロピン分布と前眼部から後眼部への分布推移を明らかにした)

論文の内容の要旨

[はじめに]

眼球は形態的および生理学的に複雑な組織であり、標的とする眼組織に薬物を効率的に送達させることは困難である。したがって、眼球における薬物の移行経路を解明することは眼科用医薬品開発における薬物送達の観点から非常に重要である。薬物投与後の眼組織分布を評価する方法として、放射性標識体を用いた評価法があるが、放射性標識体を合成する費用が高額であるという問題がある。角膜や水晶体といった眼組織を分画し、各組織を高速液体クロマトグラフィーや高速液体クロマトグラフ質量分析法を用いて薬物濃度を測定する方法もあるが、角膜や水晶体といった各組織内の分布情報は失われてしまうという問題がある。

イメージング質量分析法 (IMS) は、組織切片における薬物の分布をイメージング可能な手法であり、評価する薬物への標識が不要かつ組織の微細な領域まで分布評価が可能な方法である。

アトロピン点眼液は眼科用医薬品として広く用いられているが、投与後のアトロピンの眼組織分布は十分に解明されてはいない。そこで我々は IMS を使用して、点眼投与後の眼組織におけるアトロピンの分布およびその移行経路を明らかにした。

[材料ならびに方法]

アトロピンエステルアゼを保有しない 24 週齢雄性 Kbl: JW ウサギ (n=1) に 1%アトロピン点眼液 50 μ L を 5 分間隔で 3 回点眼投与し、最終点眼 30 分後にペントバルビタールナトリウムの過量投与により安楽死させた。実験は参天製薬株式会社動物実験委員会 (動物実験倫理審査番号 DR-2015-0220) の承認を受けた。眼球 (n=1) を生理食塩水で洗浄した後、摘出した。ドライアイスで冷却したイソペンタンに摘出した眼球を浸漬し、凍結させた。凍結した眼球を 2%カルボキシメチルセルロース溶液に浸け、その状態で凍結し、凍結ブロックを作製した。クライオスタットを用いて 10 μ m 厚の凍結切片を作製した。自動スプレー装置 TMSprayer (HTx Technologies 製) により α -シアノ-4-ヒドロキシケイ皮酸を塗布した。IMS 測定は 7 テスラの超伝導磁石が装備された SolariX FT-ICR (Bruker 製) を用い、レーザー照射間隔は 10 μ m および 100 μ m とした。測定で得られたデータは FlexImaging (Bruker 製) で解析した。角膜頂から後極部にか

けて眼球外周に一定間隔の関心領域を設定した。眼球上部と下部の関心領域におけるアトロピンシグナルの強度比較検定には EXSUS (CAC クロア製) によるマン・ホイットニーの U 検定を用いた。

[結果]

得られたマススペクトルデータよりアトロピンのスペクトルを特定した。高質量分解能測定によりアトロピンはプロトン付加体として検出され、その m/z は 290.17474 と理論値 (m/z : 290.17507) に近似したスペクトルを観測した。眼球切片全体におけるアトロピンの分布を観察した。アトロピンは角膜に多く分布し、次に前眼房、虹彩毛様体に多く分布していた。アトロピンは後眼部の強膜領域にも分布が確認されたが、硝子体や水晶体には分布は確認されなかった。高空間分解能による測定結果から角膜および前眼部強膜領域を観察した。アトロピンは角膜上皮および実質に多く分布し、内皮には少なかった。強膜、虹彩毛様体に比べ前眼部網膜脈絡膜ではアトロピンの分布は少なかった。

角膜頂から後極部にかけて眼球外周のアトロピンの分布量変化を観察した。角膜から後極部に進むにつれてアトロピンの分布は少なくなり、眼球が生体から露出している部分から生体に埋もれている部分に変わる領域 (角膜頂からの距離が 10~14 mm) で分布は大きく減少した。眼球が生体から露出している領域において、眼球上部の最も分布が多いところより下部の最も分布が多いところの方が、1.5 倍分布量が多かった。眼球上部と下部の関心領域におけるアトロピンシグナルの強度比較では、上部で 6 カ所が下部より有意に高く、下部で 12 カ所が上部より有意に高かった ($p<0.05$)。

[考察]

IMS による測定では、レーザーを照射した領域に存在する成分のイオンが多数観測される。特定の成分の生体組織における分布を評価するうえでは、それら夾雑成分のイオンからターゲットとなる成分を高い特異性をもって分離することが必須である。本研究では高い質量分解能を持つ Solarix FT-ICR を用いることで、多くの夾雑成分からアトロピンのマススペクトルを特定できた。眼球切片全体のイメージングによりアトロピンは後眼部の強膜にも分布が確認され、点眼投与でも後眼部に薬物が到達可能であることが明らかとなった。結膜囊よりも後眼部側ではアトロピンの分布は大きく減少しており、生体から露出している領域は点眼液と直接接触するため組織分布は多くなるが、生体内に埋もれている領域では点眼液と接触しないため、組織分布は少なくなると考えられた。角膜、虹彩毛様体、網膜脈絡膜、強膜のアトロピン分布量から、後眼部への移行経路は眼周囲の強膜を主経路としていると考えられた。

[結論]

本研究では IMS を使い、組織分布と眼周囲における分布量変化を評価することで、眼球全体における点眼後の薬物移行を考察することができた。本研究で用いた測定および解析手法は眼科用医薬品を開発する上でも有用である可能性が示された。