

## アートセレブ®脳脊髄手術用洗浄灌流液：ヒトアストロサイト培養系を用いた薬理学的評価

西村益浩,<sup>\*,a</sup> 土居和久,<sup>a</sup> 榎本理世,<sup>b</sup> 李英培,<sup>b</sup> 内藤真策,<sup>a</sup> 山内あい子<sup>c</sup>

### ARTCEREB® Irrigation and Perfusion Solution for Cerebrospinal Surgery: Pharmacological Assessment Using Human Astrocytes Exposed to Test Solutions

Masuhiko NISHIMURA,<sup>\*,a</sup> Kazuhisa DOI,<sup>a</sup> Riyo ENOMOTO,<sup>b</sup> Eibai LEE,<sup>b</sup> Shinsaku NAITO,<sup>a</sup> and Aiko YAMAUCHI<sup>c</sup>

<sup>a</sup>Research and Development Center, Otsuka Pharmaceutical Factory, Inc., 115 Tateiwa, Muya-cho, Naruto, Tokushima 772-8601, Japan, <sup>b</sup>Department of Pharmacology, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Kobe Gakuin University, 1-1-3 Minatojima, Kobe 650-8586, Japan, and <sup>c</sup>Department of Pharmaceutical Information Science, Graduate School of Pharmaceutical Science, The University of Tokushima, 1-78-1 Sho-machi, Tokushima 770-8505, Japan

(Received April 26, 2009; Accepted June 14, 2009; Published online June 17, 2009)

ARTCEREB® irrigation and perfusion solution (Artcereb) is a preparation intended for the irrigation and perfusion of the cerebral ventricles, and it is therefore important to evaluate the effects of Artcereb on brain cells. *In vitro* assessment of the effects of Artcereb in cell cultures of human fetal astrocytes was conducted in comparison with normal saline and lactated Ringer's solution. The effects of exposure to Artcereb were evaluated based on microscopic images of the mitochondria stained with rhodamine 123. The effects of exposure to Artcereb on cell function were also evaluated by quantitative analysis of mitochondrial activity based on rhodamine 123 and <sup>3</sup>H-thymidine incorporation. Morphological changes in nuclear structure were also evaluated. The results of the present study showed that cell function in cell cultures of human astrocytes was relatively unaffected by exposure to Artcereb as compared with normal saline or lactated Ringer's solution, suggesting that Artcereb has less effect on brain cells than normal saline or lactated Ringer's solution when used for the irrigation or perfusion of the cerebral ventricles.

**Key words**—ARTCEREB®; cerebrospinal surgery; irrigation solution; perfusion solution; human astrocytes

## 緒 言

脳神経外科領域における手術では、従来、頭蓋・脊髄腔内の洗浄・灌流に生理食塩液、乳酸リンゲル液、又は医療施設内で特殊製剤として無菌的に調製された人工髄液などが使用されてきた。これらの洗浄・灌流液の組成は手術患者の脳脊髄の生理機能に影響を及ぼす可能性があるため、ヒトの脳脊髄液にできるだけ近い性状の人工髄液を用いることが望ましいと考えられた。そこで、製剤としては物理化学的に安定であり、医療現場における使用時の調製で

は無菌操作を必要としない人工髄液（アートセレブ®脳脊髄手術用洗浄灌流液、以下「アートセレブ」）が開発された。アートセレブはヒトの正常脳脊髄液（CSF）の成分を考慮した濃度で電解質並びにブドウ糖を含有している。容器にはダブルバッグ方式を採用しており、使用時に一剤に合わせることで簡便に適用できる剤型である。Table 1はヒト正常脳脊髄液、アートセレブ、さらに実験で比較検討した乳酸リンゲル液及び生理食塩液の組成を示している。なお、アートセレブの組成に関しては、Davson<sup>1)</sup>の報告を基本とし、Milhorat<sup>2)</sup>の報告も参考にし、電解質組成とブドウ糖濃度が設定された。

われわれは、既にラット胎児から分取した培養脳細胞の初代培養系（アストロサイト、神経細胞などの混合細胞の培養系）を用いてアートセレブの薬理学的評価を行っている。すなわち、ローダミン 123

<sup>a</sup>大塚製薬工場 研究開発センター（〒772-8601 徳島県鳴門市撫養町立岩字芥原 115）、<sup>b</sup>神戸学院大学薬学部薬学科（〒650-8586 神戸市中央区港島 1-1-3）、<sup>c</sup>徳島大学大学院医薬品情報学分野（〒770-8505 徳島市庄町 1-78-1）

\*e-mail: nisimums@otsukakj.co.jp

Table 1. Composition and pH of Study Solutions

Component	Normal human CSF <sup>1)</sup>	Artcereb	Lactated Ringer's solution	Normal saline
Na <sup>+</sup> (mEq/l)	145.5	145	130	154
K <sup>+</sup> (mEq/l)	2.8	2.8	4	—
Mg <sup>2+</sup> (mEq/l)	2.2	2.2	—	—
Ca <sup>2+</sup> (mEq/l)	2.3	2.3	3	—
Cl <sup>-</sup> (mEq/l)	111.9	129	109	154
HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> (mEq/l)	23.1	23.1	—	—
P (mmol/l)	1.1	1.1	—	—
Lactate <sup>-</sup> (mEq/l)	n.a.	—	28	—
Glucose (g/l)	0.61 <sup>2)</sup>	0.61	—	—
Osmolality ratio	approx. 1 (289 mOsm/kg H <sub>2</sub> O)	approx. 1	approx. 0.9	1
pH	7.307	approx. 7.3	approx. 6.7	approx. 6.3

CSF: cerebrospinal fluid, n.a.: no data available.

の取り込み量をもとに測定したミトコンドリア活性を指標にラット脳細胞に対するアートセレブの影響に関する検討を行い、その有効性を認めたことを報告した。<sup>3)</sup> また、脳の細胞においてアストロサイトは栄養供給、代謝産物の排出、神経細胞の保護などに大きく寄与している。したがって、本研究ではさらに、ヒト胎児脳より調製されたアストロサイトの継代培養系を用いて、ミトコンドリア活性、チミジンの取り込み活性及び細胞核の形態学的変化を指標に、アートセレブ曝露による脳細胞機能に対する影響について調べ、生理食塩液及び乳酸リンゲル液を対照試験液として比較検討した。

## 実験方法

**1. 試薬** ヒト胎児凍結アストロサイト (Donor # 1-4) 及びその培養キットは Clonetics BioWhittaker Inc. (Walkersville, Maryland) より入手した。ドナー情報は Table 2 に示した。ローダミン 123 及び hydroxyurea は Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA) より入手した。[<sup>3</sup>H]-thymidine は MP Bio-medicals, LLC (Santa Ana, CA, USA) より入手した。ACS-II は GE Healthcare UK Ltd. (Buckinghamshire, England) より入手した。Bisbenzimidazole H 33342 Fluorochrome, Trihydrochloride (Hoechst 33342) は Calbiochem-Behring 社より入手した。生理食塩液、乳酸リンゲル液及びアートセレブは大塚製薬工場製 (徳島) を使用した。その他の試薬類は、市販特級品を用いた。

**2. 細胞培養** ヒト正常アストロサイト培養キ

ット取扱説明書にしたがい 75 cm<sup>2</sup> のフラスコにて継代培養を行い、細胞の状態を確認し、2-4 回継代後に実験に用いた。活性測定は 24 well のプレートを用い、顕微鏡観察用は 4 well の Culture Slide を用いた。細胞は 1×10<sup>4</sup> cells/200 μl/cm<sup>2</sup> 又は 2×10<sup>4</sup> cells/200 μl/cm<sup>2</sup> ずつ分注し (Table 2)、37°C に設定した CO<sub>2</sub> インキュベーターで培養し、24 時間後と以後 48-72 時間毎に培地交換をした。位相差顕微鏡にて細胞の増殖状態を観察し、プレート上に約 70-80% まで増殖したことを確認した時点 (培養後 6-10 日) で試験に用いた。

**3. ミトコンドリア活性** 培養ヒト正常アストロサイトの培地を各試験液 200 μl/cm<sup>2</sup> に交換し、1 あるいは 3 時間 CO<sub>2</sub> インキュベーター中で培養 (試験液の曝露) した後に、試験液から通常の培地に戻した。この培地に戻した 24 時間培養後にミトコンドリア蛍光染色用ローダミン 123 (10 μg/ml) を含む培地に交換し 30 分間培養後、4°C の PBS (-) で 2 回洗浄し、活性測定用の検体とした。なお、蛍光顕微鏡を用いるミトコンドリア染色後の細胞観察においては、485 nm で励起した条件で顕鏡し、フジフィルム ISO400 にて撮影した。対照として試験液の代わりに培地を用いた正常培養群においても同様の実験を行った。ミトコンドリア活性を定量する場合は、2 ml の 0.1% Triton X-100 で細胞を可溶化し、蛍光分光光度計 (Spectrofluorophotometer RF-540, EX: 485 nm, EM: 525 nm) を用いて蛍光強度を測定した。正常対照群では、試験液の代わりに培地で同様の処理を行った検体を用いた。

Table 2. Characteristics and Seeding Density of Human Astrocytes

	Lot No.	Age	Sex	Race	Seeding density (Fig. No.)
Donor # 1	16876	21 week fetus	unknown	unknown	2×10 <sup>4</sup> cells/cm <sup>2</sup> (Fig. 1, 3) 1×10 <sup>4</sup> cells/cm <sup>2</sup> (Fig. 2)
Donor # 2	17253	21-22 week fetus	unknown	unknown	2×10 <sup>4</sup> cells/cm <sup>2</sup> (Fig. 2, 3)
Donor # 3	17288	22 week fetus	female	unknown	1×10 <sup>4</sup> cells/cm <sup>2</sup> (Fig. 2) 2×10 <sup>4</sup> cells/cm <sup>2</sup> (Fig. 3)
Donor # 4	17657	22.5 week fetus	unknown	unknown	2×10 <sup>4</sup> cells/cm <sup>2</sup> (Fig. 4)

**4. <sup>3</sup>H-チミジンの取り込み活性** 培養ヒト正常アストロサイトの培地を各試験液 200  $\mu$ l/cm<sup>2</sup> に交換し、1 あるいは 3 時間培養した後に、450  $\mu$ l/cm<sup>2</sup> の培地に交換した。その直後あるいは 24 時間培養後に、50  $\mu$ l/cm<sup>2</sup> の <sup>3</sup>H-チミジン反応液を添加し、2 時間培養後、4°C の PBS (-) で 3 回洗浄した。250  $\mu$ l/cm<sup>2</sup> の氷冷 10% TCA を加え 4°C で 1 時間放置して細胞を固定後、4°C の PBS (-) で 2 回洗浄し TCA を除いた。0.5N NaOH を 250  $\mu$ l/cm<sup>2</sup> 添加し、37°C で 2 時間インキュベートして溶解した。放射能濃度を測定するために、350  $\mu$ l をカウンティングバイアルに分取し、0.5N の HCl を 350  $\mu$ l 添加して液性を中和した。バイアルに放射能測定用シンチレーター (ACS-II) を 16 ml 添加後、液体シンチレーションカウンターで 2 分間放射能を測定した。なお、放射能濃度のバックグラウンド測定用試料として、試験液の代わりに培地を用いて同様の処理を行ったのちに計測した。

**5. 細胞核の形態学的な評価** 培養ヒト正常アストロサイトの培地を各試験液 200  $\mu$ l/cm<sup>2</sup> と交換し、CO<sub>2</sub> インキュベーター内で 3 時間、細胞を試験液に曝露した。その後、試験液から通常の培地に戻した。この培地に戻して 24 時間培養した後に、細胞を PBS (-) で 3 回洗浄し、次に 10%-中性緩衝ホルムアルデヒド液で培養細胞を固定した。その後、顕鏡時までは冷蔵保存した。顕鏡時は、10%-中性緩衝ホルムアルデヒド液を吸引除去後、蛍光色素液 (10%-中性緩衝ホルムアルデヒド液 25 ml に核染色剤ヘキスト 33342 溶液 (0.6 mg/ml) 500  $\mu$ l を添加した液) 300  $\mu$ l/cm<sup>2</sup> を添加し、遮光室温条件下で 30 分間蛍光染色した。蛍光色素液を吸引除去後、細胞を PBS (-) で洗浄し、励起波長 351 nm、蛍光波長 460 nm の条件で、走査型レーザー顕微鏡 (LSM-GB200, オリンパス光学工業) にて観察し

た。

**6. 統計処理** 試験は duplicate で行い、その平均値を用いて、ドナー毎に正常培養に対する各々の活性を 100% とした時の相対取り込み量で示した。さらに、3 例のドナーのデータは平均値 (mean) と標準偏差 (S.D.) を計算し、表示した。有意差は従属 2 標本の (対応のある) *t*-検定により求めた。

## 結果及び考察

**1. ヒト胎児のアストロサイト培養系を用いたミトコンドリア活性による評価** ヒト胎児脳より分離された凍結アストロサイトの継代培養系を用い、アートセレブがヒト脳組織細胞へ与える影響について検討した。

実験では、培養細胞を試験液に 3 時間曝露し、24 時間後にローダミン 123 でミトコンドリアを蛍光染色して顕微鏡で観察した (Fig. 1)。また、細胞を試験液に 3 時間曝露し、24 時間後にローダミン 123 の細胞内取り込みを測定することによりミトコンドリア活性とした。この結果は正常培養での取り込み活性に対する比率で表示した (Fig. 2)。なお、実験の指標薬に用いたローダミン 123 はトランスポーターの働きにより細胞に取り込まれてミトコンドリアに特異的に分布 (蛍光染色) することが知られている。<sup>4)</sup> ヒトのアストロサイトを試験液に曝露後 24 時間時点における形態観察では、正常培養液と比較してアートセレブ曝露による細胞の形態学的変化が全く認められなかったのに対して、乳酸リンゲル液への曝露では細胞の形態に若干の変形がみられた。一方、生理食塩液への曝露では細胞数の減少を伴った細胞の変形がみられた (Fig. 1)。さらに、取り込まれたローダミン 123 の蛍光発色を定量化することにより算出したミトコンドリア活性を比較する

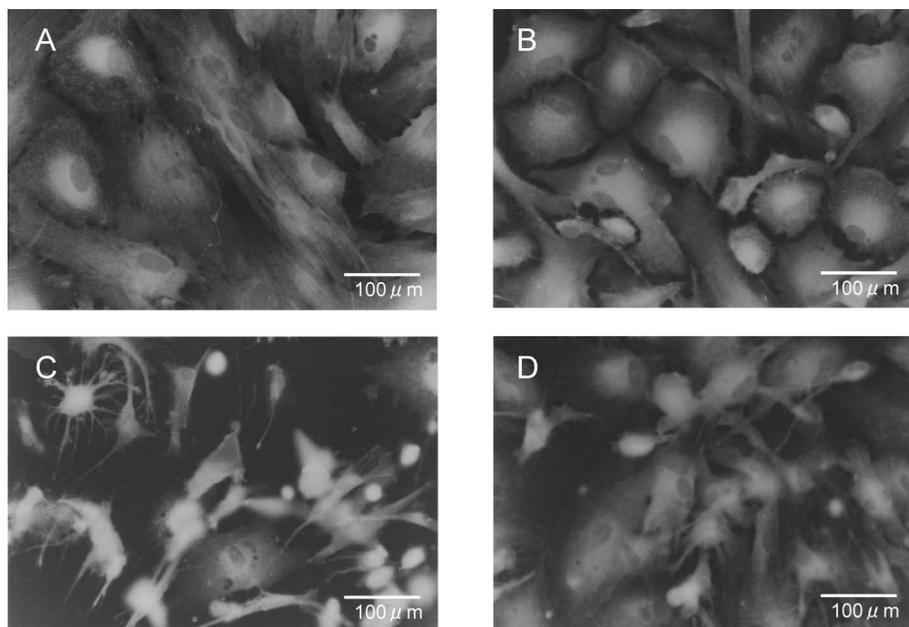


Fig. 1. Microscopic Images of Mitochondria Stained with Rhodamine 123 in Human Astrocytes Following Exposure to the Perfusates

Human astrocytes were incubated in standard growth medium for 24 h following exposure to Artcereb, lactated Ringer's solution, or normal saline for 3 h. Mitochondrial staining was performed using rhodamine 123. (A) control, (B) Artcereb, (C) normal saline, (D) lactated Ringer's solution.

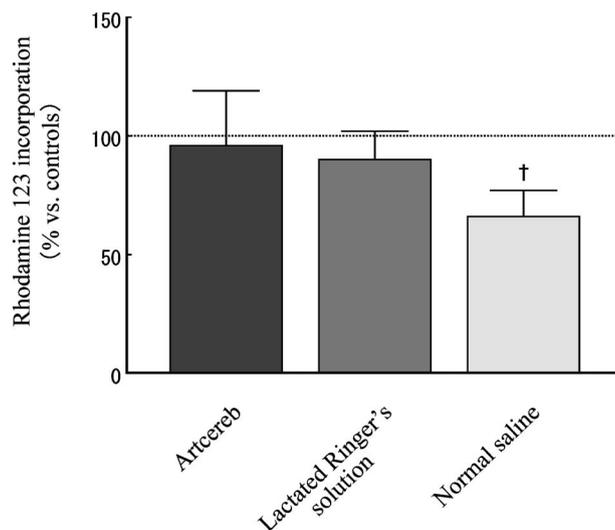


Fig. 2. Evaluation of Mitochondrial Damage in Cell Cultures of Human Astrocytes Following Exposure to the Perfusates

Human astrocytes were incubated in standard growth medium for 24 h following exposure to Artcereb, lactated Ringer's solution, or normal saline for 3 h. Mitochondrial activity was evaluated based on rhodamine 123 incorporation in duplicate wells. Values are mean  $\pm$  S.D. ( $n=3$ ). The statistical significance of differences between values was analyzed by the Student's *t*-test (two-tailed). Significant difference at  $^*p<0.05$  vs. the control group.

と、アートセレブ曝露細胞では 24 時間後においても正常培養時と同程度の活性を示しており、曝露による影響は認められなかった。また、乳酸リンゲル液曝露により細胞のミトコンドリア活性は、アート

セレブ曝露時より有意ではないものの、低値となる傾向であった。一方、生理食塩液曝露では、顕微鏡観察での細胞数減少と関連したミトコンドリア活性の低下が観察された (Fig. 2)。

2. ヒト胎児のアストロサイト培養系を用いた  $^3\text{H}$ -チミジンの取り込み活性による評価 ヒト胎児アストロサイト継代培養細胞をアートセレブ、生理食塩液及び乳酸リンゲル液に 3 時間曝露し、その直後と 24 時間後における  $^3\text{H}$ -チミジンの細胞内取り込み活性を測定し、正常培養時の  $^3\text{H}$ -チミジン取り込み活性に対する比率で表すことにより、細胞増殖への曝露の影響を検討した。(Fig. 3)。

正常培養及びアートセレブと比較して、生理食塩液では曝露直後 [(Fig. 3 (A))] 及び 24 時間後 [(Fig. 3 (B))] のいずれにおいても  $^3\text{H}$ -チミジンの取り込み活性に大きな低下が認められた。

3. ヒト胎児のアストロサイト培養系を用いた細胞核の形態学的な評価 ヒト胎児アストロサイト継代培養細胞を、アートセレブ、生理食塩液及び乳酸リンゲル液に 3 時間曝露し、その 24 時間後にヘキスト 33342 を用いて細胞核のクロマチンを蛍光染色し、共焦点レーザー顕微鏡により観察した。ヘキスト 33342 は一般的な核染色剤であり、生細胞でも容易に取り込まれ、DNA の AT 配列の副溝に結合

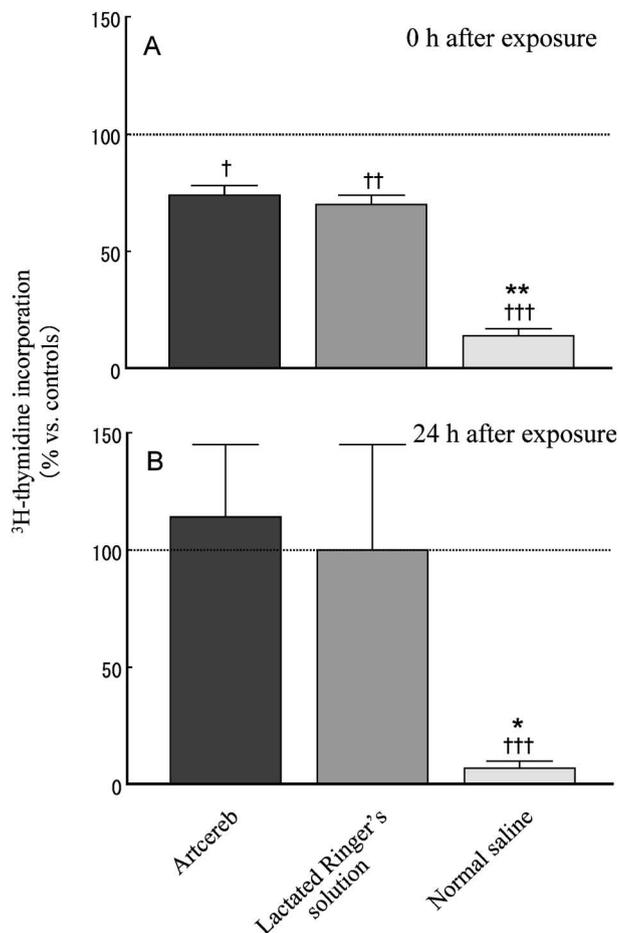


Fig. 3. Evaluation of Damage to the Cell Nucleus in Cell Cultures of Human Astrocytes Following Exposure to the Perfusates

Human astrocytes were incubated in standard growth medium for 0 h (A) or 24 h (B) following exposure to Artcereb, lactated Ringer's solution, or normal saline for 3 h. Cell nuclear activity was evaluated based on  $^3\text{H}$ -thymidine incorporation in duplicate wells. Values are mean  $\pm$  S.D. ( $n=3$ ). The statistical significance of differences between values was analyzed by the Student's *t*-test (two-tailed). Significant differences at  $*p<0.05$  and  $**p<0.01$  vs. the Artcereb group,  $†p<0.05$ ,  $††p<0.01$ , and  $†††p<0.001$  vs. the control group.

して染色される。また、この顕微鏡を用いると細胞断面の共焦点画像を取得することができるため、クロマチン染色された細胞核の構造における形態学的な変化をとらえることにより細胞障害性を評価することが可能となる。

正常培養を対照に細胞核の形態を観察したところ、アートセレブを曝露した細胞では変形した核が一部にみられるものの、これらの細胞を含めすべての細胞において正常な核クロマチンの網目構造が保持されていた。一方、生理食塩液による曝露群では細胞核のサイズが小さく変形しクロマチンの凝縮がみられた。乳酸リンゲル液への曝露においては、生

理食塩液曝露時と比較して程度は弱いながらも内部構造が一部消失した細胞核やクロマチンが凝縮した細胞核が確認された (Fig. 4)。

## ま と め

ヒト胎児脳より分離されたアストロサイトの継代培養系を用い、脳神経外科領域の手術において使用されている3種類の頭蓋・脊髄腔内の洗浄・灌流液の脳細胞機能に対する影響について比較検討した。細胞の形態(外観)、ミトコンドリア活性、チミジンの取り込み活性を指標とした場合、ヒト脳脊髄液の組成を基本としたアートセレブは、生理食塩液よりもアストロサイトの機能に与える影響は有意に少なかった。また、乳酸リンゲル液とアートセレブとの比較では、明確な差ではないものの、細胞の一部に外観上の形態変化が認められた。

さらに、細胞核の形態学的な変化を評価するため、アストロサイトを試験液に曝露し、ヘキスト33342により核クロマチンを蛍光染色後に共焦点レーザー顕微鏡を用いて細胞核を観察した。アートセレブに曝露された細胞では正常な細胞核の形態が維持されていたのに対し、生理食塩液への曝露では細胞核が変形し凝縮しているのが観察された。また、乳酸リンゲル液の曝露によっても、生理食塩液の曝露と比較して程度は弱いながらも同様の細胞核の変化が観察された。榎本らは、ヒトアストロサイトを生理食塩液に曝露した時、核クロマチン構成タンパクであるヒストンのリン酸化が著しく亢進したが、アートセレブ曝露によるその変化は小さかったと報告している。<sup>5)</sup>このようなヒストンのリン酸化亢進がクロマチンの形態変化を引き起こし、アポトーシスの誘発による細胞障害を引き起こすのではないかと推察された。

以上の結果から、ヒトアストロサイト培養系においてみられた生理食塩液や乳酸リンゲル液への曝露による細胞機能障害は、アートセレブ曝露ではほとんど起こらないことが明らかとなり、脳脊髄手術用洗浄灌流液としてのアートセレブの有効性が示唆された。

## REFERENCES

- 1) Davson H., "Chemical Composition and Secretory Nature of the Fluids. Physiology of

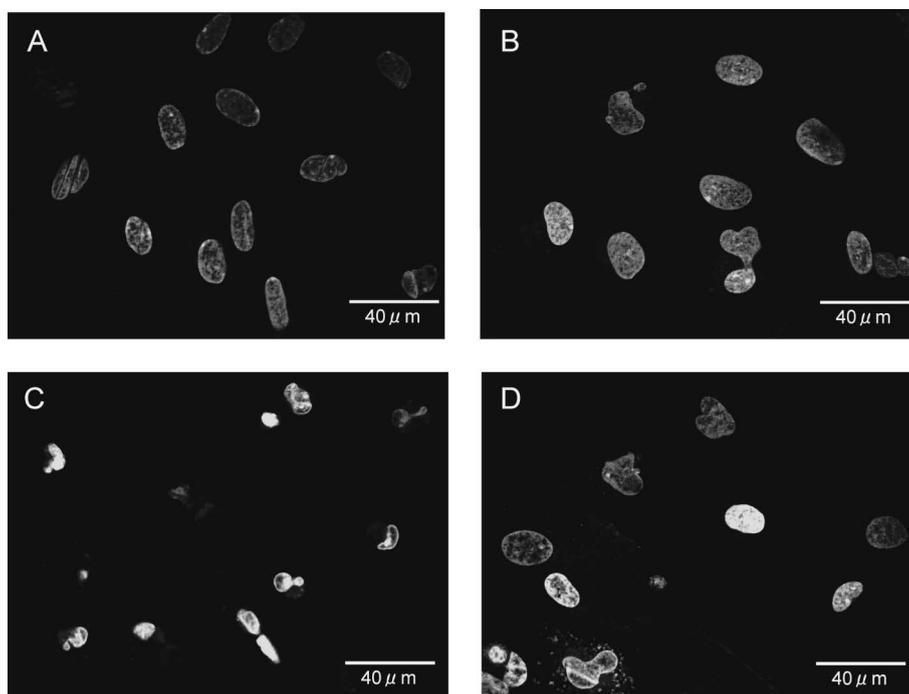


Fig. 4. Laser-scanning Microscopic Images of Human Astrocytes Following Exposure to the Perfusates

Human astrocytes were incubated in standard growth medium for 24 h following exposure to Artcereb, lactated Ringer's solution, or normal saline for 3 h. The cells were fixed with 10% formaldehyde in PBS for >15 min at 4°C and were then stained with 12.3 μg/ml Hoechst 33342 for 30 min at room temperature. (A) control, (B) Artcereb, (C) normal saline, (D) lactated Ringer's solution.

- the Cerebrospinal Fluid," J. & A. Churchill Ltd., London, 1967, pp. 33–54.
- 2) Milhorat T. H., "Cerebrospinal Fluid Physiology. Hydrocephalus and the Cerebrospinal Fluid," The Williams & Wilkins Company, Baltimore, 1972, pp. 1–41.
- 3) Nishimura M., Naito S., *The Cell*, **40**, 254–257 (2008). (in Japanese)
- 4) Johnson L. V., Walsh M. L., Chen L. B., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **77**, 990–994 (1980).
- 5) Enomoto R., Tatsuoka H., Komai T., Sugahara C., Takemura K., Yamauchi A., Nishimura M., Naito S., Matsuda T., Lee E., *Neurochem. Int.*, **44**, 459–467 (2004).