

ラット脳細胞の初代培養系を用いてグルコースの取り込み活性でみた
アートセレブ®脳脊髄手術用洗浄灌流液の薬理的評価

西村 益浩,* 土居 和久, 内藤 真策

**Pharmacological Assessment of ARTCEREB® Irrigation and Perfusion Solution for
Cerebrospinal Surgery Based on Glucose Incorporation Activity in Primary
Cultures of Rat Brain Cells**

Masuhiko NISHIMURA,* Kazuhisa DOI, and Shinsaku NAITO
Research and Development Center, Otsuka Pharmaceutical Factory, Inc.,
115 Tateiwa, Muya-cho, Naruto, Tokushima 772-8601, Japan

(Received July 11, 2009; Accepted September 19, 2009; Published online September 24, 2009)

ARTCEREB® irrigation and perfusion solution (Artcereb) is typically used as an artificial fluid for applications inside the skull and spinal cavity. This *in vitro* study was conducted to assess the effects of Artcereb in cultures of rat fetal brain cells. Cell function following exposure to Artcereb was evaluated by measuring ³H-deoxy-D-glucose incorporation activity. Cell function was significantly reduced in primary cultures of rat fetal brain cells at 0 h and 24 h after 1-h or 3-h exposure to normal saline as compared with Artcereb. Cell function was also significantly reduced at 24 h after 3-h exposure to lactated Ringer's solution as compared with Artcereb. Furthermore, cell function was significantly reduced at 24 h after 3-h exposure to a modified Artcereb formulation lacking either HCO₃⁻ or Mg²⁺ as compared with Artcereb, while cell function was unaffected at 24 h after exposure to lactated Ringer's solution with HCO₃⁻ or normal saline with HCO₃⁻ as compared with Artcereb. These findings suggest the importance of the presence of HCO₃⁻ and Mg²⁺ in the formulation of Artcereb.

Key words—ARTCEREB®; cerebrospinal surgery; irrigation solution; perfusion solution; ³H-deoxy-D-glucose

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・灌流に生理食塩液や乳酸リンゲル液が使用されてきたが、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る。また、症候性の中脳水道狭窄に対する神経内視鏡術の後に、患者に灌流液として生理食塩液を使用すると頭痛、高熱及び頸部硬直を伴うが、患者に人工髄液を使用すると極わずかな発熱のみであることが報告されている。¹⁾ さらに、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も頭蓋・脊髄腔内の洗浄・灌流に使用されてきたが、医療施設内での調製と滅菌、さらに保存時の品質管理には手間

を要した。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。アートセレブは容器に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医療現場において簡便に使用できるように工夫されている。Table 1 はヒト^{2,3)} 及びラットの正常脳脊髄液、⁴⁾ アートセレブ、比較対照の乳酸リンゲル液及び生理食塩液の組成を示している。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。

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）や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アートセレブの薬理的評価を行っている。すなわち、ローダミン 123 の取り込み量をもとに測定したミトコンドリ

大塚製薬工場研究開発センター

*e-mail: nisimums@otsumakj.co.jp

Table 1. Composition, Osmolality Ratio, and pH of Study Solutions

| Component or value | Normal human CSF ²⁾ | Normal rat CSF ⁴⁾ | Artcereb | Lactated Ringer's solution | Normal saline |
|---------------------------------------|---|------------------------------|-------------|----------------------------|---------------|
| Na ⁺ (mEq/l) | 145.5 | 150–152 | 145 | 130 | 154 |
| K ⁺ (mEq/l) | 2.8 | 3.5–6.2 | 2.8 | 4 | — |
| Mg ²⁺ (mEq/l) | 2.2 | 1.3–2.4 | 2.2 | — | — |
| Ca ²⁺ (mEq/l) | 2.3 | 1.5–2.5 | 2.3 | 3 | — |
| Cl ⁻ (mEq/l) | 111.9 | 132–136 | 129 | 109 | 154 |
| HCO ₃ ⁻ (mEq/l) | 23.1 | 24–26 | 23.1 | — | — |
| P (mmol/l) | 1.1 | n.a. | 1.1 | — | — |
| Lactate ⁻ (mEq/l) | n.a. | n.a. | — | 28 | — |
| Glucose (g/l) | 0.61 ³⁾ | 4–10 | 0.61 | — | — |
| Osmolality ratio | approx. 1 (289 mOsm/kg H ₂ O) | n.a. | approx. 1 | approx. 0.9 | 1 |
| pH | 7.307 | n.a. | approx. 7.3 | approx. 6.7 | approx. 6.3 |

CSF: cerebrospinal fluid; n.a.: No data available.

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、脳細胞に生理的な保護的作用を示すことを認めた。⁵⁾ 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などを指標に、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、脳細胞に生理的な保護的作用を示すことを認めた。^{6,7)} さらに、ラットでの実験的な脳手術においてアートセレブによる洗浄は生理食塩液や乳酸リンゲル液と比較して手術後の脳浮腫や細胞への障害を最小限に抑えることを Doi ら⁸⁾は報告している。また、HCO₃⁻濃度を変更して pH を変えたアートセレブの処方変更品において、培養脳細胞への影響がないことをミトコンドリア活性から確認している。⁵⁾

そこで、本研究では、アートセレブ組成中の HCO₃⁻ や Mg²⁺ が細胞膜の取り込み機能に及ぼす効果について、デオキシ-D-グルコースの取り込み活性を指標に調べ、これらの配合の意義と有効性について述べる。なお、手術部位には神経細胞のみではなく、色々な細胞が混在していることから、ラット胎児から分取した脳細胞（アストロサイト、神経細胞などの混合細胞）の初代培養系を用いる。

実験方法

1. 試薬 Dulbecco's MEM Medium 及びウシ胎児血清は DS ファーマバイオメディカル（大阪）より入手した。Penicillin-streptomycin 溶液及び amphotericin B は Sigma Aldrich (St. Louis, MO,

USA) より入手した。³H-デオキシ-D-グルコースは積水メディカル（茨城）より入手した。ACS-II は GE Healthcare UK Ltd. (Buckinghamshire, England) 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 ラット胎児脳細胞の調製と単層培養は既に報告している試験と同じ方法にて行った。⁵⁾ すなわち、実験には妊娠 15–17 日目の Sprague-Dawley ラット（日本チャールス・リバー、神奈川）を用い、エーテル麻酔下に胎児を摘出し脳組織から生細胞数 1×10^5 cells/ml 程度の脳細胞懸濁液を調製した。実験には、トリパンブルー染色法により求めた生存率が 90% 以上の細胞を使用した。24 well プレートに 0.4 ml/well の脳細胞懸濁液を分注し、37°C に設定した CO₂ インキュベーターで培養した。培養 3 日後と 5 日後に培地交換を行い、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 6–7 日）で試験に用いた。なお、実験は大塚製薬工場研究開発部門動物実験委員会の動物実験指針に従って行った。

3. 各試験液曝露及び³H-デオキシ-D-グルコースの取り込み活性 HCO₃⁻ あるいは Mg²⁺ を含まないアートセレブ処方の試験液は、NaCl の添加により浸透圧をアートセレブ処方と同じに調製した。HCO₃⁻ を含む乳酸リンゲル液及び生理食塩液処方は重炭酸ナトリウム溶液の添加により調製した。培地を各試験液 200 μ l/cm² に交換し、1 あるいは 3 時

間培養した後に、 $200 \mu\text{l}/\text{cm}^2$ の培地に交換した。その直後あるいは24時間培養後に、 $0.037 \text{ MBq}/50 \mu\text{l}/\text{cm}^2$ の ^3H -デオキシ-D-グルコースを添加し、 CO_2 インキュベーターで1時間培養した。その後、 4°C のPBS(-)で3回洗浄し、 $0.5 \text{ ml}/\text{cm}^2$ の0.1% Triton X-100を添加した。放射能濃度を測定するために、0.1% Triton X-100溶解液をカウンティングバイアルに分取し、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、Liquid Scintillation Analyzer 2500 TR (PerkinElmer Life And Analytical Sciences, Inc., Waltham, MA, USA)で2分間放射能を測定した。

4. 統計処理 試験はduplicateで行い、その平均値を用いて、各雌性ラットの胎児より調製した脳細胞毎に正常培養(10%ウシ胎児血清を含むDulbecco's MEM培地で培養)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、4例あるいは5例のデータは平均値(mean)と標準偏差(S.D.)を計算し、表示した。有意差はDunnett type 多重比較により求めた。

結果及び考察

アートセレブは頭蓋・脊髄腔内の洗浄・灌流に適用するための人工髄液として開発してきた。そこで、われわれは脳の組織へのアートセレブの影響を調べるためにラット胎児脳細胞の初代培養系を用いて検討を行った。

Figure 1はラット胎児脳細胞の初代培養系におけるアートセレブ、乳酸リンゲル液あるいは生理食塩液曝露後の ^3H -デオキシ-D-グルコース取り込み活性について比較し、さらに HCO_3^- の影響についても示している。アートセレブあるいは乳酸リンゲル液による曝露直後の ^3H -デオキシ-D-グルコース取り込み活性は、正常培養(control)と比較してわずかに低値か同程度であった。しかし、生理食塩液群は1時間曝露直後においてアートセレブと比較して低値の取り込み活性を示す傾向($p=0.19$)にあり、3時間曝露では有意に低値となった。 HCO_3^- を含む生理食塩液群においても同様であった。また、試験液を3時間曝露し、通常の培地に戻して24時間培養後の測定において、 HCO_3^- を含まないアートセレブ処方では、 ^3H -デオキシ-D-グルコース取り込み活性をアートセレブ曝露群と比較すると有意に

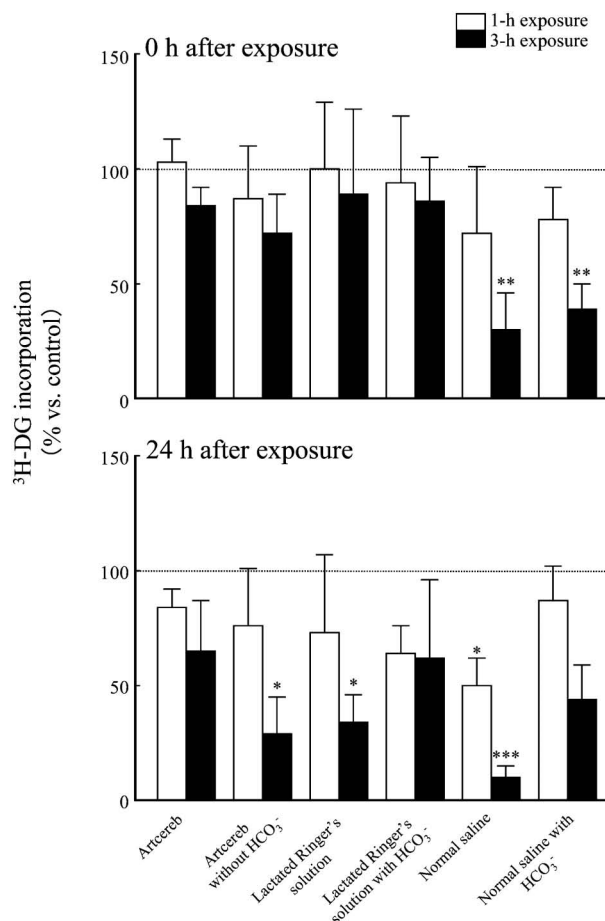


Fig. 1. Effects of Bicarbonate in Primary Cultures of Rat Fetal Brain Cells

Cell function was evaluated by measuring ^3H -deoxy-D-glucose incorporation in duplicate wells. Values are mean \pm S.D. ($n=5$). The statistical significance of differences between values was analyzed by the Dunnett's test. Significant differences at * $p<0.05$, ** $p<0.01$, and *** $p<0.001$ vs. the Artcereb group.

低値となった。乳酸リンゲル液においても3時間曝露し24時間培養後では、アートセレブ曝露群と比較して有意に低値を示した。さらに、生理食塩液群においては1時間曝露と3時間曝露共に24時間培養後においてアートセレブ曝露群と比較して有意に低値であった。しかし、 HCO_3^- を含む乳酸リンゲル液及び生理食塩液群ではアートセレブ曝露群と比較して有意な差は認めなかった。

Figure 2はラット胎児脳細胞の初代培養系におけるアートセレブ、 Mg^{2+} を含まないアートセレブあるいは生理食塩液曝露後の ^3H -デオキシ-D-グルコース取り込み活性について比較している。 Mg^{2+} を含まないアートセレブ曝露での ^3H -デオキシ-D-グルコース取り込み活性は、曝露直後の結果をアートセレブと比較すると低値をとるものの明確な差はみら

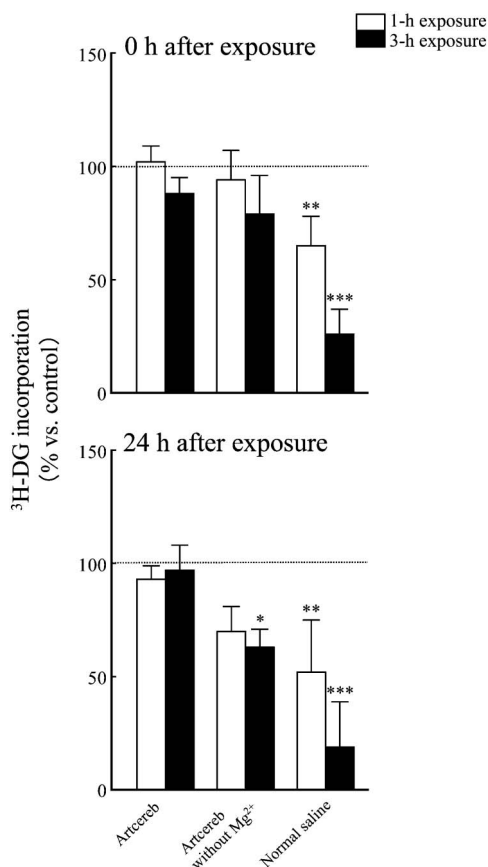


Fig. 2. Effects of Mg²⁺ in Primary Cultures of Rat Fetal Brain Cells

Cell function was evaluated by measuring ³H-deoxy-D-glucose incorporation in duplicate wells. Values are mean ± S.D. (n=4). The statistical significance of differences between values was analyzed by the Dunnett's test. Significant differences at *p<0.05, **p<0.01, and ***p<0.001 vs. the Artcereb group.

れなかった。しかし、1時間曝露群で24時間培養後の結果においてアートセレブと比較して低値をとる傾向 (p=0.12) にあり、さらに3時間曝露で24時間培養後の結果では有意に低値であった。

生理食塩液曝露では、曝露直後において既に³H-デオキシ-D-グルコース取り込み活性が低下し、曝露24時間後の活性低下はより顕著になった。一方、HCO₃⁻又はMg²⁺を含まないアートセレブあるいは乳酸リンゲル液の曝露直後では、ほとんど変化を認めないが、曝露24時間後において取り込み活性が明確に低下した。一方、アートセレブにおいては、曝露直後、24時間後のいずれにおいても取り込み活性の低下がみられなかった。また、Enomotoらは、既にヒト胎児より調製したアストロサイ

トの継代培養系を用いて、生理食塩液曝露によりアポトーシス様の細胞死がみられるが、アートセレブではみられないことを見出ししている。⁷⁾ これらのことから、アートセレブはHCO₃⁻やMg²⁺を処方を含むことにより、アポトーシス様の細胞死を抑制する有効な効果を発揮することができると推察された。

われわれは既にラット胎児脳細胞の初代培養系を用いて形態学的な変化やミトコンドリア活性を指標に乳酸リンゲル液や生理食塩液と比較してアートセレブの有効性や重炭酸配合の意義について報告してきた。⁵⁾ 今回の報告では、³H-デオキシ-D-グルコース取り込み活性を指標に、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や乳酸リンゲル液よりも細胞機能に与える影響は少ないことや重炭酸の配合意義を示し、さらに、本剤処方からMg²⁺を除くと³H-デオキシ-D-グルコース取り込み活性の低下が認められ、Mg²⁺が配合されていることの重要性を明らかにした。

REFERENCES

- 1) Oka K., Yamamoto M., Nonaka T., Tomonaga M., *Neurosurgery*, **38**, 733-736 (1996).
- 2) Davson H., "Physiology of the Cerebrospinal Fluid," J&A Churchill Ltd., London, 1967, pp. 33-54.
- 3) Milhorat T. H., "Hydrocephalus and the Cerebrospinal Fluid," The Williams & Wilkins Company, Baltimore, 1972, pp. 1-41.
- 4) Sugita S., Fukue H., Shigemori M., *Molecular Medicine*, **33**, 825-826 (1996). (in Japanese)
- 5) Nishimura M., Naito S., *The Cell*, **40**, 254-257 (2008). (in Japanese)
- 6) Nishimura M., Doi K., Enomoto R., Lee E., Naito S., Yamauchi A., *Yakugaku Zasshi*, **129**, 1121-1126 (2009). (in Japanese)
- 7) 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).
- 8) Doi K., Kawano T., Morioka Y., Fujita Y., Nishimura M., *Surg. Neurol.*, **66**, 565-572 (2006).