

# ラットの網膜虚血再灌流モデルにおける 顆粒球コロニー形成刺激因子の有効性

*Effectivity of granulocyte-colony stimulating factors  
in a model of ischemia-reperfusion injury in the rat.*

印牧信行, 和田恭則, 恩田 賢

麻布大学

Nobuyuki Kanemaki, Yasunori Wada, Ken Onda

Azabu University

**Abstract.** Effectivity of granulocyte-colony stimulating factors was investigated in a model of ischemia-reperfusion injury in the Sprague Dawley rat. The b/a ratio of electroretinograms was increased seven days after the ischemia-reperfusion injury. But the increased of its ratio was not inhibited by the injection of a granulocyte-colony stimulating factor. Thickness of the inner layer against the whole retinal thickness was increased after the ischemia-reperfusion injury, and its increase was inhibited by the injection of a granulocyte-colony stimulating factor. The impression of mRNA of nuclear factor kappa-B in the retinal tissue was higher by the injection of a granulocyte-colony stimulating factor. Therefore granulocyte-colony stimulating factor may be modelated at the the ischemia-reperfusion injury of netina.

## 1. 目 的

最近, 顆粒球コロニー形成刺激因子 (G-CSF) は直接, 神経細胞に作用して脳卒中から回復させることが指摘され, 脳虚血後の神経機能を長期間, 回復させる可能性が認められつつある [9]。とくに黒質・線条体系ドパミン含有神経細胞に対する G-CSF の保護作用が注目されている。網膜では, ドパミンはアマクリン細胞と Interplexiform cells に存在することが知られる [6]。網膜の虚血は糖尿病性網膜症, 高眼圧症, 緑内障, 網膜変性などにみられて, ラットでは視神経を縫合糸で一時的に縛ることで実験的網膜虚血障害モデルを作出することができる。そこで, 本研究はラット虚血・再灌流モデルを用いて G-CSF 投与時における網膜電図の変化と網膜組織中

iNOS, COX-2, TNF- $\alpha$ , NF- $\kappa$ B, VEGF, TGF- $\beta$  の mRNA 発現について調べた。

## 2. 方 法

8~9週齢の雄の Sprague Dawley ラットを用いた。網膜虚血障害モデルとして60分網膜虚血・再灌流処置で作出した。網膜虚血・再灌流処置として, まずケタミン (動物用ケタラール 50 : 三共社製) 60 mg/kg 及びキシラジン (セラクター 2% 注射液 : バイエル社製) 10 mg/kg を腹腔内注射し麻酔をかけた。麻酔下にて, ラットを保定台に保定し, モノフィラメントナイロン非吸収性縫合糸 (Monosof 6-0 : タイコヘルスケアジャパン株式会社製) にて右側の視神経乳頭及び網膜中心動脈・静脈を結紮し, 90D 眼底レンズにて網膜が完全に虚血状態であるこ

とを確認した。結紮処置より60分後、結紮を解除し血液を再灌流させた。処置には滅菌眼科器具を用いた。実験群として、虚血・再灌流処置を行いrhG-CSF（グランKRN8601：麒麟麦酒社製）50  $\mu\text{g}/\text{kg}$ を投与した群（G-CSF群）、虚血・再灌流処置だけを行った群（対照群）、虚血処置もrhG-CSF投与も行わなかった群（無処置群）の3群を設けて行った。rhG-CSFは網膜虚血・再灌流処置前5日より連日投与し、虚血・再灌流処置後7日目までの計12日間継続した。

総白血球数の算定はまずイソフルレン（エスカイン：メルク・ホーエー社製）の吸入麻酔下で鎖骨下静脈より1 mlの採血を行ない、直ちに採取血液を用いて自動血球計算器（Celltac  $\alpha$ ：日本光電社製）で行なった。

網膜虚血・再灌流処置後7日に網膜電図検査、網膜組織所見ならびに網膜組織中サイトカインの発現について調べた。すなわち、網膜電図検査は散瞳処置とウレタン麻酔下で、単一フラッシュ刺激の全視野刺激装置を用いて、測定条件をHi Cut 1000 Hz, Low Cut 0.5 Hz, 発光エネルギー40 J, 感度0.2 mV, 輝度3.18  $\text{cd} \cdot \text{s}/\text{m}^2$ として行なった。また網膜組織所見では、網膜虚血・再灌流処置後7日目にイソフルランにて麻酔後放血致死させ、眼球を摘出した。摘出した眼球はFG液（PH 7.4 0.1 M リン酸緩衝液370 mlに40%ホルマリン溶液10 ml, 25%グルタルアルデヒド溶液20 mlを混和したもの）にて24時間固定した後、中性緩衝ホルマリン液にて再固定し、

ヘマトキシリン・エオジン染色標本を作製した。網膜部位の観察方法は[3,8]の報告に準じ、視神経乳頭の位置より左右およそ0.875, 1.925, 2.975 mmの位置の計6箇所で行なった。網膜組織中サイトカインの発現について、網膜虚血・再灌流処置後7日目に摘出眼球から網膜組織を採材し、以下のprimerを用いたRT-PCR法を行った。TNF- $\alpha$  (351 bp), TGF- $\beta$  (250 bp), VEGF (202 bp), NF- $\kappa\text{B}$  (397 bp), ICAM-1 (332 bp)のprimerは市販品を利用した(Maxim Biotech. Inc., CA, USA)。GAPDH (380 bp), COX-2 (253 bp), iNOS (751 bp)は既報告よりprimerを作成して用いた[1,2]。

### 3. 結果と考察

白血球総数は対照群において5日目に $79.8 \pm 9.1 \times 10^2$ 個/ $\mu\text{l}$ , 12日目に $83.0 \pm 7.8 \times 10^2$ 個/ $\mu\text{l}$ , 無処置群で5日目に $73.4 \pm 10.3 \times 10^2$ 個/ $\mu\text{l}$ , 12日目に $80.7 \pm 8.1 \times 10^2$ 個/ $\mu\text{l}$ であったのに対し、G-CSF群においては5日目に $124.2 \pm 36.2 \times 10^2$ 個/ $\mu\text{l}$ , 12日目に $162.2 \pm 19.7 \times 10^2$ 個/ $\mu\text{l}$ まで増加し、5日目 ( $P < 0.05$ ), 12日目 ( $P < 0.01$ )ともに統計学的有意差が認められた(図1)。G-CSFは好中球の末梢血中への動員の促進, 成熟好中球の機能亢進, 好中球前駆細胞の分化・増殖の促進, 好中球遊走能の促進を有することが報告されている[5]。今回の結果でも明らかな白血球増加がG-CSF群で確認された。

網膜電図のb/a振幅比では、すべての刺激輝度条件において対照群, G-CSF投与群, 無処置群の順に

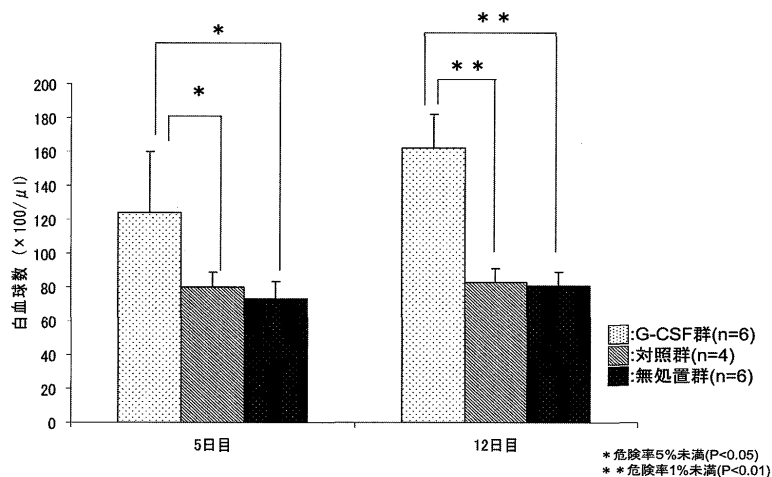


図1 G-CSF投与による白血球数の変化

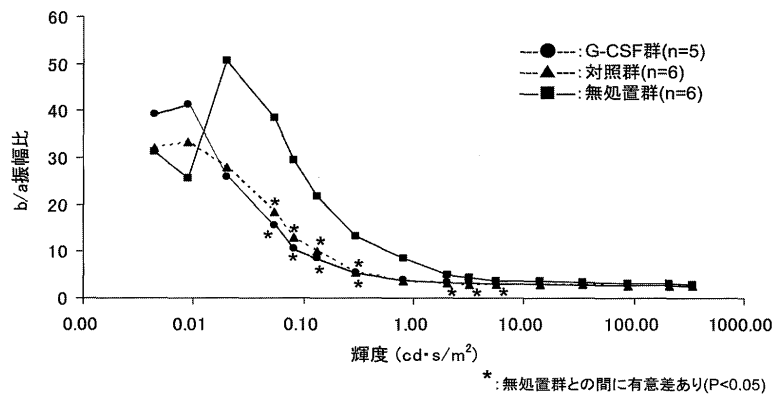


図2 刺激輝度の変化による網膜電図 b/a 振幅比の推移

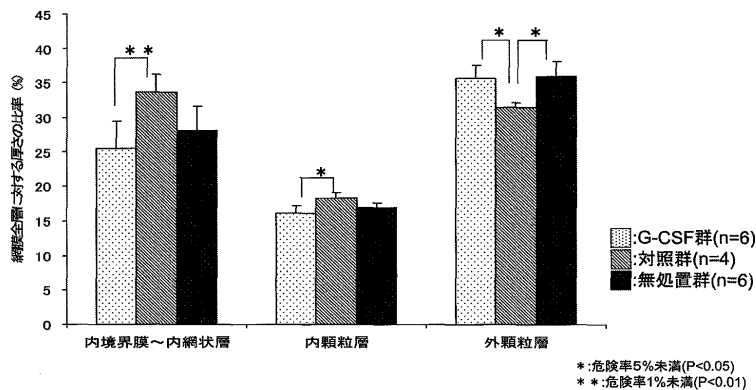


図3 網膜全層に対する各層の厚さの比率

b/a 振幅比が大きくなり、刺激輝度 0.055 ~ 0.8 および 3.18 ~ 14.0 cd · s/m において対照群と無処置群との間に有意な差がみられた (図2)。G-CSF 投与群と対照群との間には差違はなかった。b/a 振幅比は変動係数が小さい安定したパラメータであり、網膜循環障害に起因する網膜症の病態を推察するのに適しているとされている [4,7]。今回の結果は無処置群と比較し対照群に b/a 振幅比の有意な低下が見られたことから、虚血による網膜障害を評価するのに適したパラメータであると考えられた。しかし G-CSF 投与群の b/a 振幅比は対照群との間で差違がみられず、G-CSF 投与による網膜虚血・再灌流障害を軽減させる効果が b/a 振幅比ではみられなかった。

一般に網膜虚血・再灌流障害は網膜を菲薄させ神経細胞数を減少させることが報告されている [3]。今回の成績は網膜全層に対する各層の変化で G-CSF 投与における網膜虚血・再灌流障害の効果を検討した。その結果、内境界膜から内網状層までの部位と内顆粒層で G-CSF 群は対照群に比べ有意に低い、外顆

粒層では G-CSF 群が対照群に比べ有意に高かった (図3)。この結果を無処置群の値と比較すると、網膜虚血・再灌流障害は網膜全層に対する外顆粒層の厚さを低下させ、また内境界膜から内網状層までの部位および内顆粒層の厚さを増加させることを示した。G-CSF はこのような網膜の障害を軽減させる効果がみられた。

RT-PCR 法の結果では、rhG-CSF の投与によって NF-κB の mRNA 発現が他の群に比べ顕著であった (図4)。しかしウェスタンブロット法による解析では iNOS 蛋白の発現は確認できず、nNOS 蛋白の発現は3群間に変化がみられなかった。また NF-κB の発現は G-CSF 群および対照群が無処置群に比べて発現が増加する傾向にあった。以上から、網膜虚血時における NF-κB の発現は亢進していることが示された。しかし NF-κB における mRNA 発現レベルの増加は G-CSF 投与で顕著であったことから、虚血・再灌流障害での G-CSF の作用には様々な段階の因子が関与しているものと考えられた。

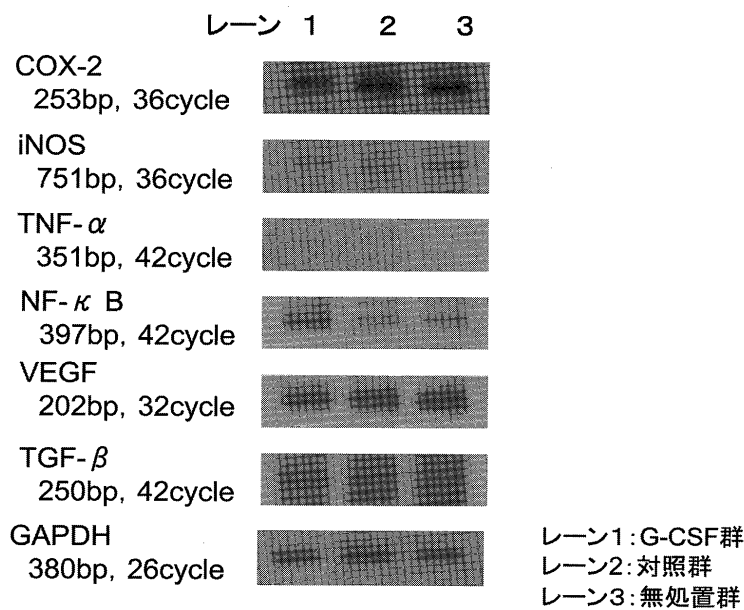


図4 G-CSF投与における網膜組織のサイトカイン mRNA 発現量

## 要約

Sprague Dawley ラットを用いて網膜虚血再灌流モデルにおける顆粒球コロニー形成刺激因子の有効性を調べた。網膜電図の b/a 振幅比は網膜虚血再灌流処置後7日で増加した。顆粒球コロニー形成刺激因子の投与はこの b/a 振幅比の増加を抑制することができなかった。また全網膜の厚さに対する網膜内層は網膜虚血再灌流処置で増加し、またこの増加は顆粒球コロニー形成刺激因子の投与によって抑制された。網膜組織中の NF-kappaB mRNA の発現は顆粒球コロニー形成刺激因子の投与によって増強された。以上から、顆粒球コロニー形成刺激因子は網膜虚血再灌流障害に影響を与えるかもしれない。

## 文献

- [1] Gustafson-Svard C, Lilja I, Hallbook O, Sjobahl R.: Cyclooxygenase-1 and Cyclooxygenase-2 gene expression in human colorectal adenocarcinomas and in azoxymethane induced colonic tumors in rats. *Gut* 38: 79-84, 1996.
- [2] Koga T, Koshiyama Y, Gotoh T, Yonemura N, Hirata A, Tanihara H, Negi A, Mori M.: Coinduction of nitric oxide synthase and arginine metabolic enzymes in endotoxin-induced uveitis rats *Exp Eye Res* 75: 659-667, 2002
- [3] Lafuentr P, Villegas-Peretz P, Mayor S, Aguilera E, de

Imperial JM, Vidal-Sanz M: Neuroprotective effects of brimonidine against transient ischemia-induced retinal ganglion cell death: a dose response in vivo study, *Exp. Eye Res* 74: 181-189, 2002

- [4] 中川照丈, 倉崎茂, 鷓飼清治, 久保里子, 増田千春 (1987): ウサギその他の実験動物の網膜電図, *比較眼科*, 6(1・2), 53-61
- [5] 根田公一, 菊森幹人, 西澤嘉人, 泉英明, 天野健次, 常盤知宜: 遺伝子組換えヒト由来顆粒球コロニー形成刺激因子 (rG-CSF: KRN8601) の毒性研究 (第1報) マウス, ラット及びサルにおける急性毒性試験, *医薬品研究*, 21(2): 265-269 (1990)
- [6] Nguyen-Legros J, Simon A, Caille I, Bloch B.: Immunocytochemical localization of dopamine D1 receptors in the retina of mammals. *Vis Neurosci*. 14(3): 545-545 (1997)
- [7] 尾崎 浩 (1985): 視覚に関する毒性試験; 網膜の電気現象とその毒性応用; *トキシコロジーフォーラム*, 8(1), 68-84
- [8] Rosenbaum DM, Rosenbaum PS, Singh M, Gupta H, Li B, Roth S: Function and morphologic comparison of two methods to produce transient retinal ischemia in the rat, *Journal of Neuro-ophthalmology* 21(1): 62-68, 2001
- [9] Schabitz WR, Kollmar R, Schwaninger M, Juettler E, Bardutzky J, Scholzke MN, Sommer C, Schwab S: Neuroprotective Effect of Granulocyte colony-stimulating factor after focal cerebral ischemia, *Stroke*, 34, 745-751 (2003)