

Müller 細胞に対するインドシアニングリーンの毒性

松井 広文, 唐沢 容子, 佐藤 智人, 菅野早恵子, 西川 真平, 沖坂 重邦

防衛医科大学校眼科学教室

要 約

目的: 培養 Müller 細胞に対するインドシアニンググリーン(ICG)の影響を調べる。

方法: 培養ウズラ Müller 細胞を, 温度, 濃度, 時間を変えて ICG に接触させ, 生存細胞と細胞死の量を測定した。

結果: 20°Cでの接触では, 接触直後は対照と細胞の生存量, 形態とも差はなかった。ICG を洗浄後培養すると, 長時間, 高濃度で ICG と接触したもののほど細胞死の増加と形態変化がみられた。長時間, 高濃度では細胞死の増加とともに生存細胞も減少したが, 低濃度かつ短時間では細胞死の増加に加え生存細胞も増加した。

37°C 60 分間の接触では直後に形態変化があり, 20°C と比べ細胞がより ICG に染色された。37°C 3 分間での接触では 60 分間のときほど生存細胞や細胞死の量に変化はみられなかった。

結論: Müller 細胞と ICG の接触では, 37°C では 20°C に比べより早期に多くの細胞死が起きた。Müller 細胞に対する ICG の毒性は濃度と接触時間に依存した。(日眼会誌 111 : 587-593, 2007)

キーワード: インドシアニンググリーン(ICG), 温度, Müller 細胞, 細胞毒性, 硝子体手術

Toxicity of Indocyanine Green Dye on Müller Cells

Hirofumi Matsui, Yoko Karasawa, Tomohito Sato, Saeko Kanno
Shimpei Nishikawa and Shigekuni Okisaka

Department of Ophthalmology, National Defense Medical College

Abstract

Purpose: To analyze the effect of indocyanine green (ICG) dye on cultured Müller cells.

Methods: Cultured quail Müller cells were exposed to ICG dye at different temperatures and ICG concentrations for different exposure duration. Viability and death of the Müller cells were determined spectrophotometrically.

Results: The cells did not change in viability or morphology soon after the exposure to ICG at 20°C. However, further cultivation of the ICG-exposed cells after washing out ICG caused cell death and morphological changes depending on dose and duration of the preceding ICG exposure at 20°C. Although ICG exposure at a higher concentration and longer duration induced more cell death and reduced cell viability, ICG exposure at a lower con-

centration and shorter duration raised cell viability in spite of increased cell death. ICG exposure at 37°C for 60 minutes induced morphological changes soon and the cells were stained more intensively with ICG than with exposure at 20°C. Shortened exposure of three minutes at 37°C showed less change of cell viability and cell death than exposure of 60 minutes.

Conclusion: ICG exposure at 37°C caused earlier and more cell death than exposure at 20°C. The cytotoxicity of ICG on Müller cells was dose and exposure-time dependent.

Nippon Ganka Gakkai Zasshi (J Jpn Ophthalmol Soc 111 : 587-593, 2007)

Key words: Indocyanine green (ICG), Temperature, Müller cell, Cytotoxicity, Vitrectomy

I 緒 言

黄斑円孔手術において内境界膜(internal limiting

membrane : ILM) 剝離は一般に広く行われており¹⁾⁻⁵⁾, その際内境界膜を可視化するため, インドシアニンググリーン(indocyanine green : ICG)溶液を用いた内境界

別刷請求先 : 359-8513 所沢市並木 3-2 防衛医科大学校眼科学教室 唐沢 容子 E-mail : kyop518@ndmc.ac.jp
(平成 18 年 6 月 7 日受付, 平成 19 年 2 月 19 日改訂受理)

Reprint requests to : Yoko Karasawa, M.D. Department of Ophthalmology, National Defense Medical College,
3-2 Namiki, Tokorozawa 359-8513, Japan

(Received June 7, 2006 and accepted in revised form February 19, 2007)

膜染色が広く行われている。しかしながら ICG 使用時に視力改善が得られない、あるいは網膜萎縮が生じることがあり、その原因として、視機能に重要な役割を担っている色素上皮や^{6)~8)}、神経節細胞⁹⁾への傷害が検討されてきた。

また、神経細胞の機能に必要な代謝や恒常性の維持を行っているグリア細胞の一種で、網膜の支持組織でもある Müller 細胞¹⁰⁾¹¹⁾に関しても、ヒト献眼の網膜に ICG を接触させると Müller 細胞の破壊が電顕で認められたことや¹²⁾、ラットでは Müller 細胞に 0.5% ICG が接触した場合アポトーシスがみられたと報告されている¹³⁾。さらに Müller 細胞と ICG との接触した際の条件については、濃度、接触時間について報告されており⁸⁾、このなかで浸透圧が低くなく照射がなければ毒性がないと述べられているが、温度の違いによる影響を調べた報告はない。

今回我々は Müller 細胞に着目し、ICG との接触時の条件の違いによる影響を調べるため、培養ウズラの Müller 細胞株を用い、ICG を温度、濃度、接触時間を変えて接触させ、Müller 細胞の生存細胞と死滅細胞の量を計測した。

II 対象と方法

1. 細胞の培養

ウズラ胚由来で Müller 細胞の特性を有する QNR/K2 細胞株を American type culture collection より入手した。細胞はペニシリン、ストレプトマイシンと 10% ウシ胎仔血清 (FBS, ICN Biomedicals, Mesa, CA, USA) 添加 Dulbecco 改変 Eagle 培地 (Sigma, Grand Island, NY, USA) (DMEM-10% FBS) を培養液とし、取扱説明書に従って 95% 空気と 5% 二酸化炭素中で培養した。培養の際の温度はウズラの体温は人間より高いことを考慮し、取扱説明書に従い 39°C に設定した。細胞は 0.25% トリプシン-0.03% エチレンジアミン 4 酢酸 (EDTA) で解離し、カルシウム・マグネシウム不含 Dulbecco のリン酸緩衝液 (PBS) を用いて洗浄し、DMEM-10% FBS に懸濁後、実験のため 24 穴の培養器に 0.4 ml ずつ分注した。細胞が増殖しほぼコンフルエントになった時点で、細胞を ICG 溶液に接触させた。

2. ICG との接触

ICG は蒸留水で 25 mg/ml に溶解した後、オキシグルタチオン溶液 (BSS, Alcon) で 5 mg/ml に希釈した。ICG 溶液はそれぞれの濃度で浸透圧を等しくするために蒸留水と BSS を 1:4 の割合で混和した溶液で実験濃度まで希釈した。対照として ICG を含まない蒸留水と BSS の混和液を同じ温度と時間、細胞に接触させた。

培地から培養液を取り除いた後、Müller 細胞に 20°C または 37°C の ICG 溶液を指定した時間、濃度で暗所に

て接触させた。その後、洗浄液の ICG の色が視認できなくなるまで PBS を用いて洗浄を行い、DMEM-1% FBS を加え所定の時間 39°C で培養後測定を行った。測定のバックグラウンドとしては細胞を加えない穴に同様の操作を行った。

3. 生存細胞と死滅細胞の測定

生存細胞の評価には非放射性的細胞増殖分析試薬である CellTiter 96[®] Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay (Promega, Madison, WI, USA) を用いた。この試薬は、代謝活性のある細胞の脱水素酵素により生産される NADPH と NADH を定量するもので、取扱説明書に従って測定した。培養に試薬を加えて上清の色が測定に適するまで培養し、上清の吸光度を 490 nm で測定した。

細胞の死滅は Cytotoxicity detection kit (Roche Molecular Biochemicals) を用いて死んだ細胞より放出される培養液中の乳酸脱水素酵素 (LDH) 活性を測定した。ICG と接触後は、FBS 中の LDH の影響を低減させるため培養液の FBS 濃度を 1% として 39°C で培養を継続した。記載時間後培養上清を採取し、必要があれば希釈し、説明書に従い測定試薬と反応をさせた後、490 nm と 650 nm での吸光度の差を測定した。また位相差顕微鏡を用いて細胞の形態を観察した。

III 結果

20°C においてさまざまな濃度の ICG を、Müller 細胞に 60 分接触させた直後に生存細胞や形態を比較したところ、いずれの濃度においても対照と差はみられなかった (図 1 A, 図 2 A, E)。

5 mg/ml の ICG に 20°C で 60 分接触後、洗浄した Müller 細胞をさらに 39°C で培養した。顕微鏡で細胞の形態を観察すると、ICG と接触した細胞は培養再開 4 時間以降では細胞突起の破壊や生存細胞が一部で丸くなるなどの変化が認められた (図 2 A~D)。対照では、36 時間後には実験開始直後と比べて細胞数の増加がみられたが、96 時間後では多くの細胞が死滅していた (図 2 E~H)。

ICG と接触した細胞では、死滅細胞の量は 20 時間後まで直線的に増加したが、その後、変化が緩やかになった。対照では 36 時間後までは ICG と接触したものと比べ細胞死の割合は少なかったが、それ以降は死滅細胞の量は急速に増加した (図 3)。

ICG 接触後に 39°C で培養した場合、培養再開後 20 時間から 36 時間にかけて細胞死の変化が少なかったことから、ICG 接触直後に生存細胞の量に大きな差がない場合は、さらに 24 時間培養後に生存細胞と細胞死を測定して ICG の影響を評価した。

Müller 細胞を 20°C において濃度や時間を変えて ICG に接触させ、洗浄後 39°C で 24 時間培養した後に死滅細胞

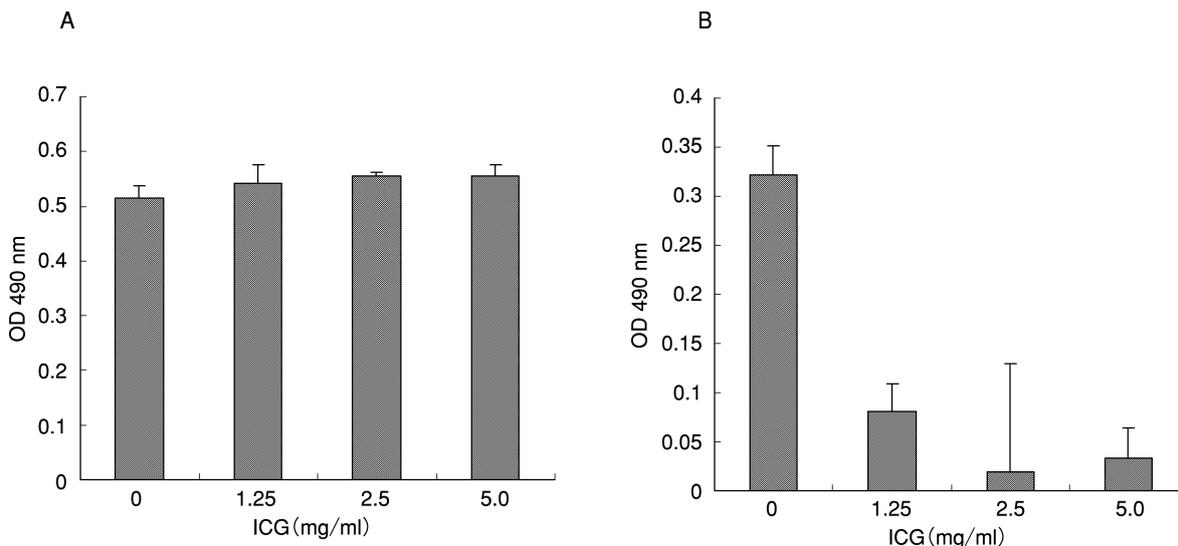


図 1 60 分間 ICG 接触直後の生存細胞定量.

表示濃度のインドシアニンググリーン(indocyanine green : ICG)を A : 20°C, B : 37°C で 60 分間細胞に接触させた直後の生存細胞の量を測定. 3 つの測定値の平均値と標準偏差. A : 20°C では生存細胞の量に変化はみられなかったが, B : 37°C では ICG 濃度にかかわらず生存細胞の量は減少した.

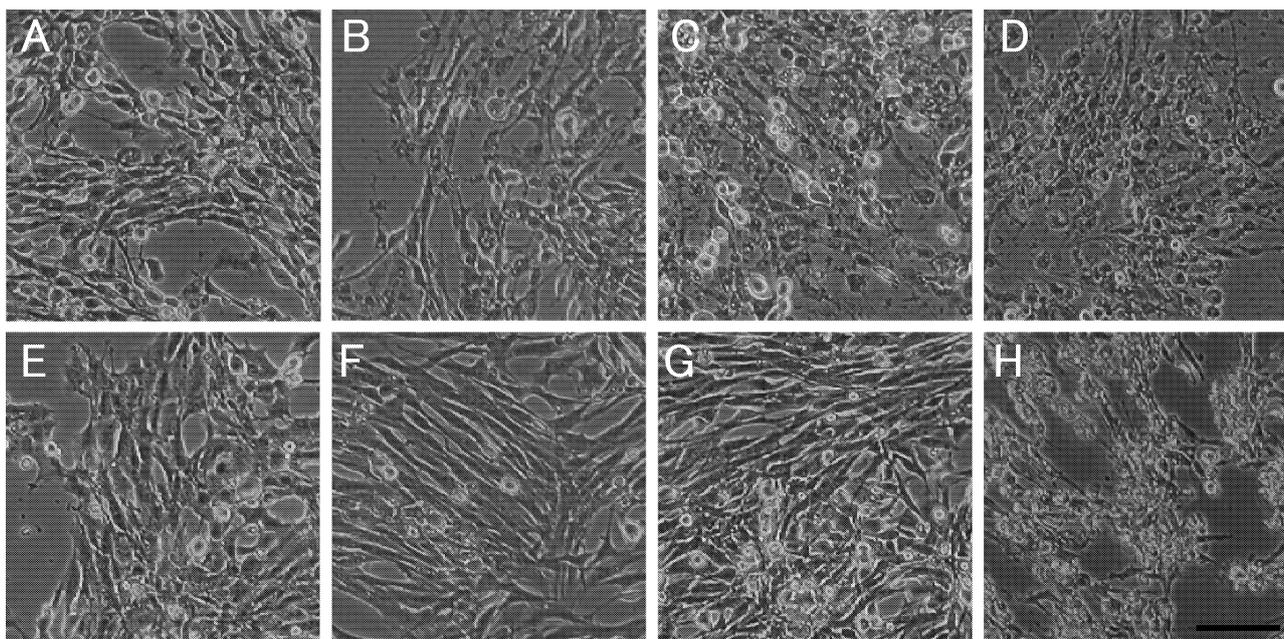


図 2 ICG 接触後の細胞の経時的な形態の変化.

60 分間 20°C で 5 mg/ml の ICG と接触後 1%ウシ胎仔血清添加 Dulbecco 改変 Eagle 培地(DMEM-1% FBS)にて培養を継続した細胞の位相差顕微鏡写真. A~D : ICG 接触細胞, E~H : 対照の細胞. A, E : ICG または対照溶液洗浄直後, B, F : 4 時間後, C, G : 36 時間後, D, H : 96 時間後. ICG に接触した細胞は 4 時間後には細胞の変性がみられ, 36 時間後には変性はより著明となった. 対照では 36 時間後までは細胞は形態が保たれ増殖したが, 96 時間後には細胞の変性がみられた. スケールは 100 μ m.

胞と生存細胞の量を比較した. 死滅細胞はいずれの ICG 接触濃度, 時間でも, 濃度が高いほどあるいは接触時間が長いほど増加した. 生存細胞は ICG と 60 分間の接触では ICG の濃度が高くなるにつれて, また ICG 濃度が 5 mg/ml では接触時間が長くなるにつれて減少した. それに対して ICG が低濃度でかつ短時間の接触である場合では, 死滅細胞は増加しているにもかかわらず

ず, 生存細胞に増加がみられた(図 4 A, B).

ICG 接触温度をヒトの体温である 37°C に変えて, ささまざまな濃度の ICG と Müller 細胞を 60 分間接触させた. いずれの濃度においても接触直後に著明な生存細胞の減少がみられた(図 1 B). 今回の実験で最も低濃度であった 1.25 mg/ml の ICG と Müller 細胞を接触させ洗浄後に位相差顕微鏡で観察すると, 細胞突起の破壊や生

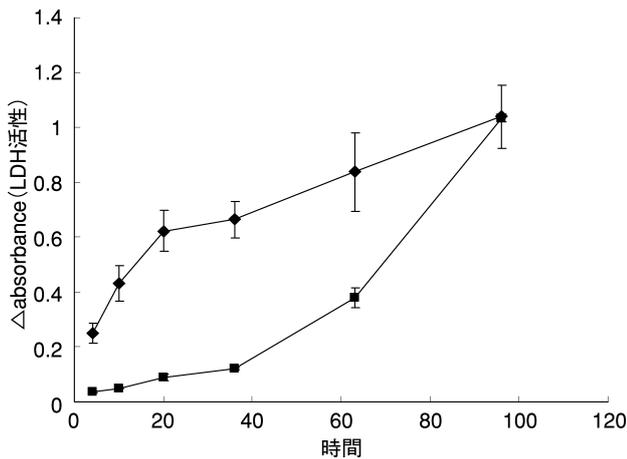


図3 ICG接触後の細胞死の経時的な変化。

20°Cで60分間ICG接触後の細胞死の測定。ICGに接触後DMEM-1%FBSにて培養し、指定時間に培養上清を採取し吸光度を用いて乳酸脱水素酵素(LDH)活性を測定。4つの測定値の平均値と標準偏差。ICGに接触したものは20時間後までは急速にLDH活性が上昇した。対照では36時間後までLDH活性の上昇は緩やかであったが、その後急速に上昇した。

◆: 5 mg/ml, ■: 0 mg/ml

存細胞の形態が一部で丸く変化するなど、細胞の変性や形態の変化が認められた(図5)。また洗浄を行ってもMüller細胞にICGが多量に付着しており、20°Cで同様の実験を行ったものと比較して著明な違いが認められた(図6)。

37°Cにおいて5 mg/mlのICGとMüller細胞との接触時間を3分に短縮したところ、直後では生存細胞の量は60分接触させたときのような差はみられなかった。24時間後では対照と比べると生存細胞の量は大きくは変わらなかったが、死滅細胞の量の増加がみられた(図7A, B)。細胞の形態はICG接触後も細胞突起の破壊や生存細胞の形態が丸く変化するなどといった変化はみられず、24時間後においても対照と比べ形態に大きな差はみられなかった。

IV 考 按

本報告はMüller細胞に対するICG毒性の評価を目的とする基礎研究であり、培養細胞を用いて臨床とは異なった環境で実験を行っている。ICG処理の条件は必ずしも臨床と同一ではないが、本研究より臨床でのICG毒性の軽減の手がかりとなる結果が得られたものとする。

ICGを使用した硝子体手術の際に網膜が実際に接触

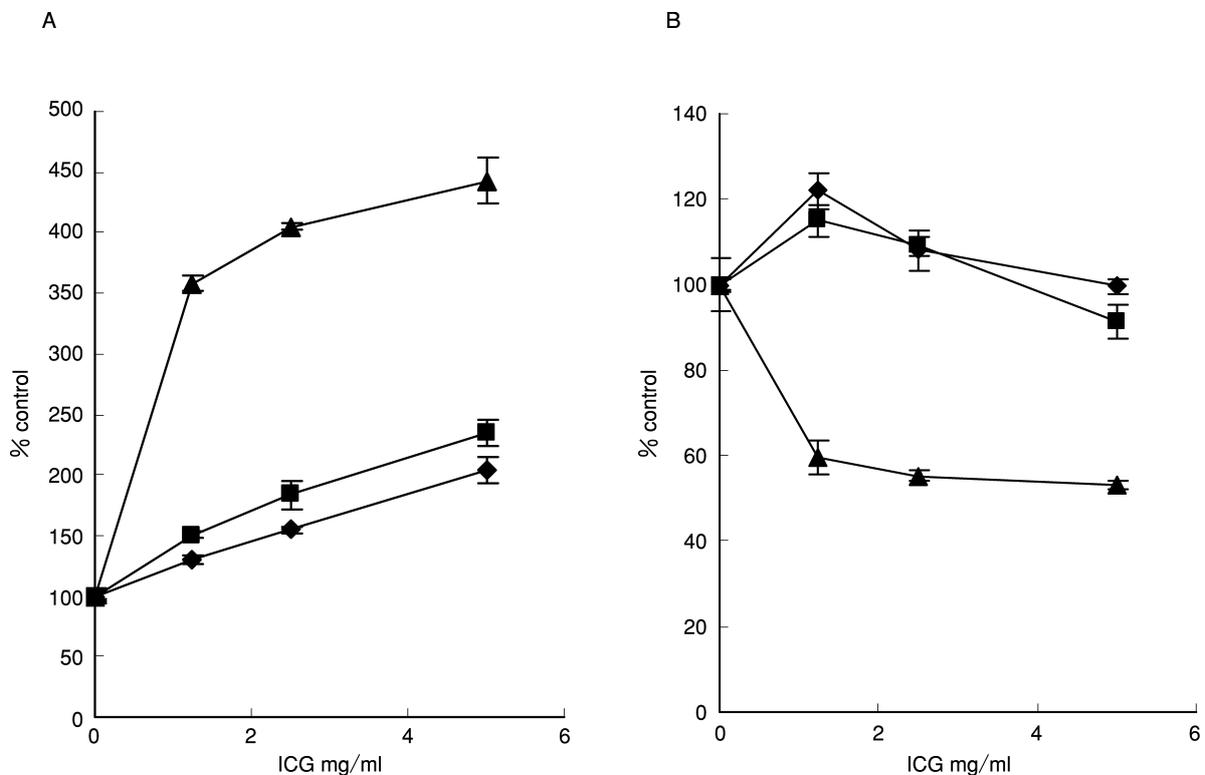


図4 20°CでICG接触後24時間後の細胞死と生存細胞の測定。

ICG接触後DMEM-1%FBSで24時間培養後測定。3つの測定値の平均値と標準偏差を対照に対する百分率で表す。A:細胞死。ICGが高濃度で接触時間が長いほど細胞死の量は増加した。B:生存細胞。高濃度かつ長時間の接触により生存細胞は減少したが、低濃度かつ短時間の接触では生存細胞は増加した。

◆: 3分, ■: 10分, ▲: 60分

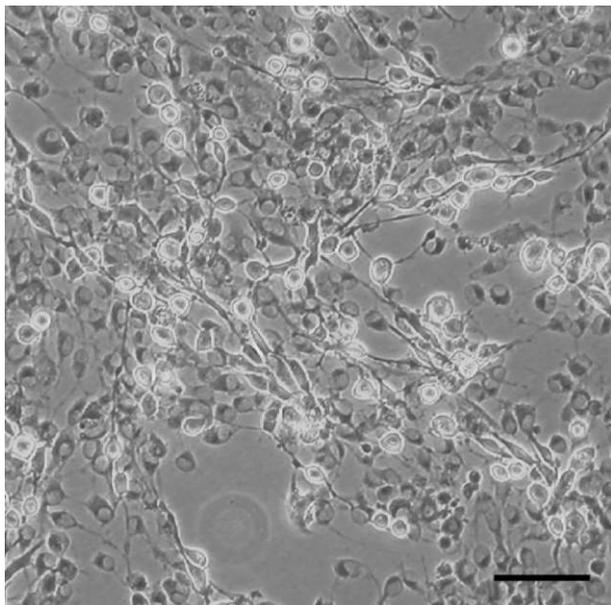


図 5 37°C で 60 分間 ICG と接触させた直後の細胞の位相差顕微鏡写真。
細胞突起の破壊や生存細胞の形態が一部で丸く変化するなど、細胞の変性や形態の変化が認められた。スケールは 100 μm。

する ICG 濃度は、術者の投与方法により大きく異なる。投与された ICG が直ちに硝子体内内の灌流液で均等に希釈されれば網膜が接触する ICG 濃度は投与前の濃度よりきわめて低い濃度となる。しかし、術者によっては目的以外の部位への ICG の接触を避けるために染色する網膜のすぐ近くに ICG を注入していることや、ICG 注入の際には注入した ICG と等量の灌流液がポートから眼外へ流出することから、注入した ICG に近い濃度の ICG が網膜に接触する場合も考えられる。今回の実験では過去の報告^{6)~9)12)13)}で行った実験濃度の範囲(0.025%~1%)を参考にし、あまり ICG 濃度が薄まらずに網膜と接触した場合を想定して、0.125%~0.5%の濃度で実験を行った。

60 分の ICG 処理直後では、処理温度 37°C では今回実験を行った濃度のうち最も低いものでも生存細胞が大きく減少したが、20°C ではどの濃度でも生存細胞に差はなかった。ICG 濃度が同じであっても 60 分間の接触後では 37°C の方が 20°C と比べ Müller 細胞はより強く染色された。温度による細胞毒性の差は、この染色性の違いが影響した可能性があると考えられた。また低温度では細胞の代謝が低下するため ICG の細胞毒性が減少した可能性も考えられた。文献では硝子体手術において灌

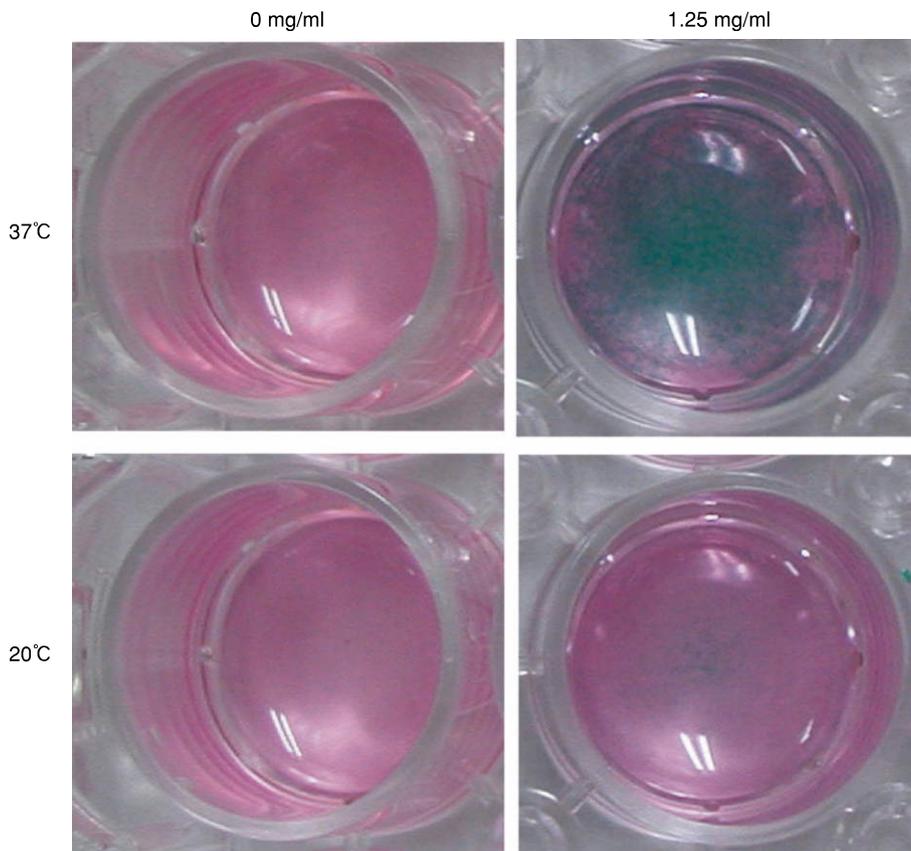


図 6 接触温度による ICG の付着の比較。
対照(左)と 1.25 mg/ml の ICG (右)に 37°C (上)と 20°C (下)で 60 分間接触させ洗浄した後の培養皿の写真。20°C と比較し 37°C ではより濃く ICG に染色された。

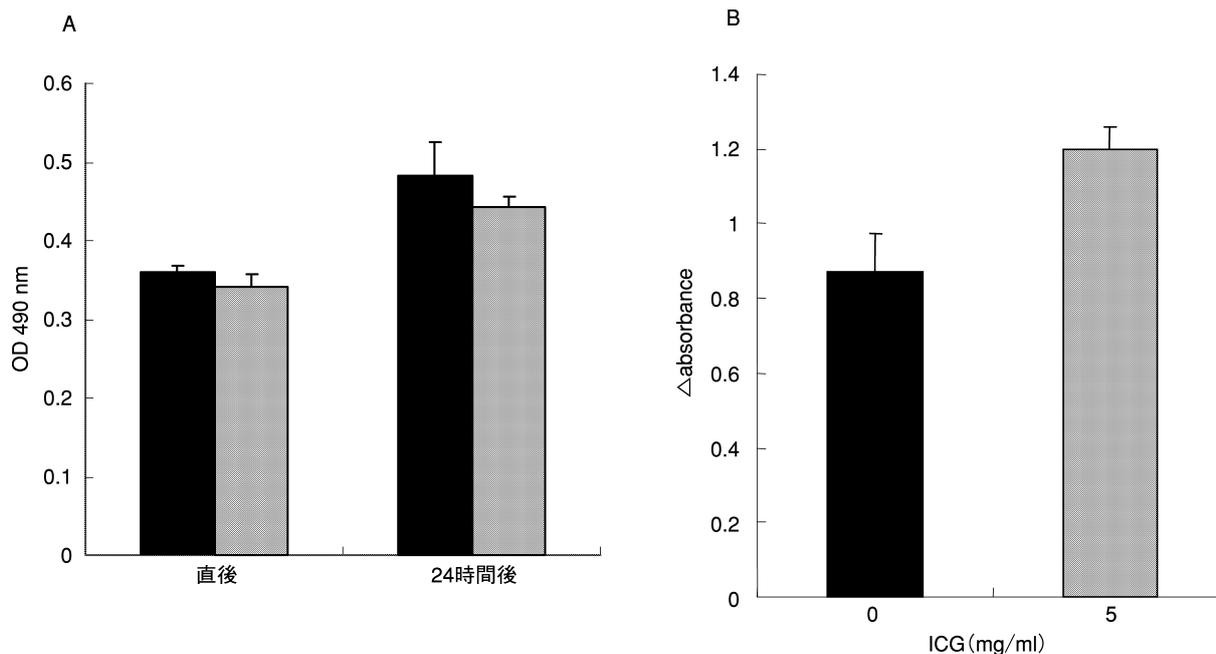


図 7 5 mg/ml の ICG と 37°C で 3 分間接触後の生存細胞と細胞死の定量。

A: 生存細胞。対照(黒)または ICG (灰色)に接触させた直後と 24 時間後に測定。B: 対照(黒)または ICG (灰色)と接触させ 24 時間後に測定した細胞死の量。4 つの測定値の平均値と標準偏差。A: 生存細胞の量は接触直後では対照と比べ大きな差はみられなかった。B: 24 時間後では対照と比べると生存細胞の量は大きくは変わらなかったが、細胞死の量は増加した。

流液の温度を室温から 7~8°C に下げると網膜に対する傷害を減らすことができたと報告されている^{14)~16)}。以上より硝子体手術を行う際、ICG を網膜に接触させる前にあらかじめ低温度の灌流液で網膜の温度を下げ、さらに ICG の温度も下げておくことで、ICG の Müller 細胞への毒性を軽減することができる可能性があると考えられた。ただしウサギを用いた硝子体手術では 2°C の灌流液を用いると水晶体や網膜に障害を引き起こすことが報告されており¹⁷⁾、ICG を用いた硝子体手術の際に眼内灌流液はどの程度の温度が最適かは検討を要する。

Müller 細胞に ICG を 20°C で 60 分間接触させた直後では生存細胞に変化はみられなかった。この後、ウズラを含めた鳥類の体温はヒトの体温より高いため、細胞購入先の取扱説明書に従い洗浄後 39°C で培養を行ったところ、接触してから 20 時間後まで急速に死滅細胞が増加していった。ICG 接触群と対照群の死滅細胞を比較すると、20 時間後までは ICG 接触群の方がより急速に死滅細胞が増加していったが、36 時間を過ぎるとその差は減少していった。これは対照群では、細胞が過剰に増殖したために培養液中の栄養分が消費し尽くされ、細胞死が起きたためであったと推測された。

20°C において ICG との接触直後では Müller 細胞に形態的な変化はほとんどみられなかった。しかし洗浄後に 39°C で培養を行うと細胞突起の破壊がみられた。また生存細胞においても丸く形態が変化した細胞が増加したことから、Müller 細胞の接着や細胞骨格に変化が生じた

可能性が考えられた。さらに ICG には界面活性作用があるため、温度の上昇により細胞に付着した ICG の界面活性作用が強まり、細胞の形態の変化に影響を及ぼした可能性も考えられた。

網膜色素上皮に対する ICG の毒性に関する報告と同様に^{7)18)~20)}、Müller 細胞においてもより長い時間またはより高い濃度での接触により細胞毒性が顕著に認められた。ただ今回の実験では 20°C での短時間かつ低濃度の ICG 処理の場合、死滅細胞が増加するのにもかかわらず、生存細胞も増加した。この理由ははっきりとはしないが、細胞がより盛んに増殖したか細胞の代謝を亢進させる何らかの理由があったのかもしれないと思われた。

ICG を用いることにより内境界膜剥離の手技は容易になったが、色素上皮細胞と同様に Müller 細胞に対しても ICG は毒性を認めた。したがって硝子体手術の際には、使用する ICG の濃度や接触時間に加えて、灌流液や ICG の温度を工夫して、少しでも術後の合併症を減らしていくことが重要であると考えられた。

文 献

- 1) Brooks HL Jr: Macular hole surgery with and without internal limiting membrane peeling. *Ophthalmology* 107: 1939-1948, 2000.
- 2) Mester V, Kuhn F: Internal limiting membrane removal in the management of full-thickness

- macular holes. *Am J Ophthalmol* 129 : 769—777, 2000.
- 3) **Olsen TW, Sternberg P Jr, Capone A Jr, Martin DF, Lim JI, Grossniklaus HE**, et al : Macular hole surgery using thrombin-activated fibrinogen and selective removal of the internal limiting membrane. *Retina* 18 : 322—329, 1998.
 - 4) **Park DW, Sipperley JO, Sneed SR, Dugel PU, Jacobsen J** : Macular hole surgery with internal-limiting membrane peeling and intravitreal air. *Ophthalmology* 106 : 1392—1397, 1999.
 - 5) **Kadonosono K, Itoh N, Uchio E, Nakamura S, Ohno S** : Staining of internal limiting membrane in macular hole surgery. *Arch Ophthalmol* 118 : 1116—1118, 2000.
 - 6) **Engelbrecht NE, Freeman J, Sternberg P Jr, Aaberg TM Sr, Aaberg TM Jr, Martin DF**, et al : Retinal pigment epithelial changes after macular hole surgery with indocyanine green-assisted internal limiting membrane peeling. *Am J Ophthalmol* 133 : 89—94, 2002.
 - 7) **Yam HF, Kwok AK, Chan KP, Lai TY, Chu KY, Lam DS**, et al : Effect of indocyanine green and illumination on gene expression in human retinal pigment epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 44 : 370—377, 2003.
 - 8) **Jackson TL, Hillenkamp J, Knight BC, Zhang JJ, Thomas D, Stanford MR**, et al : Safety testing of indocyanine green and trypan blue using retinal pigment epithelium and glial cell cultures. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 45 : 2778—2785, 2004.
 - 9) **Iriyama A, Uchida S, Yanagi Y, Tamaki Y, Inoue Y, Matsuura K**, et al : Effect of Indocyanine Green on Retinal Ganglion cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 45 : 943—947, 2004.
 - 10) 上野聡樹, 北岡 隆, 石郷岡均, 西川雅子, 本田 治 : ミュラー細胞の機能. *眼科* 32 : 667—679, 1990.
 - 11) 池田恒彦 : 神経細胞とグリア細胞の干渉(代謝). *眼科診療プラクティス* 22 : 248—251, 1996.
 - 12) **Gandorfer A, Haritoglou C, Gandorfer A, Kampik A** : Retinal damage from indocyanine green in experimental macular surgery. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 44 : 316—323, 2003.
 - 13) **Murata M, Shimizu S, Horiuchi S, Sato S** : The effect of indocyanine green on cultured retinal glial cells. *Retina* 25 : 75—80, 2005.
 - 14) **Jabbour NM, Schepens CL, Buzney SM** : Local ocular hypothermia in experimental intraocular surgery. *Ophthalmology* 95 : 1687—1690, 1988.
 - 15) **Tamai K, Toumoto E, Majima A** : Local hypothermia protects the retina from ischaemic injury in vitrectomy. *Br J Ophthalmol* 81 : 789—794, 1997.
 - 16) **Tamai K, Toumoto E, Majima A** : Protective effects of local hypothermia in vitrectomy under fluctuating intraocular pressure. *Exp Eye Res* 65 : 733—738, 1997.
 - 17) **Zilis JD, Chandler D, Machemer R** : Clinical and histologic effects of extreme intraocular hypothermia. *Am J Ophthalmol* 109 : 469—473, 1990.
 - 18) **Gale JS, Proulx AA, Gonder JR, Mao AJ, Hutnik CM** : Comparison of the *in vitro* toxicity of indocyanine green to that of trypan blue in human retinal pigment epithelium cell cultures. *Am J Ophthalmol* 138 : 64—69, 2004.
 - 19) **Rezai KA, Farrokh-Siar L, Ernest JT, van Seventer GA** : Indocyanine green induces apoptosis in human retinal pigment epithelial cells. *Am J Ophthalmol* 137 : 931—933, 2004.
 - 20) **Ho JD, Tsai RJ, Chen SN, Chen HC** : Cytotoxicity of indocyanine green on retinal pigment epithelium : implications for macular hole surgery. *Arch Ophthalmol* 121 : 1423—1429, 2003.
-