原著

くも膜下出血患者における髄液中血小板由来増殖因子の検討

本 間 温 喜 田 智 幸 猪 股 園 江
蓮 井 光 一 入 江 恵 子 長 尾 省 吾

The Platelet-derived Growth Factor Content in the Cerebrospinal Fluid of Patients with an Aneurysmal Subarachnoid Hemorrhage

by

Yutaka Honma, M.D., Tomoyuki Kita, M.D., Sonoe Inomata, M.D., Koichi Hasui, M.D.,
Keiko Irie, M.D., and Seigo Nagao, M.D.

from

Department of Neurological Surgery, Kagawa Medical School

The platelet-derived growth factor (PDGF) content in the cerebrospinal fluid (CSF) has been measured in 13 consecutive patients with an aneurysmal subarachnoid hemorrhage (SAH).

The CSF samples were obtained through a cisternal or a ventricular catheter. From 2 to 6 samplings from each patient were evaluated within 13 days after SAH onset, and to check for any variations in the PDGF concentration, the time course of the PDGF content was studied as well. A radioimmunoassay (double antibody technique) was used for PDGF measurement, and each patient's preoperative grade (Hunt & Kosnik) and CT group on onset (Fisher), as well as the presence of a vasospasm, and the outcome at discharge were compared with the data of the PDGF content in the CSF.

Ten SAH patients (77%) showed an elevated PDGF concentration in their CSF within 4 days after SAH onset (160~3700 pg/ml), whereas neither patients in the subacute SAH stage nor patients (controls) with another type of intracranial lesion showed any such elevation of the PDGF content in their CSF that could be detected. Further, no significant correlations were established between the PDGF content and the clinical grade, CT group, the presence of vasospasms, or the outcome.

Based on these results, it would appear that PDGF is released into the CSF during the early SAH stage, and that this PDGF release may be capable of exerting an effect from the abluminal surface of the cerebral artery. While the exact mechanisms of how this proliferative angiopathy develops has not been substantiated, it thus would seem that during the acute SAH stage some preventive treatment should be initiated to inhibit this proliferative process within the vessel wall.

(Received November 19, 1992 ; accepted December 17, 1992)

Key words : platelet-derived growth factor (PDGF), proliferative angiopathy, cerebrospinal fluid, subarachnoid hemorrhage, cerebral vasospasm

Jpn J Neurosurg (Tokyo) 2 : 192-197, 1993

はじめに

動脈硬化の発生に際し、平滑筋細胞の遊走、増殖の促

進物質として、血清中より発見された血小板由来増殖因子 (platelet-derived growth factor ; PDGF) は、血小板以外にも種々の細胞より産生、分泌されることがや、平滑筋細胞以外にも多くの標的細胞を有することが判明し

香川医科大学脳神経外科〔連絡先：本間 温，〒761-07 香川県木田郡三木町池戸 1750-1〕

Address reprint requests to : Yutaka Honma, M. D., Department of Neurological Surgery, Kagawa Medical School, Ikenobe 1750-1, Miki-cho, Kita-gun, 761-07 Kagawa-ken, Japan

Table 1 Clinical data of the 13 patients with an aneurysmal SAH and 6 patients (controls) with other lesions

Patient number	Sex	Age	Ruptured aneurysm intracranial lesion	Clinical grade (Hunt & Kosnik)	CT group (Fisher)	Vasospasms		Outcome (GOS)	Increase of PDGF in CSF
						Angio-graphic	Sympto-matic		
CD									
1	M	61	AcomA	IV	3	+	+	GR	+
2	M	62	AcomA	II	3	+	—	GR	+
3	F	63	MCA	III	4	+	+	D	+
4	F	64	AcomA	IV	3	+	+	PVS	+
5	F	66	AcomA	IV	4	+	+	MD	+
6	F	71	MCA	IV	3	—	—	SD	+
7	F	76	AcomA	IV	3	N/A	+	SD	+
VD									
8	M	47	MCA	III	3	N/A	+	GR	—
9	M	62	unknown	V	4	N/A	+	D	+
10	M	63	AcomA	III	3	+	+	D	—
11	M	64	AcomA	IV	3	—	—	D**	—
12	F	75	ICA	II	4	N/A	N/A	D*	+
13	M	80	unknown	V	3	N/A	N/A	D*	+
Controls									
14	F	21	arachnoid cyst						—
15	M	38	pituitary adenoma						—
16	M	44	meningioma						—
17	F	52	acoustic neurinoma						—
18	M	60	glioblastoma						—
19	M	62	normal pressure hydrocephalus						—

CSF : cerebrospinal fluid GOS : Glasgow Outcome Scale CD : cisternal drainage VD : ventricular drainage
 AcomA : anterior communicating artery MCA : middle cerebral artery ICA : internal carotid artery
 GR : good recovery MD : moderate disability SD : severe disability PVS : persistent vegetative state
 D : death * died of rebleeding ** died of renal failure N/A : not applicable

てきた。そして細胞増殖作用や遊走促進作用に加え、多彩な生物活性を有することも明らかにされつつある。

最近、PDGF はくも膜下出血 (SAH) 後に脳動脈壁に生じる増殖性の形態学的変化である増殖型血管症 (proliferative angiopathy ; PA) の惹起物質としても注目されている¹⁵⁾。さらに著者らは、PDGF 自体が脳血管収縮作用を有することも観察している⁷⁾。しかし、PDGF が SAH に際し、その作用を発揮する場合、どの時期にどのような経路で脳血管壁に作用するかについては十分な検討がなされていない。これらを解明することは PA の成因や PDGF の攣縮物質としての可能性を検討するうえからのみでなく、PA や脳血管攣縮の発生予防の面からも意義があるかもしれない。そこで今回、SAH 患者の髄液中の PDGF 濃度を経時的に測定し、PDGF が SAH において外膜側から脳血管壁に作用する可能性、時期について検討したので報告する。

対象および方法

対象は破裂脳動脈瘤による SAH にて発症し、72 時間以内に開頭によるクリッピング手術が施行され、髄液ド

レナージ (脳槽 7 例、脳室 3 例) が設置された 10 例、および脳室ドレナージのみが設置された 3 例の計 13 例である。ドレナージは急性水頭症の改善、血性髄液の排除、頭蓋内圧のコントロールの目的で、脳槽あるいは脳室に 5～7 日間留置された。なお脳槽灌流、髄腔内線溶療法は行っていない。髄液のサンプリングはドレナージ留置中、1 症例につき 2～6 回カテーテルチューブ内より新鮮な髄液を 2～3 ml/採取することにより行った。検体は直ちに冷却した後、2000 G で 30 分間遠沈し、上清を凍結保存し、1 カ月以内に radioimmunoassay (RIA 2 抗体法) にて測定した¹²⁾。測定検体数は延べ 42 検体であった。

本測定法は PDGF の B 鎖に特異性が高く、臨床的に血中の PDGF 濃度の測定に用いられており、測定閾値は 100 pg/ml である。あわせて髄液中 PDGF 濃度と術前 grade (Hunt & Kosnik)、発症時 CT group (Fisher)、脳血管攣縮発生、退院時転帰 (Glasgow Outcome Scale) 等の臨床的事項との関連性についても検討した。コントロールとして他の頭蓋内疾患 6 例 (くも膜嚢胞、下垂体腺腫、髄膜腫、聴神経腫、膠芽腫、正常圧水頭症) の髄液中の PDGF 値も測定した。

Table 2 Concentration of the PDGF content in the cerebrospinal fluid in 19 patients

Patient number	Days after the subarachnoid hemorrhage													
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
CD														
1		960			*									
2			380	*	*		*							
3	600				*		*							
4			430	160	*	*	*	*						
5		630	490	310	*			*						
6			470	360	*			*						
7			360		*									
VD														
8			*	*										
9	3700	2100			*									
10			*	*										
11			*			*	*			*				
12		2900				*	*							
13		1100				*								
Controls														
14	*													
15	*													
16	*													
17	*													
18	*													
19	*													

CD : cisternal drainage VD : ventricular drainage * : below detection level (<100 pg/ml)

結 果

対象 13 症例の破裂動脈瘤部位, 術前 grade, 発症時 CT group, 血管写上あるいは症候性脳血管攣縮の有無, 髄液の採取部位, 退院時転帰および髄液中 PDGF 濃度の上昇の有無を Table 1 に示した. さらに患者別の髄液中 PDGF の測定値を Table 2 に, それらの経時的变化を Fig. 1 にグラフで示した.

髄液が濃い血性を呈した 10 例 (77%) において, 経過中に測定閾値以上の上昇がみられた (Table 1). 内訳は脳槽内髄液を測定した 7 例全例と脳室内髄液を測定した 6 例中の 3 例であった. 測定値は 160~3,700 pg/ml であり, 上昇した時期は day 0~day 3 までの発症早期であり, いずれも day 4 以降には測定閾値以下に減少した (Table 2, Fig. 1). したがって day 4 以降にも CT 上血腫が残存し, 髄液が強い血性を呈している例や, 明らかに血管写上の攣縮や遅発性脳虚血症状 (DIND) が出現している例においても, PDGF 値の上昇を示すことはなかった. PDGF 値の上昇がみられた 10 例中, day 3 以内に複数回の測定が行われた 5 例では, 経過とともに測定値の減少がみられている (Table 2). 一方, 発症早期より測定閾値以下であったのは 3 例であり, いずれも脳室の髄液を測定した症例であった. これら 3 例では, 脳槽には thick な血腫を認めたが, 脳室内髄液の血性はわずか

Fig. 1 Time course of the PDGF content in the cerebrospinal fluid in 13 patients with an aneurysmal SAH

であった. これらでも経過中に測定値が上昇することはなかった.

術前 grade は II が 2 例, III が 3 例, IV が 6 例, V が 2 例であり, そのうち髄液中の PDGF が上昇したのは, それぞれ 2 例, 1 例, 5 例, 2 例であり, 術前 grade と髄液中 PDGF 上昇との間に明らかな関連性は見出せなかった (Table 1). また発症時 CT group については, 3 が 9 例, 4 が 4 例であり, いずれも CT 上脳槽に thick

な血腫を伴っており、発症時の CT 上の血腫量と PDGF 値との関連性についての検討は困難であった。

脳血管攣縮に関しては、髄液中 PDGF の上昇が認められた 10 例中、血管写が施行されたのが 6 例で、うち血管写上攣縮を認めたのが 5 例であった。またこの 10 例中、発症早期に再出血にて死亡した 2 例を除き、DIND を生じたのが 6 例（うち一過性 3 例、永続性 3 例）、生じなかったのが 2 例であった。一方、経過中 PDGF 値の上昇をみなかった 3 例では、血管写施行 2 例中 1 例に攣縮を認め、2 例に DIND（うち一過性 1 例、死亡 1 例）を生じた。

転帰については PDGF 値の上昇をみた 10 例中、good recovery が 2 例、moderately disabled が 1 例、severely disabled が 2 例、vegetative が 1 例、dead が 4 例（うち術前再破裂 2 例、攣縮 1 例、一次性脳損傷 1 例）であった。PDGF 値が上昇しなかった 3 例では、good recovery 1 例、dead が 2 例（うち攣縮 1 例、腎不全 1 例）であった。コントロール 6 例の髄液中 PDGF はすべて測定閾値以下であった。

考 察

PA は SAH 後の脳動脈壁の増殖、肥厚を主体とする形態学的変化であり、Conway ら²⁾、Smith ら¹⁴⁾により詳しい剖検例の報告がなされている。主に主幹動脈の内膜、中膜での平滑筋様細胞 (myofibroblast) の増殖やコラーゲン等の細胞外基質の増加を特徴とする。さらに myofibroblast によりコラーゲン線維の配列が再構成され、血管壁の収縮が生じる non-muscle contraction の概念も彼らにより提唱されている¹⁸⁾。PA は中膜平滑筋の収縮を主体とする血管攣縮を助長あるいは維持し、脳血流障害をさらに増悪すると推定されている¹⁵⁾¹⁶⁾。しかしながら PA の発生機序、DIND 発現に関与する程度、時期については異論も多く、一定の見解は得られていない⁸⁾。

Grotendorst ら³⁾は、血管が損傷された際、内膜上に凝集した血小板より放出された PDGF が myofibroblast の遊走、増殖を生じ修復機構に関与すると報告した。Smith ら¹⁵⁾は、SAH においても同様に内皮障害部に凝集した血小板より PDGF が放出され、PA が initiate されると推定した。ところが、PDGF が PA 発生に関連して血管壁に作用する時期、経路については実証されていない。これに関して Haining ら⁴⁾は、SAH 直後より 3 週間にわたり内膜上に血小板の集積を繰り返すことを実験的に観察し、内膜側より PDGF が長期にわたり血管壁に作用する機序を想定した。一方、著者らは SAH モデ

ルにおいて、早期にくも膜下血腫を溶解除去することにより PA の発生が有意に抑制されること⁶⁾、また PDGF をネコの大槽内に直接投与することにより PA と同等の増殖性変化が血管壁に生じること⁵⁾を観察している。Smith ら¹⁷⁾¹⁸⁾も、脳血管攣縮を生じた患者の髄液により線維芽細胞や myofibroblast のゲル状コラーゲンの収縮が促進されることを報告している。さらに Nakamura ら⁹⁾は、SAH モデルで中膜平滑筋細胞間隙のコラーゲン増加が外膜側より開始されることを観察している。これらの実験結果は PA あるいは non-muscle contraction を促進する物質が、血性髄液に暴露される外膜側からも血管壁に作用すること、さらにその 1 つが PDGF である可能性を示している。最近、著者ら⁷⁾は PDGF 自体がきわめて低濃度よりイヌの脳血管を収縮させること、内膜剝離標本や SAH モデルからの摘出標本では収縮が増強することを観察し、SAH に際し攣縮物質ともなり得ることを報告している。しかし、現在までに SAH 患者の髄液中の PDGF 濃度に言及した報告は見あたらず、また髄液中に遊離された PDGF の動態についても不明である。そこで SAH 患者の髄液中の PDGF 濃度を経時的に測定し、PDGF が SAH 臨床例において外膜側より脳血管に作用する可能性および時期について検討することを本研究の目的とした。また髄液中に PDGF が上昇した場合、その濃度と臨床的事項と関連性をもつか否かについても検討を試みた。

その結果、13 例の SAH 患者中、10 例 (77%) に 160 ~ 3,700 pg/ml と髄液中 PDGF 濃度の上昇が認められた。脳槽ドレナージより得た血性髄液を測定した 7 例全例と脳室内ドレナージの髄液を測定した 6 例中 3 例であった。脳室内髄液中に PDGF が上昇した 3 例では、CT で側脳室内に血腫を認め、髄液が濃い血性を呈しており、それぞれ 1,100, 2,900, 3,700 pg/ml と高値を示した。これに対し、脳室系への血液流入が少なく脳室内髄液の血性が低かった 3 例では、PDGF が閾値以下であった。以上より、臨床例では SAH 早期より脳槽、脳室内ともに血性髄液中に PDGF が遊離され上昇することが確認された。また PDGF の上昇時期が day 3 以内であったことより、髄液中 PDGF は発症早期にのみ脳血管に作用している可能性が高い。したがって PDGF の脳血管への作用経路は内膜側からのみならず、発症早期には血管透過性が高い外膜側¹¹⁾よりの経路も存在することが明らかとなった。PA を惹起し得る髄液中の PDGF の濃度、作用期間については不明であるが、実際には脳槽内血腫に埋没した主幹動脈は、より高濃度の PDGF に暴露されると考えられる。そして内膜上の血小板より遊離された

PDGF も加わり、遺伝子発現を介した血管壁の持続的な増殖性変化が惹起されると想像される。

SAH 以外の頭蓋内疾患 6 例では、PDGF が測定閾値以下であった。多くの頭蓋内疾患では髄液中の PDGF 値は 100 pg/ml 以下と考えられる。しかし神経膠腫等では腫瘍細胞自身が PDGF を産生し、autocrine による自己増殖刺激機構が存在することが判明しており¹⁰⁾、髄液中にも PDGF が遊離される可能性もある。

本研究に用いた測定法は PDGF の B 鎖に特異性が高いことより、測定された PDGF は脳槽または脳室内血腫中の血小板より遊離された主に AB dimer 中の B 鎖を捉えた可能性が高い。したがって髄液中の血小板が活性を失うとされている day 3 以降には¹⁾、他に source がなければ PDGF が髄液中に再上昇することはないと思われる。ただし PA の発生過程において、形質転換した平滑筋細胞自身が autocrine 機構により本測定法では捉えがたい PDGF の A 鎖を産生し¹³⁾、これが髄液中に上昇する可能性も否定できないであろう。

髄液中 PDGF 濃度と術前 grade、発症時 CT group、脳血管攣縮の有無、程度、転帰等の臨床的事項との関連性についても検討を試みた。しかし症例数が少ないためか、いずれの事項とも PDGF 濃度と一定の関係を見出すには至らなかった。特に種々の因子により影響を受ける脳血管攣縮、転帰との関連性の検討は、今回の症例数からは困難と考えられた。また PDGF の上昇例では血管写上の攣縮や DIND の発生が多い傾向もみられたが、対象症例が本来攣縮発生の high risk group である Fisher group 3, 4 のみであり、今後 group 2 の症例での検討が必要であろう。

前述した PDGF の脳血管収縮作用については、著者らのイヌ脳底動脈を用いた実験で $2 \sim 3 \times 10^{-11}$ M、すなわち約 600~900 pg/ml より収縮が観察されている⁷⁾。PDGF 濃度が高値を示した例ではこの値を越えており、脳血管収縮をきたし得ると考えられる。しかし、上昇時期を考慮した場合、day 4 以降に生じる脳血管攣縮に髄液中の PDGF が直接関与している可能性は低いかもしれない。

おわりに

破裂脳動脈瘤による SAH 13 例中 10 例 (77%) と高率に血性髄液中の PDGF 濃度の上昇がみられた。これらはくも膜下血腫中の血小板より遊離されたものと考えられ、発症早期ほど高値を示し、漸減し day 4 以降は測定閾値以下となった。PDGF は内膜側からのみならず、

SAH 早期に透過性の亢進した外膜側からも脳血管に作用することにより、遺伝子発現を介した PA の発生に関与し得ると考えられた。これらを阻止するためには SAH 早期より何らかの対策を講じる必要があると考えられる。また PDGF は脳血管収縮能も有するが、その上昇時期より髄液中の PDGF 自体は、day 4 以降に生じる血管攣縮への直接的な関与は少ないと思われた。

本論文の要旨の一部は、第 3 回脳循環代謝学会総会 (1991 年 11 月、盛岡) および第 17 回脳卒中学会総会 (1992 年 3 月、名古屋) において発表した。

文 献

- 1) von Baumgarten FJ, Burkhard G, Englert D, Kraus P, Mertens HG, Müller-Berghaus G, Przuntek H: Local hemostasis in subarachnoid hemorrhage. *Eur Neurol* **27**: 149-154, 1987.
- 2) Conway LW, McDonald LW: Structural changes of the intradural arteries following subarachnoid hemorrhage. *J Neurosurg* **37**: 715-723, 1972.
- 3) Grotendorst GR, Seppa HEJ, Kleinman HK, Martin GR: Attachment of smooth muscle cells to collagen and their migration toward platelet-derived growth factor. *Proc Natl Acad Sci USA* **78**: 3669-3672, 1981.
- 4) Haining JL, Clower BR, Honma Y, Smith RR: Accumulation of intimal platelets in cerebral arteries following experimental subarachnoid hemorrhage in cats. *Stroke* **19**: 898-902, 1988.
- 5) 猪股園江, 本間 温, 蔭 昆, 蓮井光一, 入江恵子, 久山秀幸, 長尾省吾: くも膜下出血後の増殖性血管症における PDGF の関与. 第 17 回日本脳卒中学会総会, 名古屋, 1992.
- 6) 猪股園江, 本間 温, 蓮井光一, 入江恵子, 蔭 昆, 長尾省吾, 大本堯史: くも膜下出血後の増殖性血管症の成因に関する実験的検討—くも膜下血腫早期溶解の効果について. 太田富雄, 浅野孝雄, 大本堯史, 金谷春之, 菊池晴彦, 児玉南海雄, 斉藤 勇, 高倉公朋, 永井 肇, 吉本高志編: 脳血管攣縮 Vol. 7, 東京, 中外医学社, 1992, pp. 243-247.
- 7) 蔭 昆, 蓮井光一, 本間 温, 猪股園江, 入江恵子, 長尾省吾, 大本堯史: 血小板由来増殖因子 (PDGF) の脳血管収縮能についての検討—正常血管と内膜除去血管との比較検討. 脳循環代謝 **3**: 122, 1991.
- 8) Macdonald RL, Weir BKA, Young JD, Grace MGA: Cytoskeletal and extracellular matrix proteins in cerebral arteries following subarachnoid hemorrhage in monkeys. *J Neurosurg* **76**: 81-90, 1992.
- 9) Nakamura S, Umezawa T, Yoshida K, Sugitani M, Tsubokawa T: Collagenous changes in the cerebral vascular wall following subarachnoid hemorrhage. *J Clin Electron Microscopy* **22**: 5-6, 1989.
- 10) Nister M, Heldin C-H, Wasteson A, Weatermark B: A platelet-derived growth factor analog produced by a human clonal glioma cell line. *Ann NY Acad Sci* **397**: 25-33, 1982.
- 11) Ohta T, Satoh G, Kuroiwa T: The permeability change of major cerebral arteries in experimental vasospasm. *Neurosurgery* **30**: 331-336, 1992.
- 12) 坂内佐登子, 高梨直樹, 塚田 裕: ラジオイムノアッセ

- イによる血中 PDGF 濃度の測定法. SRL 宝函 13 : 28-36, 1989.
- 13) Sejersen T, Betsholtz C, Sjölund M, Heldin C-H, Westermark B, Thyberg J : Rat skeletal myoblasts and arterial smooth muscle cells express the gene for A chain but not the gene for the B chain (c-sis) of platelet-derived growth factor (PDGF) and produce a PDGF-like protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 83 : 6844-6848, 1986.
 - 14) Smith RR, Clower BR, Peeler DF Jr, Yoshioka J : The angiopathy of subarachnoid hemorrhage : Angiographic and morphologic correlates. *Stroke* 14 : 240-245, 1983.
 - 15) Smith RR, Clower BR, Grotendorst GM, Yabuno N, Cruse JM : Arterial wall changes in early human vasospasm. *Neurosurgery* 16 : 171-176, 1985.
 - 16) Smith RR, Clower BR, Honma Y, Cruse JM : The constrictive angiopathy of subarachnoid hemorrhage : An immunopathological approach. in Wilkins RH (ed) : *Cerebral Vasospasm*. New York, Raven Press, 1988, pp. 247-252.
 - 17) Smith RR, Yamamoto Y, Clower BR, Bernanke DH : Cerebrospinal fluid factors following subarachnoid haemorrhage accelerate collagen lattice contraction by fibroblasts. *Neurol Res* 12 : 41-44, 1990.
 - 18) Yamamoto Y, Smith RR, Bernanke DH : Accelerated nonmuscle contraction after subarachnoid hemorrhage : Culture and characterization of myofibroblasts from human cerebral arteries in vasospasm. *Neurosurgery* 30 : 337-345, 1992.

要 旨

くも膜下出血患者における髄液中血小板由来増殖因子の検討

本間 温 喜田 智幸 猪股 園江 蓮井 光一
入江 恵子 長尾 省吾

破裂脳動脈瘤 13 例の髄液ドレナージ (脳槽 7 例, 脳室 6 例) より採取した髄液の血小板由来増殖因子 (PDGF) 濃度を経時的に測定した. 髄液が高度血性を呈した 10 例 (77%) では day 3 以内に PDGF 値の上昇 (160~3,700 pg/ml, RIA 法) を示した. これらは血腫中の血小板より遊離されたと考えられ, 他の頭蓋内疾患 6 例では測定閾値 (100 pg/ml) 以下であった. PDGF はくも膜下出血後に動脈壁に生じる増殖型血管症 (proliferative angiopathy) の惹起物質として報告されているが, 出血早期には外膜側から脳血管壁に作用し得ることが示された. その生物活性を阻止するためには発症早期より何らかの対策を講じる必要があると考えられる.

脳外誌 2 : 192-197, 1993