

原 著

クモ膜下出血後の髄液中で sphingosylphosphorylcholineの上昇が認められた ～Sphingosylphosphorylcholineのspasmogenとしての可能性～

黒川 徹

山口大学医学部高次統御系・脳神経外科学講座 宇部市南小串1丁目1-1 (〒755-8505)

Key words : sphingosylphosphorylcholine, クモ膜下出血, 脳血管攣縮,
カルシウム非依存性収縮, 三連四重極型質量分析計

和文抄録

クモ膜下出血 (SAH) 後の脳血管攣縮 (CV) は、患者の予後を左右する重要な病態である。しかし、その機序は十分に解明されておらず、治療法も確立されていない。患者の生命的/機能的予後を改善するためにも、CVの機序解明と、有効で非侵襲的な治療方法の確立が望まれる。

臨床的に、CVに対してカルシウム拮抗薬による治療では十分な効果が得られないことから、CVの機序として、平滑筋のカルシウム非依存性収縮が注目されている。その一つにRhoA/Rho-kinase系が知られているが、我々の研究室ではRho-kinaseの上流因子としてsphingosylphosphorylcholine (SPC) の存在を突き止めた。SPCとCVの関係を明確にするために、SAH患者より採取した髄液のSPC濃度を測定した。また、イヌのSAHモデルとSPC投与モデルでCVを確認し、髄液中SPC濃度の測定も行った。

SAH患者9例から採取した髄液を固相抽出法と三連四重極型質量分析計を用いてSPC濃度を定量した。Controlとして測定した正常圧水頭症3例では 2.667 ± 4.619 nMであったが、SAH患者のday 8の髄液からは 29.012 ± 6.306 nMと有意に高値となって

いた ($p < 0.01$)。また、イヌの髄液中SPC投与 (髄液中にSPCが最終濃度 $100 \mu\text{M}$ 相当となるように注入) モデル ($n=2$) では、投与120分後は投与前に対して明らかな上昇は見られなかった。

SPCは正常な髄液中には微量 (数nM) しか存在せず、SAH後の脳槽内髄液中には有意に上昇することがわかった。また、イヌの実験結果より、大量のSPCを投与しても、生体の髄液内ではすぐに希釈されることが推察された。このことから、SAH後の髄液内SPCは今回測定された定量値以上に多量に放出されていると思われる。以上から、SAH後のCVの一因としてSPCの関与が示唆された。

はじめに

クモ膜下出血 (SAH) 後に起こる脳血管攣縮 cerebral vasospasm (CV) は、患者の予後を大きく左右する重要な病態である^{1, 2)}。しかし、その分子機構は未だ明らかとなっておらず、根治的治療法も確立されていない³⁻¹⁵⁾。CVの機序を解明し、治療方法を導くことが切に望まれている。CVは最終的には血管平滑筋の過度な収縮が本態である。また、この収縮は全身的なカルシウム拮抗薬の投与では十分に阻害されないこと¹⁶⁻¹⁸⁾ などから、カルシウム非依存性の収縮が関与している可能性が示唆されている。その中でも、RhoA/Rho-kinase系が関与した

平成17年1月18日受理

Ca²⁺感受性の変化による血管平滑筋の収縮が注目されている^{8, 20-23}). 血管平滑筋の収縮は最終的には20-kDa myosin light chain (MLC) のリン酸化によって生じる. RhoA/Rho-kinase系はMLCの脱リン酸化を促すmyosin phosphatase (MYPT) をリン酸化し, 不活性型にさせることにより, 血管平滑筋のCa²⁺感受性を増加させる. 臨床的にも, SAH後のCVでRho-kinaseが活性化されたとするSatoらの報告²¹) や, Rho-kinaseのinhibitorであるHA1077 (fasudil) がCVを抑えたというShibuyaらの報告⁸⁾ から, RhoA/Rho-kinase系がCVの機序において重要な部分を担っていると思われる. 近年, 我々の研究室で, スフィンゴ脂質の一つであるsphingosylphosphorylcholine (SPC) がRho-kinaseを介したCa²⁺感受性の増加をもたらすことをブタ冠動脈において発見し¹⁹⁾, さらにウシの脳血管において証明した²⁰⁾. SPCは細胞膜を構成しているsphingomyelinがN-deacylationすることによって産生される.

Liliomらによれば血漿中からSPCが130nM, 血清中から50nM測定されている²⁰⁾. しかしながらこれまでの所, 髄液中のSPCを測定した報告は見られない. 今回, 我々は, SAH後の髄液からSPCを分離抽出し, 測定することに成功した. 本論文では, タンデム四重極型質量分析計を用いたLiquid chromatography/electrospray ionization-mass spectrometry/mass spectrometry (LC/ESI-MS/MS) によるSPC測定方法を述べ, SAH患者のday 8の髄液中SPC濃度を測定することによりCVへのSPCの関与の可能性について検討した. 併せて, イヌ大槽内血液注入モデルおよびSPC注入モデルにおいてもSPCを測定し, SPC濃度の髄液内動態を類推した.

対象と方法

1. 収縮実験

A) 血管標本の採取

ウシおよびブタの脳血管は, 屠殺場において食用に屠殺された動物より, 速やかに採取した. 直ちに氷温のphysiological salt solution (PSS) に保存し, 研究室まで輸送した. 研究室にて, 平滑筋組織を傷つけたり進展したりしないように注意しながら, 顕

微鏡下に外膜を除去した. 外膜除去後の血管は, 長軸に沿って切開した後に, 筋線維の走行に沿って, 幅1.0mm長さ4.0mmの筋条片を作成した. 血管内膜は慎重に除去し, 1 μ Mのbradykininを投与しても, 弛緩しないことを確認した.

B) 収縮力-細胞質カルシウム濃度同時測定

平滑筋中膜条片を, Ca²⁺指示蛍光色素fura-2アセトキシメチルエステル (12.5 μ M) と5% fetal bovine serum (FBS) を混入したPSS (5% CO₂ と95% O₂のガスを混入させpHを7.4に調整したものに, 37°Cで4時間浸透させた. fura-2を負荷させた血管平滑筋条片を用いて, 収縮力と細胞質Ca²⁺濃度を同時測定した. 収縮を張力トランスデューサー (TB-612T, 日本光電) で計測し, 細胞質Ca²⁺濃度を顕微2波長分光蛍光測定装置 (CAM-230, 日本分光) を用いて測定した.

平滑筋条片を118mM K⁺-PSSで15分間刺激し, PSSでもとの定常状態まで弛緩した後に30 μ M SPCを投与した.

C) スキンド (脱膜化) 処理血管平滑筋による収縮実験

ウシおよびブタの血管平滑筋をさらに微小条片 (幅150-200 μ m, 長さ3mm) とし, 張力トランスデューサー (UL-2g, ミネベア) に固定し, 張力を測定した. 条片は28°Cに保温されたbubble plateで各試薬に暴露した. 試薬の交換は, 慎重かつ迅速にplateをスライドさせて行った. 118mM K⁺-PSSによる収縮が安定してから, 条片を30 μ M beta-escinに15分間処理した. beta-escinによる処理後は, calmodulin (1 μ M) を混入した溶液を用いて, 収縮実験を行った. このスキンド標本での収縮は, ゼロCa²⁺ (pCa >> 8) における定常状態を0%とし, pCa 4.5による最大収縮を100%として計測した.

まず, ゼロCa²⁺ (pCa >> 8) で定常状態にあることを確認し, ウシではpCa 6.5, ブタではpCa 6.3の溶液でカルシウム依存性収縮を確認した. この収縮が安定してから, 0.5 μ g/ml dominant-negative Rho-kinase (dn-ROK) を投与し, 15分後に30 μ M SPCを混入する実験と, dn-ROKの前投与をしない実験とを行い, 最後にpCa 4.5の溶液で最大収縮 (=100%) を確認した. スキンド標本を用いた実験は, それぞれ1回行った.

2. SPCの測定

A) 脳脊髄液 (CSF) の採取

SAH発症後72時間以内に開頭脳動脈瘤クリッピング術を施行し、脳槽ドレーンを留置したFisher group 3の患者9名(男性4, 女性5, 平均年齢59.4歳)からday 8にCSFを採取した。その他、脳腫瘍(髄膜腫, 以下BT)摘出術後に脳室ドレーンを留置した1症例から得たCSFと、正常圧水頭症(NPH)3症例から腰椎穿刺によって得たCSFを採取した。すべてのCSFは、蛋白無吸着処理チューブ(住友ベークライト)に1mlずつ分注し、摂氏マイナス80度で保存した。

髄液は、山口大学倫理委員会により承認された様式に則って患者あるいは家族より承諾を得たものを使用した。

B) 固相抽出法

固相抽出カートリッジ(Bond Elut Certify 300mg/3ml [Varian])にメタノール5mlと100mMリン酸緩衝液(pH 5.0)5mlを通液し、コンディショニングを行った。髄液1mlと100mMリン酸緩衝液(pH 5.0)1mlを混合し、内部標準物質としてSPCの安定同位元素標識体SPC-d3 [choline-methyl-d3] (持田製薬)10ngを添加して調整した試料を、カートリッジが乾かないうちに通液した。これを100mMリン酸緩衝液(pH 5.0)5mlとメタノール5mlで洗浄し、カートリッジを乾固させた。この状態で、摂氏マイナス20度で保存した。このカートリッジから、4%アンモニア含メタノール1mlで溶出し、蛋白無吸着処理チューブに回収した。溶出液をジェットコンデンサー(DRY THERMO BATH MG-2100, 東京理科機械)で濃縮乾固した。残渣をメタノール100 μ Lに再溶解し、20 μ LをLC/ESI-MS/MS測定に供した。

C) 検量線作成

水頭症患者から得られたCSFを1mlずつに分注し、種々の濃度(0, 0.2, 0.5, 1, 2, 5, 10, 20, 50 μ g/mL)のSPC/メタノール溶液をそれぞれ10 μ Lずつ加え、SPCの終濃度がそれぞれ0, 2, 5, 10, 20, 50, 100, 200, 500ng/mLとなるように調整した。これらに内部標準物質として1.0 μ g/mL SPC-d3を(0, 0.2, 0.5, 1, 2, 5, 10, 20, 50 μ g/mL)10 μ Lずつ加え検量線用の検体とした。

D) 高速液体クロマトグラフ (HPLC) による精製

HPLCシステム(日本分光)のintelligent HPLC pump (model 880-PU)とintelligent sampler (model 851-AS)を使用した。分析カラムにはDevelosil ODS HG-5 (2.0mm \times 35mm, 野村化学)を使用した。移動層には、A液(5 mM Ammonium Formate : Methanol : Tetrahydrofuran = 5 : 2 : 3 含0.1% Formic Acid)とB液(5 mM Ammonium Formate : Methanol : Tetrahydrofuran = 1 : 2 : 7 含0.1% Formic Acid)をA液 : B液 = 100 : 0から0 : 100まで段階的に流した。流速は0.2ml/分でカラム温度は40 $^{\circ}$ C, 試料の注入量は20 μ Lとした。

E) 三連四重極型質量分析計によるMS/MSスペクトル

HPLCシステムの分析カラムから大気圧イオン化(API)インターフェースを介して、三連四重極型質量分析計TSQ 700 (Finnigan MAT ; CA, U.S.A.)に接続した。APIにはエレクトロスプレーイオン化法(ESI)の正イオンモード測定を行った。三連四重極型質量分析計はプリカーサー(前駆)イオンモードを用いた。Q2では2.0 mTorr (1 Torr = 133.322 Pa)の圧とし、衝突ガスとしてはアルゴンを使用した。API-MS/MSの条件設定は以下の通りである。スプレーノズル金属キャピラリー先端電圧は4500Vとした。スプレーノズルのシースガスには窒素ガスを用い、その圧は58 p.s.i. (1 p.s.i. = 6894.76 Pa)とした。イオン化補助ガスは窒素ガスを5 U (2978 ml/min)の速度で流した。加熱キャピラリー温度は摂氏250度とした。測定した質量荷比(m/z)は、SPCがQ1で465.3, Q3で184.1のもので、SPC-d3がQ1で468.3, Q3で187.1のものである。それぞれの存在量を測定した。

F) イヌSAHモデルとSPC注入モデルの髄液内SPC測定

雑種成犬(以下イヌ)をsodium pentobarbital (25 mg/kg)で麻酔し、自発呼吸下に大槽内に自家血0.5ml/kg注入するモデル(SAHモデル)と100 μ M相当量のSPCを注入するモデルを作成した。脳血管撮影を、SAHモデルでは自家血注入前と7日後に、SPC注入モデルでは注入前と120分後に行った。イヌの右大腿動脈に4 Frenchのsheath (CS40,

50P11TSM, メディキット) を刺入し, そこからカテーテル (RF-WB14010, テルモ/PAA-5000A, 東レ) を挿入し, X線透視下に先端を左椎骨動脈に留置した. 造影剤ioxaglic acid (Guerbet, Aulnay) 4 ml を 2 ml/sec注入して造影した. 造影後に続けて後頭部を開創し, 大孔を確認し顕微鏡下に動脈血あるいは, SPCを大槽内に注入した. 注入直前に髄液を 2 ml採取した. SAHモデルでは 7 日後に脳血管造影を行い, 髄液を 5 ml採取した. SPC注入モデルでは 120分後に脳血管撮影を行い, 120分後と 210分後に髄液を 2 mlずつ採取した. 採取した髄液は, 摂氏マイナス 80度で保存し, SPCの測定に供した. CVの有無は, 大孔の横径に対する脳底動脈起始部の血管径を%で算出し, 評価した.

結 果

1) 収縮実験

SPCによる脳血管平滑筋のカルシウム非依存性収縮は種を超えて認められる

細胞質カルシウム濃度と収縮力の同時測定において, ウシ・ブタともに脳血管平滑筋は, 118mM K^+ -PSSにより非常に大きな収縮が得られた. この収縮に連動して細胞質カルシウム濃度も著しい上昇が観察された. SPC (30 μ M) を投与すると収縮がゆっくりと認められた. この収縮は 30分程度でプラトーとなり, 118mM K^+ -PSS の収縮の 8 割ほどの

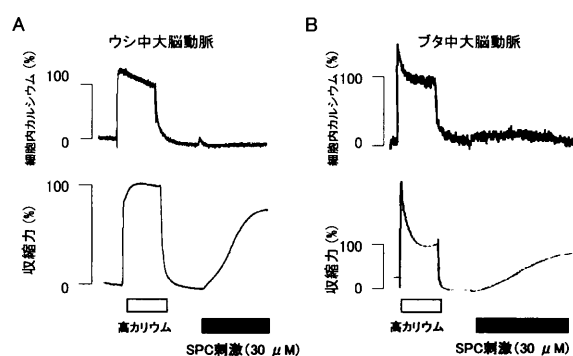


図 1 細胞内カルシウム濃度-収縮力同時測定を行った. fura-2で蛍光指示したウシ中大脳動脈 (A) とブタ中大脳動脈 (B) を高カリウムPSSと 30 μ M SPCで順次刺激した. カルシウム濃度は上段, 収縮力は下段に描出されている. ウシ・ブタともに高カリウムPSSでは収縮とカルシウム濃度上昇が同時に見られ, SPCではカルシウム濃度は上昇せずに収縮する.

強さまで認められた. ブタはウシに比して, 収縮が緩徐であった. 細胞質カルシウム濃度は, SPC刺激ではウシ・ブタともに上昇しなかった. (図 1)

スキンド処理血管平滑筋におけるSPCへの反応

beta-escinで処理したスキンド標本 (分子量にして, おおむね 150kDa以下の物質が細胞膜を通れる穴を細胞膜に作成)³¹⁾ で収縮実験を行った. スキンド標本では, 細胞内外のカルシウム濃度が常に一定の状態を試薬を投与することができる. カルシウム依存性の収縮が一定となったところで SPC (30 μ M) を投与すると, 収縮力が上がった. この反応は, ウシでは pCa 6.5で強く認められたが, ブタでは pCa 6.3までカルシウム濃度を濃くしなければ観察できなかった. また, SPCによる収縮の増強もウシに比べ, ブタでは弱かった. 次に, SPCと Rho-kinaseとの関係を明確にするために, スキンド標本に Rho-kinaseの不活性体である dominant-negative Rho-kinase (dn-ROK) を 0.5 μ g/dL 前投与した. SPCによる収縮の増強は, dn-ROKにより完全に抑制された. この抑制は, ウシでもブタでも同様に観察された. (図 2)

2) SPC濃度の測定

検量線の作成

固相抽出後, 高速液体クロマトグラフ, エレクトロスプレーイオン化, 三連四重極型質量分析計を用いた LC-ESI/MS/MS スペクトルにより, SPCの存

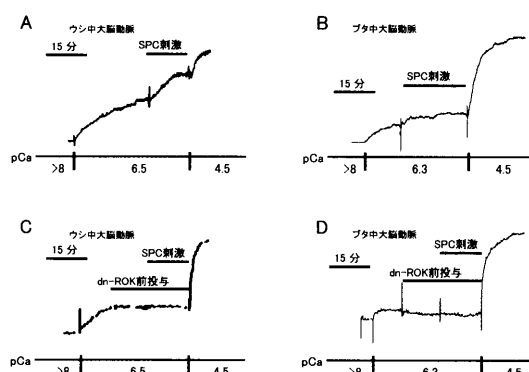


図 2 スキンド標本における SPC 刺激によるカルシウム感受性変化と, それに対する dn-ROK の作用. 30 μ M SPC 刺激に対するカルシウム感受性の変化をウシ中大脳動脈 (A) とブタ中大脳動脈 (B) のスキンド標本を用いて検討した. ウシ・ブタ共に SPC によってカルシウム感受性が増強した. また, 0.5 μ g/mL dn-ROK を前投与すると, ウシ (C) でもブタ (D) でも SPC によるカルシウム感受性増大は阻害された.

在量を測定することが可能であるが、これだけでは定量はできない。そこで、SPCの安定同位元素標識体SPC-d3（自然界には存在しない）を用いた。正常圧水頭症患者より腰椎穿刺で得たCSFに $1.0 \mu\text{g/mL}$ SPC-d3と濃度勾配をつけたSPCを混入し、その存在量の比で検量線を作成した。SPC濃度とSPC/SPC-d3存在比の回帰直線は、 $y=0.1983x + 1.0642$ であらわされ、相関係数も $R^2=0.9932$ と良好な精度であった。（図3）

ヒト髄液中SPC濃度

SAH後の患者より得られたday 8のCSF中のSPC濃度は、 $29.012 \pm 6.306 \text{ nM}$ ($n=9$)であった。SPCに関して、正常と考えられる正常圧水頭症のCSFからは、 $2.667 \pm 4.619 \text{ nM}$ ($n=3$)のSPCが検出された。SAH day 8と正常圧水頭症とを検定すると、有意差 ($p < 0.01$) をもって、day 8ではSPCが増加していた。また、このSPCの増加が、手術操作によるものである可能性もあるため、開頭術後に脳室内にドレーンを留置した髄膜腫1症例でも測定したが、 3.16 nM と低値であった。髄膜腫術後と正常圧水頭症の間には差は無く (3 nM 前後)、day 8は髄膜腫術後に対して明らかにSPCは増加していた。以上から、SPC濃度はSAH後に髄液中で有意に上昇し、この上昇は手術操作によるものではない可能性が示唆された。（図4）

イヌモデルにおける髄液中SPC濃度

イヌSAHモデル ($n=2$) では投与前の髄液中SPC濃度は 1.83 nM , 4.73 nM であるのに対し、day 7の髄液中SPCは 4.04 nM (+120.7%), 2.34 nM (-50.2%)となり、前後での値の変化に一定の傾向はなかった。脳血管造影では、投与前の脳底動脈血管径は大孔横径に対して平均6.52%であったが、day 7では平均3.72%まで狭窄していた。（図5）

SPC投与モデル ($n=2$) では、SPCを最終濃度 $100 \mu\text{M}$ 相当量注入したが、投与前の髄液中SPCは 11.51 nM , 3.39 nM であるのに対し、120分後の髄液中SPCは 4.00 nM (-65.2%), 7.48 nM (+120.6%)となり、前後での値に一定の傾向は見られなかった。脳血管造影では、投与前の脳底動脈血管径は大孔横径に対して平均9.62%であったが、120分後では平均2.75%とCVが確認された。（図6）

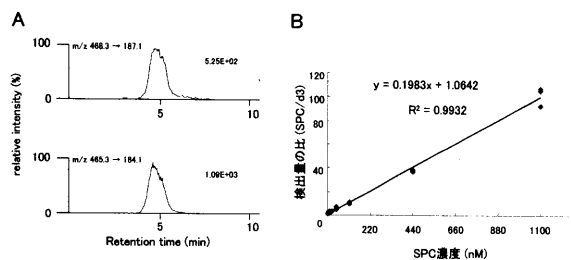


図3 SPCとSPC-d3の存在量を測定した。(A) 上段がSPCの存在量、下段がSPC-d3の存在量。(B) SPCとSPC-d3の存在量の比から検量線を作成した。

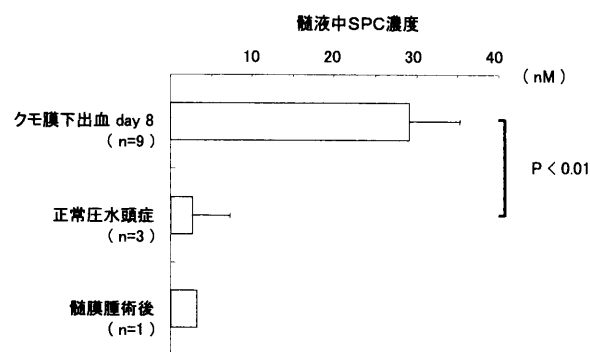


図4 クモ膜下出血 (SAH) 患者のday 8のSPC定量値と正常圧水頭症 (NPH)、髄膜腫術後 (BT) のSPC定量値。SAHではSPCが有意に上昇しており、BTでは上昇しない。

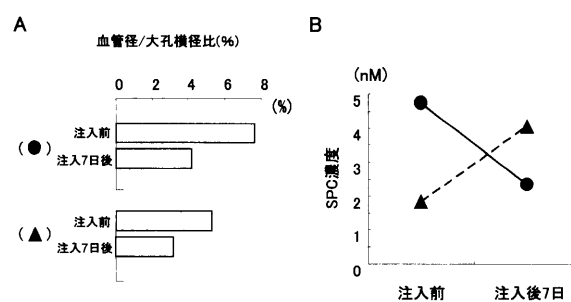


図5 イヌクモ膜下出血モデル ($n=2$)。2固体をそれぞれ (●), (▲) で表した。イヌ大槽内に自己血注入前と、投与後に脳血管造影および、髄液の採取を行った。(A) 脳底動脈の血管径が大孔横径に占める割合 (%) を自己血注入前後で測定した。平均で注入前6.52%から注入7日後3.72%まで狭窄が見られた。(B) 自己血注入前後の髄液中SPCを測定した。投与前後でSPC量に変化は見られなかった。

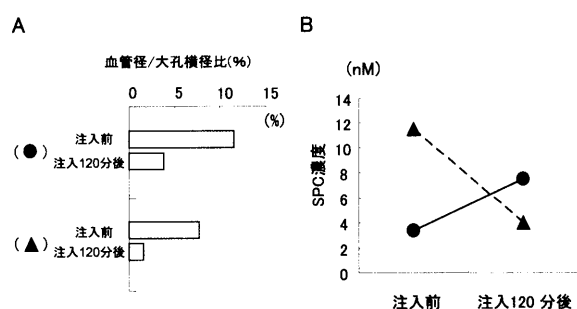


図6 イヌ大槽内SPC注入モデル (n=2). 2 固体をそれぞれ (●), (▲) で表した. イヌ大槽内にSPCを最終濃度 $100\mu\text{M}$ 相当量注入し, 注入前と120分後に脳血管造影と, 髄液の採取を行った. (A) 脳底動脈の血管径が大孔横径に占める割合 (%) を自己血注入前後で測定した. 平均で注入前9.62%から注入120分後2.75%まで狭窄が見られた. (B) 投与前, 120分後で髄液中SPC濃度に差は無かった.

考 察

今回の研究で以下のことがわかった. 1) SPCは脳血管平滑筋においてカルシウム非依存性収縮を起し, その下流にRho-kinaseが関与する. また, この収縮は種を超えて(ウシ・ブタ)認められる. 2) SAH患者の髄液中では, 正常圧水頭症や脳腫瘍術後に比較して明らかにSPCが増加する. しかし, 大部分は組織に吸収されていると思われる.

CVは, 患者の生命/機能予後を左右する重要な病態であるが^{1, 2)} その機構はまだ解明されていない. 経験的に, クモ膜下腔の血腫量に依存して起こるのではないかと考えられている³⁾. 実際, 手術の際に脳槽内にtissue plasminogen activator (tPA)を投与したり, 術後に脳槽ドレナージからurokinaseを注入したりして, 血腫を洗い流すと, CVに対して予防効果がある⁴⁻⁷⁾. 現在, CVに対する治療法としてevidenceのあるものとしては, Triple H療法 (Hypervolemia, Hemodilution, Hypertension)¹⁰⁾ の他, 全身投与の薬物として, AT877 (塩酸ファスジル)⁸⁾, オザグレルナトリウム (トロンボキサン合成阻害薬)⁹⁾ の効果が確認されている. 一方, カルシウム拮抗薬の全身投与はCVをかならずしも予防しない¹⁶⁻¹⁸⁾ ことから, カルシウム非依存性の収縮がその本体でないかとも考えられている. カルシウム非依存性収縮の経路としてRhoA/Rho-kinase系が知られているが, 我々の研究室ではRho-kinaseの

上流因子としてSPCの存在を突き止めた²⁰⁾. 今回我々は, SPCによるカルシウム非依存性収縮が種を超えて, 普遍的に脳血管平滑筋で見られるか否か検討し, ヒトSAH後の髄液中のSPC濃度を測定した.

カルシウム濃度 - 収縮同時測定の結果 (図1) から, $30\mu\text{M}$ SPC投与により, 細胞内カルシウム濃度の上昇無しに血管平滑筋の収縮が得られることが確認された. このカルシウム非依存性収縮は, ウシの脳血管とブタの脳血管の両方で確認された. この収縮は持続性であり, 臨床上的SAH後のCVに類似している. しかし, SPCに対する反応性にはウシとブタとで若干の差が見られ, ウシのほうがより鋭敏にSPCに反応する.

さらに, SPCによるカルシウム感受性変化とRho-kinaseとの関係を明らかにするために, β -escinでスキンド処理したウシ中大脳動脈中膜条片とブタ中大脳動脈中膜条片を用いて, 収縮実験を行った (図2). これにより, Rho-kinaseを直接阻害するdn-ROKを血管平滑筋中膜条片内に投与することが可能となり³¹⁾, SPCとRho-kinaseとの関係を直接証明する事ができた. ウシ中大脳動脈条片のスキンド標本において, $30\mu\text{M}$ SPCは収縮を認めたが, dn-ROKによって, この収縮は阻害された. SPCの下流には, Rho-kinaseが伝達物質として深く関わっていることが示唆された. ブタ中大脳動脈条片スキンド標本においても, 同様の実験を行うと, $30\mu\text{M}$ SPCで得られる収縮は, ウシに比べて小さいものであるが, この収縮は, やはりdn-ROKによって阻害された. SPCは, 反応性の程度に差はあれど, 種を違えてもカルシウム感受性変化を引き起こすことが解った. ヒト脳血管での収縮実験は現在のところ行っていない.

次に, SPCがヒトSAH後の髄腔内に, 放出されるかどうかを検討した.

SPCは, Liliomらによれば血漿中から130nM, 血清中から50nM測定されている²⁴⁾. 過去に髄液中のSPCを測定した報告は無い. 髄液中には, 様々な脂質が混在していると思われるため, SPCの分離・抽出には固相抽出を用い, LC/ESI-MS/MSで測定することとした. SPCを定量化するために, 既知量のSPC-d3 (自然界には存在しない) に対するSPCの存在量の比を用いて検量線を作成した (図3). 良好な検量線が得られ, SPC濃度の定量が可能であった.

SAH後day 8の髄液中SPC濃度は、 29.012 ± 6.306 nM (各N=9)と正常圧水頭症の 2.667 ± 4.619 nM (N=3)に対して有意に増量していた(図4)。また、この上昇が手術侵襲によるものか否かを確認するために、髄膜腫術後1症例の脳室ドレーンからの髄液でSPC濃度を測定したところ、 3.16 nMと上昇は見られなかった。以上の結果から、SPCはクモ膜下出血後の髄液中に有意に上昇し、その上昇は手術侵襲によるものではない可能性が考えられた。しかし、この値は我々がin vitroで収縮実験に用いる $30 \mu\text{M}$ に比べると、非常に低い濃度である。そこで、イヌの脳血管攣縮モデルでは、どの程度SPCが検出されるのかを確認した。

イヌ自己血注入モデル(SAHモデル)で、day 7にCVが起きていることを脳血管造影で確認し、その時の髄液を採取して、SPC濃度を測定した。その結果、投与前と投与後day 7とではSPC濃度の明らかな上昇は見られなかった(図5)。また、髄液中のSPC濃度が最終的に $100 \mu\text{M}$ となるようにSPCを大槽内に投与したが、髄液中SPC濃度は投与前と120分後とで差は見られなかった。ちなみに120分後の脳血管造影でCVが確認できている(図6)。ヒトSAH後のCSF中からは $20\text{-}30$ nMのSPCが抽出されるにも関わらず、イヌモデルではSPC濃度の上昇が見られない。以上から、SPCは投与後すぐに組織内に取り込まれていることが推測される。我々がイヌの実験で投与した $100 \mu\text{M}$ 相当量ではSPCに対する緩衝能が十分に働いていると思われる。SPCは血液凝固に際して産生されると考えられているため、ヒトSAHではSPCが緩衝能以上に放出され、その放出は持続的であることが考えられる。SPCの組織への移行・髄液中での動態などが解明できれば、より正確にSPCとCVの関与が把握できる。そのためには、何らかの方法で標識したSPCを生体内に投与し、追跡観察することが望まれるが、現在は検討の段階である。

今回の我々の結果ではSPC/Rho-kinase系が、CVに関与していることを支持したが、他にも、PKC系³²⁾やSPCと同じスフィンゴ脂質であるSPIP²⁹⁾などのシグナル伝達物質の関与が報告されている。単一経路でなく、様々な物質の複合的な関わりがCVの本態と思われる。多々ある経路の中で、遮断しても生命や他の重要生体機能に影響を与えず、なおか

つ大きな部分を担っている経路を見つけ出し、そこをtargetとした治療薬を開発することが、CVの研究の中で早急に望まれている。今回の研究がその一助となることを期待する。

謝 辞

稿を終えるにあたり、ご指導とご高閲を賜りました応用医工学系・生理学第一講座小林誠教授に深謝いたします。また本研究遂行に際し、多大なるご協力をいただきました生理学第一講座教室諸兄、ならびに、SPC-d3を供与してくださいました持田製薬株式会社総合研究所弓矢康伸氏、矢野崇氏にこの場をかりて御礼申し上げます。動物実験は岩手医科大学脳神経外科教室諸兄に多大なご協力をいただきましたことを、ここで感謝いたします。そして、今回の研究の機会を与えてくださった脳神経外科学講座鈴木倫保教授に誠意を表します。

参考文献

- 1) Kassell NF, Torner JC, Haley EC Jr., Jane JA, Adams HP, Kongable GL. The International Cooperative Study on the Timing of Aneurysm Surgery. Part 1: Overall management results. *Journal of Neurosurgery* 1990; **73**: 18-36.
- 2) Kassell NF, Sasaki T, Colohan AR, Nazar G. Cerebral vasospasm following aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *Stroke* 1985; **16**: 562-72.
- 3) Weir B, Macdonald RL, Stoodley M. Etiology of cerebral vasospasm. *Acta Neurochirurgica* 1999; **72 (Sup)**: 27-46.
- 4) Findlay JM, Kassell NF, Weir BK, Haley EC Jr., Kongable G, Germanson T, Truskowski L, Alves WM, Holness RO, Knuckey NW. A randomized trial of intraoperative, intracisternal tissue plasminogen activator for the prevention of vasospasm. *Neurosurgery* 1995; **37**: 168-76.
- 5) Mizoi K, Yoshimoto T, Takahashi A, Fujiwara S, Kosu K, Sugawara T. Prospective study

- on the prevention of cerebral vasospasm by intrathecal fibrinolytic therapy with tissue-type plasminogen activator. *Journal of Neurosurgery* 1993 ; **78** : 430-437.
- 6) Mizuno M, Nakajima S, Sampei T, Nishimura H, Hadeishi H, Suzuki A, Yasui N, Nathal-Vera E. Serial transcranial Doppler flow velocity and cerebral blood flow measurements for evaluation of cerebral vasospasm after subarachnoid hemorrhage. *Neurologia Medico-Chirurgica* 1994 ; **34** : 164-71.
 - 7) Kodama N, Sasaki T, Kawakami M, Sato M, Asari J. Cisternal irrigation therapy with urokinase and ascorbic acid for prevention of vasospasm after aneurysmal subarachnoid hemorrhage. Outcome in 217 patients. *Surgical Neurology* 2000 ; **53** : 110-117.
 - 8) Shibuya M, Suzuki Y, Sugita K, Saito I, Sasaki T, Takakura K, Nagata I, Kikuchi H, Takemae T, Hidaka H. Effect of AT877 on cerebral vasospasm after aneurysmal subarachnoid hemorrhage. Results of a prospective placebo-controlled double-blind trial. *Journal of Neurosurgery* 1992 ; **76** : 571-577.
 - 9) Tokiyoshi K, Ohnishi T, Nii Y. Efficacy and toxicity of thromboxane synthetase inhibitor for cerebral vasospasm after subarachnoid hemorrhage. *Surgical Neurology* 1991 ; **36** : 112-118.
 - 10) Origitano TC, Wascher TM, Reichman OH, Anderson DE. Sustained increased cerebral blood flow with prophylactic hypertensive hypervolemic hemodilution ("triple-H" therapy) after subarachnoid hemorrhage. *Neurosurgery* 1990 ; **27** : 729-739.
 - 11) Sawada M, Hashimoto N, Tsukahara T, Nishi S, Kaku Y, Yoshimura S. Effectiveness of intra-arterially infused papaverine solutions of various concentrations for the treatment of cerebral vasospasm. *Acta Neurochirurgica* 1997 ; **139** : 706-711.
 - 12) Numaguchi Y, Zoarski GH, Clouston JE, Zagardo MT, Simard JM, Aldrich EF, Sloan MA, Maurer PK, Okawara SH. Repeat intra-arterial papaverine for recurrent cerebral vasospasm after subarachnoid haemorrhage. *Neuroradiology* 1997 ; **39** : 751-759.
 - 13) Vajkoczy P, Horn P, Bauhuf C, Munch E, Hubner U, Ing D, Thome C, Poeckler-Schoeninger C, Roth H, Schmiedek P. Effect of intra-arterial papaverine on regional cerebral blood flow in hemodynamically relevant cerebral vasospasm. *Stroke* 2001 ; **32** : 498-505.
 - 14) Arakawa Y, Kikuta K, Hojo M, Goto Y, Ishii A, Yamagata S. Milrinone for the treatment of cerebral vasospasm after subarachnoid hemorrhage : report of seven cases. *Neurosurgery* 2001 ; **48** : 723-728.
 - 15) Tachibana E, Harada T, Shibuya M, Saito K, Takayasu M, Suzuki Y, Yoshida J. Intra-arterial infusion of fasudil hydrochloride for treating vasospasm following subarachnoid haemorrhage. *Acta Neurochirurgica* 1999 ; **141** : 13-19.
 - 16) Krueger C, Weir B, Nosko M, Cook D, Norris S. Nimodipine and chronic vasospasm in monkeys : Part 2. Pharmacological studies of vessels in spasm. *Neurosurgery* 1985 ; **16** : 137-40.
 - 17) Nosko M, Weir B, Krueger C, Cook D, Norris S, Overton T, Boisvert D. Nimodipine and chronic vasospasm in monkeys : Part 1. Clinical and radiological findings. *Neurosurgery* 1985 ; **16** : 129-136.
 - 18) Haley EC Jr., Kassell NF, Torner JC. A randomized trial of nicardipine in subarachnoid hemorrhage : angiographic and transcranial Doppler ultrasound results. A report of the Cooperative Aneurysm Study. *Journal of Neurosurgery* 1993 ; **78** : 548-553.
 - 19) Todoroki-Ikeda N, Mizukami Y, Mogami K, Kusuda T, Yamamoto K, Miyake T, Sato M, Suzuki S, Yamagata H, Hokazono Y, Kobayashi S. Sphingosylphosphorylcholine induces Ca (2+) -sensitization of vascular

- smooth muscle contraction : possible involvement of rho-kinase. *FEBS Letters* 2000 ; **482** : 85-90.
- 20) Shirao S, Kashiwagi S, Sato M, Miwa S, Nakao F, Kurokawa T, Todoroki-Ikeda N, Mogami K, Mizukami Y, Kuriyama S, Haze K, Suzuki M, Kobayashi S. Sphingosylphosphorylcholine is a novel messenger for Rho-kinase-mediated Ca^{2+} sensitization in the bovine cerebral artery : unimportant role for protein kinase C. *Circulation Research* 2002 ; **91** : 112-119.
- 21) Sato M, Tani E, Fujikawa H, Kaibuchi K. Involvement of Rho-kinase-mediated phosphorylation of myosin light chain in enhancement of cerebral vasospasm. *Circulation Research* 2000 ; **87** : 195-200.
- 22) Uehata M, Ishizaki T, Satoh H, Ono T, Kawahara T, Morishita T, Tamakawa H, Yamagami K, Inui J, Maekawa M, Narumiya S. Calcium sensitization of smooth muscle mediated by a Rho-associated protein kinase in hypertension. *Nature* 1997 ; **389** : 990-994.
- 23) Kureishi Y, Kobayashi S, Amano M, Kimura K, Kanaide H, Nakano T, Kaibuchi K, Ito M. Rho-associated kinase directly induces smooth muscle contraction through myosin light chain phosphorylation. *Journal of Biological Chemistry* 1997 ; **272** : 12257-12260.
- 24) Liliom K, Sun G, Bunemann M, Virag T, Nusser N, Baker DL, Wang DA, Fabian MJ, Brandts B, Bender K, Eickel A, Malik KU, Miller DD, Desiderio DM, Tigyi G, Pott L. Sphingosylphosphocholine is a naturally occurring lipid mediator in blood plasma : a possible role in regulating cardiac function via sphingolipid receptors. *Biochemical Journal* 2001 ; **355** : 189-197.
- 25) Zubkov AY, Rollins KS, Parent AD, Zhang J, Bryan RM Jr. Mechanism of endothelin-1-induced contraction in rabbit basilar artery. *Stroke* 2000 ; **31** : 526-533.
- 26) Scherer EQ, Herzog M, Wangemann P. Endothelin-1-induced vasospasms of spiral modiolar artery are mediated by rho-kinase-induced Ca^{2+} sensitization of contractile apparatus and reversed by calcitonin gene-related Peptide. *Stroke* 2002 ; **33** : 2965-2971.
- 27) Miyagi Y, Kobayashi S, Nishimura J, Fukui M, Kanaide H. Dual regulation of cerebrovascular tone by UTP : P2U receptor-mediated contraction and endothelium-dependent relaxation. *British Journal of Pharmacology* 1996 ; **118** : 847-856.
- 28) Wickman G, Lan C, Vollrath B. Functional roles of the rho/rho kinase pathway and protein kinase C in the regulation of cerebrovascular constriction mediated by hemoglobin : relevance to subarachnoid hemorrhage and vasospasm. *Circulation Research* 2003 ; **92** : 809-816.
- 29) Tosaka M, Okajima F, Hashiba Y, Saito N, Nagano T, Watanabe T, Kimura T, Sasaki T. Sphingosine 1-phosphate contracts canine basilar arteries in vitro and in vivo : possible role in pathogenesis of cerebral vasospasm. *Stroke* 2001 ; **32** : 2913-2919.
- 30) Ito K, Shimomura E, Iwanaga T, Shiraishi M, Shindo K, Nakamura J, Nagumo H, Seto M, Sasaki Y, Takuwa Y. Essential role of rho kinase in the Ca^{2+} sensitization of prostaglandin F (2alpha) -induced contraction of rabbit aortae. *Journal of Physiology* 2003 ; **546** : 823-836.
- 31) Kobayashi S, Kitazawa T, Somlyo AV, Somlyo AP. Cytosolic heparin inhibits muscarinic and alpha-adrenergic Ca^{2+} release in smooth muscle. Physiological role of inositol 1,4,5-trisphosphate in pharmacomechanical coupling. *Journal of Biological Chemistry* 1989 ; **264** : 17997-18004.
- 32) Takuwa Y, Matsui T, Abe Y, Nagafuji T, Yamashita K, Asano T. Alterations in protein kinase C activity and membrane lipid metabolism in cerebral vasospasm after subarachnoid hemorrhage. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism* 1993 ; **13** : 409-415.

Sphingosylphosphorylcholine Concentration in the Cerebrospinal Fluid Is Increased after Subarachnoid Hemorrhage in Humans

Tetsu KUROKAWA

*Department of Neurosurgery and Clinical Neuroscience,
Yamaguchi University School of Medicine,
1-1-1 Minami Kogushi, Ube, Yamaguchi, 755-8505, Japan*

SUMMARY

Cerebral vasospasm (CV) is one of the major causes of fatal complications after subarachnoid hemorrhage (SAH). The Ca^{2+} sensitization mechanism is currently considered to play an important role in the pathogenesis of CV. The authors previously reported that sphingosylphosphorylcholine (SPC) induces Ca^{2+} -independent contraction in vascular smooth muscle. In the present study, we measured SPC concentration in the cerebrospinal fluid (CSF) of patients with SAH in order to elucidate the possible relationship between SPC and CV.

CSF was obtained from 9 patients with SAH after surgery. For comparison, SPC concentration in the CSF of one patient with meningioma and three patients with normal pressure hydrocephalus (NPH) was measured. The SPC concentration of CSF was 29.0 ± 6.3 nM for SAH, whereas it was 2.7 ± 4.6 nM for NPH. In the dog's SAH model and the SPC-injected model, SPC concentration did not increase significantly. These results suggest that SPC is released in CSF after SAH, but it is taken up to tissue immediately. Sphingosylphosphorylcholine in CSF after SAH probably released much more than the concentrations we measured in this study. With known contractile effect of SPC, it is highly possible that this molecule is one of the important mediators for CV after SAH.