Basic and Epidemiologic Study on Human Platelet-Derived Growth Factor(PDGF)

メタデータ	言語: jpn
	出版者:
	公開日: 2017-10-04
	キーワード (Ja):
	キーワード (En):
	作成者:
	メールアドレス:
	所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/8578

ヒト血中血小板由来増殖因子に関する基礎的研究ならびにその測定意義に対する疫学的研究

金沢大学医学部公衆衛生学講座（主任代理：中村裕之助教授）
吉　田　雅　美

細胞増殖因子である血小板由来増殖因子 (platelet-derived growth factor, PDGF) のヒト血中での存在形式を明らかにするためにゲル濾過法および高速液体クロマトグラフィー (high performance liquid chromatography, HPLC) を用いて，PDGF のアイソフォームの分離を試みた．その結果ヒト血清中の PDGF のアイソフォーム比は PDGF-AB が約 65%, PDGF-BB が約 35% であった．次に PDGF と動脈硬化発生との関連性を検討するために，一般健常人182名に対して PDGF と各種一般健康診断項目との関係を疫学的に検討した．血中 PDGF と総コレステロールとの間に正の相関が認められたこと以外，動脈硬化症と PDGF の関連を一元的に説明できる結果は得られなかった．一方，振動障害の特徴的な症状である振動起因性白指症 (vibration-induced white finger, VWF) の発現機序を解明するために，手腕振動暴露試験前後の PDGF の変化を調べた．PDGF は VWF 群において有意に低下したのに対し，対照群では有意に増加した．VWF の発現機序の一つとして繰り返しの振動暴露が引き起こす刺激部位における PDGF の放出が，局所の血管に作用し器質的変化をもたらすのではないかと示唆された．また手腕振動暴露試験により潜在的な VWF 群と正常群を判別できる可能性も示唆された．

Key words atherosclerosis, gel chromatography, high performance liquid chromatography (HPLC), platelet-derived growth factor (PDGF), vibration-induced white finger (VWF)

血小板由来増殖因子 (platelet-derived growth factor, PDGF) は，間葉細胞由来で，血小板，血管内皮，マクロファージ，神経細胞，平滑筋細胞などから産生され，線維芽細胞や平滑筋細胞の増殖促進活性を担う血清中の因子であり，その作用は動脈硬化の発生や進展，腫瘍の成因，さらには創傷治癒機構等に重要な役割を果たしている[1][2]．PDGF は分子量約 30,000 (28－31kDa) の2本のポリペプチドからなる．これら2本のポリペプチド鎖が10個前後の S-S 結合により，AA または BB ホモダイマー，ないしは AB ヘテロダイマーとして存在している．A 鎖は B 鎖に比べ，細胞増殖活性は弱いといわれている[3][4]．また細胞表面の特殊なレセプターは，PDGF のアイソフォームによって異なったサブユニット構成で発現し，生物活性の発現も決定される[5][6]．そのため PDGF の作用機序を明確にするために，血清中の PDGF のアイソフォームの存在比を明らかにすることは重要であるが，現在でもその存在比に関しては一致をみていない[7]~[14]．

一方，Ross は，動脈硬化が発生する機序として，血管内膜が何らかの理由により傷害されると，血小板から PDGF が放出され，その結果血管平滑筋が増殖し，動脈硬化が発生するという血管傷害反応説を唱えた[15]．これを裏付けるかのように虚血性心疾患[16][17]やⅡ型高脂血症[18]などの疾病では，血中 PDGF 値は上昇しているとの報告がある．

ところで振動障害の最も特徴的な症状は発作性の手指の蒼白現象 (vibration-induced white finger, VWF) であるが，その症状は末梢循環障害に基づくものである．VWF の病態の発現機序に関する研究はこれまで数多く報告されており[19]~[21]，液性因子の関与も指摘されているが[20][22]~[25]いまだ明確になっていない．

そこで今回ゲル濾過法および高速液体クロマトグラフィー (high performance liquid chromatography, HPLC) を用いて，ヒト血清中の PDGF-AB, -BB を分離し，その存在比を明らかにし，一般健常人を対象に血中 PDGF 値と一般健康診断項目との関連を疫学的に検討した．また手腕振動暴露による VWF 発現機序を解明する基礎的研究の一つとして，1回の手腕振動暴露が血管平滑筋の内皮細胞から遊離される PDGF に及ぼす影響についても検討した．

対象および方法

Ⅰ．対　象

1．一般健常人における血中 PDGF 値測定

平成4年2月に行われた石川県某山村での住民健診受診者，および平成4年4月に行われた富山県某企業健診受診者のうち，服薬していない男性131名，女性51名の計182名を対象に，一般健康診断項目として身長，体重，喫煙量，飲酒量，血圧

平成6年8月9日受付，平成6年9月13日受理

Abbreviations: BP, blood pressure; γ-GTP, γ-glutamyltranspeptidase; GOT, glutamic-oxalacetic transaminase; GPT, glutamic-pyruvic transaminase; HDL-cholesterol, high density lipoprotein cholesterol; HPLC, high performance liquid chromatography; ISO, International Organization for Standardization; PDGF,

値，ヘマトクリット（血球自動計数機[26]），血算（血球自動計数機[26]），血糖（グルコキナーゼ/G-6-PDH 法[26]），総蛋白（Biuret 法[26]），尿素窒素（ウレアーゼインドフェノール法[27]），クレアチニン（酵素法[26]），尿酸（酵素法[26]），総コレステロール（酵素法[26]），高比重リポ蛋白コレステロール（high density lipoprotein cholesterol, HDL-コレステロール）（ポリエチレングリコール法[27]），中性脂肪（酵素法[26]），グルタミン酸オキザロ酢酸トランスアミナーゼ（glutamic-oxalacetic transaminase, GOT）（UV 法[26]），グルタミン酸ピルビン酸トランスアミナーゼ（glutamic-pyruvic transaminase, GPT）（UV 法[26]），γ-グルタミルトランスペプチダーゼ（γ-glutamyltranspeptidase, γ-GTP）（L-γ グルタミン-P-ニトロアニリド基質法[26]）および心電図を検査すると同時に血中 PDGF 値を調べた．

2．振動検診受診者における血中 PDGF 値測定

対象は，平成4年および平成5年の1月から2月にかけて行われた，福井県での振動工具の取扱業務に係る特殊健康診断受診者のうち，男性のチェーンソー使用者である．各受診者に対し昭和50年10月20日付労働基準局長による基発第609号[28]に準じた問診および身体検査を行った．被験者はストックホルムワークショップスケール[29]を用いて2群に分けた．VWF 発作の既往がないステージ0である者を対照群とし，同スケールでステージ2およびステージ3の者でかつ過去2年以内に白指症状を呈した蒼白発作の既往のある者の群を VWF 群とした．2群の年齢および振動暴露年数が対応するように対照群8人と，ステージ2が5人，ステージ3が2人の計7人の VWF 群を選定した．対照群の年齢および振動暴露年数の平均±標準誤差はそれぞれ 56.9±1.27 歳，24.1±1.31 年，VWF 群の7人は 60.0±1.81 歳，29.4±2.42 年であった．また被験者は，糖尿病，高血圧，末梢神経障害等の既往がない者，降圧剤，消炎鎮痛剤は服用しておらず安静時血圧が正常な者，また白指が振動起因性であることが身体所見および他の検査によって確かめられた者を選定した．

被験者には室内用の着衣にて室温 22～24℃ の部屋で30分以上安静にさせ，その間喫煙および飲食を禁止した．振動暴露試験を行う前に安静時採血として，座位にて左肘前腕静脈より採血した．振動暴露は安静時採血とは反対側の右腕に行い，暴露終了から1分後右腕から採血を行った．検査項目は安静時は PDGF，組織プラスミノーゲンアクチベーター活性（tissue-plasminogen activator 活性，t-PA）（発色性合成基質法[30]），フィブリノーゲン（自動化法[31]），総コレステロール，HDL-コレステロール，中性脂肪，GOT, GTP, γ-GPT について行った．負荷後は PDGF, t-PA の2項目を測定した．

Ⅱ．方 法

1．採血条件

血漿 PDGF は，血小板の活性化を防ぐという理由で駆血帯を緩く巻き，ポリスチレン注射器と 21G 針を用いて採血した．採血後，速やかに注射針をはずし，蓋を開けた専用容器に血を移し，静かに手で反転混合した．専用容器には 100μl の蒸留水に，テオフィリン 2.7g/l，アデノシン 1.0g/l，ジピリモダール 0.1g/l，クエン酸ナトリウム 24.26g/l，クエン酸 5.78g/l が溶解されている．この容器を用い乏血小板血漿とする理由は，仮に血漿中に血小板が残存すれば，時間の経過とともに血小板が活性化するので，本来の血中 PDGF 濃度を反映しなくなるためである．砕氷下に15分以上放置後，4℃ にて30分，3,000回転/分で遠心分離を行い，得られた乏血小板血漿を −70℃ で保存した．

2．PDGF の測定

測定は，2抗体法による放射性免疫測定法（radioimmunoassay, RIA 法）を用いる阪内らの方法[32]に準じた．

1）使用薬品および器具

使用した薬品・器具は以下の通りである．

ヒト組み換え型 PDGF-AB 鎖ヘテロダイマー（Bachem Fine Chemicals Inc., Torrance, USA），ヒト組み換え型 PDGF-BB 鎖ホモダイマー（Amersham, Buckinghamshire, UK），Bolton と Hunter 法[33]によりアイソトープを標識されたヒト組み換え型 ^{125}I-PDGF-BB 鎖ホモダイマー（Amersham），抗ヒト PDGF 抗体（Collaborative Research Inc., Bedford, USA），抗ヤギ IgG 血清（医学生物学研究所，名古屋），正常ヤギ血清（Rockland, Gilbertsville, USA），Tris-HCl（和光，大阪），ツィーン20（和光），塩化ナトリウム，ポリエチレングリコール（和光），ポリスチレン試験管 RIA 用栄研チューブ2号（栄研，東京）を用いた．緩衝液は pH8.0 に調整した 0.5M の塩化ナトリウムと 0.05% のツィーン20を含む 0.05M Tris-HCl を用いた．

2）測定手順

既知量の PDGF-AB ヘテロダイマーを含む標準液検体，またはヒト血漿試料 100μl と，3万倍に希釈した抗 PDGF 抗体 50μl，および Tris-HCl 緩衝液 100μl を混合し 4℃ にて2日間静置した．その後 10,000～15,000cpm/50μl に調整した ^{125}I-PDGF-BB ホモダイマーを加え，さらに 4℃ にて2日間静置した．次に抗ヤギ IgG 血清 100μl，正常ヤギ血清 100μl, 25% ポリエチレングリコール液 50μl を混合し室温にて20分間加温後，遠心分離を3,000回転で20から25分間行った．最後に吸引器で上清みを吸い沈査と分離し，オートウェルガンマシステム ARC-600（アロカ，三鷹）にて沈査の放射活性を測定した．なお，PDGF 標準液による標準曲線は三次多項式により回帰した．

3．PDGF アイソフォームの分離

1）ゲル濾過法

ゲル濾過は大きさが 1.6×60cm のハイロードセファクリール S-100 ハイレゾリューションカラム（Pharmacia LKB Biotechnology Inc., Uppsala, Sweden）を用いて，PDGF 標準品および正常ヒト男性5人の血清試料についてゲル濾過を行った．移動相は PDGF 測定に用いた Tris-HCL 緩衝液を使用し，流速 0.15ml/分で溶出させた．カラムにヒト血清または濃度 400ng/ml の PDGF-AB 標準品を 0.9ml 供した．各フラクションは 0.65ml であり，フラクション毎に PDGF 濃度を測定し比較検討した．またゲル濾過により粗分離された血清の PDGF 活性を有する分画は凍結乾燥し，次項に述べる HPLC における分離のサンプルとした．

2）HPLC

PDGF-AB 標準品，PDGF-BB 標準品，PDGF-AB 標準品と PDGF-BB 標準品の混合品，およびゲル濾過で得られたサンプ

platelet-derived growth factor; RIA, radioimmunoassay; t-PA, tissue-plasminogen activator; VWF, vibration-induced white finger

ルの凍結乾燥品の4種類につき HPLC を行い，PDGF の存在形式を検討した．カラムは TSK ゲル ODS-120T (東ソー，東京) を使用した．カラムの大きさは 4.6mm×15cm で，樹脂の粒径は 5μm であった．カラムはあらかじめ 0.05% トリフルオロ酢酸を含む 15% アセトニトリル溶液で平衡化させた．検体を 0.1% トリフルオロ酢酸を含む蒸留水 50μl に溶解し，カラムに注入した．移動相に 0.05% トリフルオロ酢酸を含むアセトニトリル溶液を用いて，アセトニトリルの15から 55% の直線濃度勾配を60分間で展開し溶出した．移動相の流速は 1.0ml/分，カラム温度は 42℃，溶出分画は 0.8ml であり，それぞれの分画の PDGF 濃度を RIA 法にて測定した．

4．振動暴露試験

1）振動暴露装置

振動暴露装置は加振器 513-A (新日本測器，東京)，オシレーター NF-MODEL E-1011 (エヌエス回路設計ブロック，横浜)，振幅増幅器 TA-100 (立川電子，東京)，振動計 505-CAP (新日本測器) より構成されている．加振器の振動板上に直径 40mm の円柱ハンドルを有するアクリル性の手部加振装置を試作して固定した．オシレーターからの出力を振幅増幅器で増幅し，加振器に作動させた．また振動加速度は円柱ハンドルの基部近くに振動レベル測定用の加速型ピックアップ 541-A (新日本測器) を取り付け，振動計で監視した．

2）指血流量の測定

指血流量は，ペルチェスタックを利用した熱拡散法[34]を用いた皮膚血流システム (バイオメディカルサイエンス，金沢) にて測定した．センサーは皮膚との接着面にケラチンクリームを塗布し，振動暴露側の第Ⅲ指中節背面の皮膚に両面接着リングを用いて装着し，ペンレコーダー AHR-182 (バイオメディカルサイエンス) を用いて連続的に記録した．血流は振動暴露数分前から終了後3分まで測定した．負荷前の値は暴露直前の値を，また負荷後の値としては振動暴露終了直前の値を採用した．

3）振動暴露方法

被験者に血流のセンサーを装着後，指血流量の安静時のレベルを観察し値が安定したことを確認した後，座位のまま右腕を右下前方に伸ばしてハンドルを 5kg 重の把持力で握らせた．再び指血流量がほぼ一定となった時点で，周波数 120Hz，実行値で加速度 50m/sec^2 の正弦波垂直振動を国際標準化機構 (International Organization for Standardization, ISO) の基準[35]による右手X方向に5分間負荷を行い，連続的に指血流量を記録した．負荷終了後も2分間は把持したまま 5kg 重の握力を保ち続け指血流量を観察した．なお被験者には把持力が一定になるよう小型荷重変換器 LM-20KA (共和電業，調布) をセンサーとした計装用コンディショナ WGA-710A-3 (共和電業) を用いて 5kg 重の握力を監視させながら振動を暴露した．

5．統　計

統計処理は，一般健常人182名に対しては Student-t 検定，および重回帰分析を用いた．また振動検診受診者15名に対しては，Student-t 検定を用いた．ただし指血流量，PDGF, t-PA の3項目については，振動暴露前後の値の差の検定にはそれぞれ対応のある t 検定を用いた．統計処理はすべて両側検定で行い，その有意水準を 0.05 としこれより小さい場合を有意差ありとみなした．

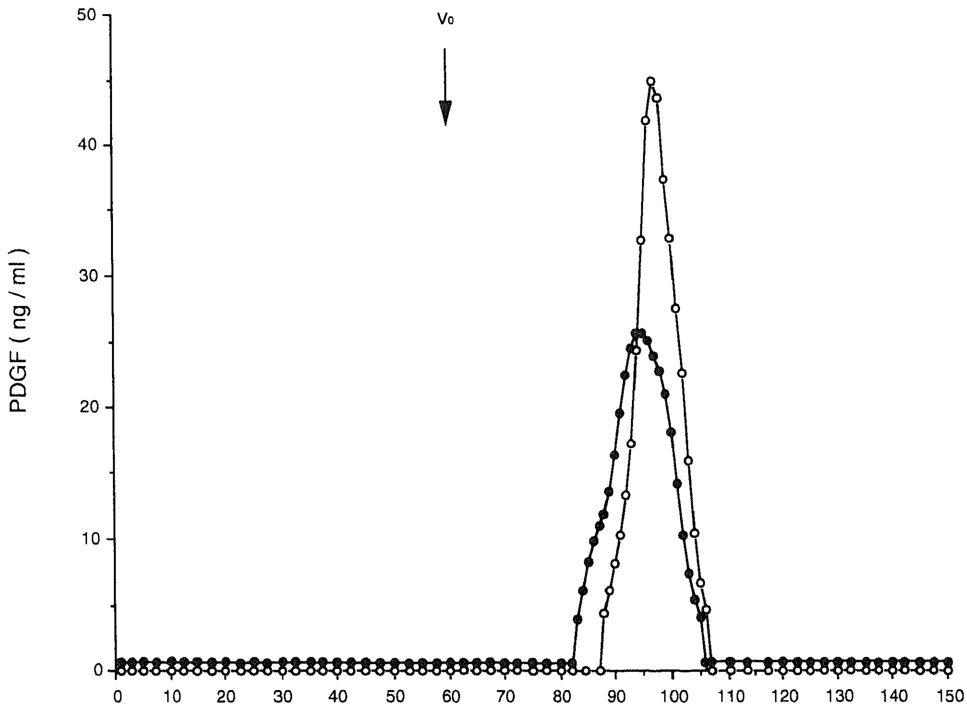
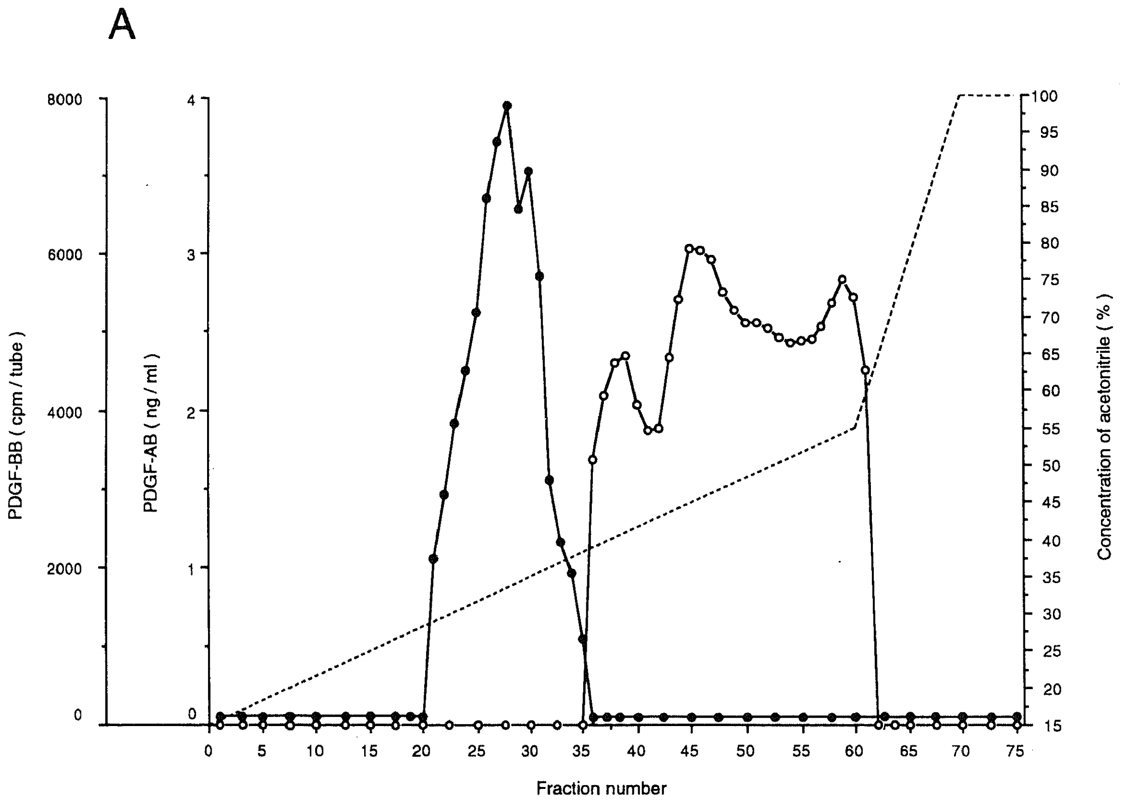


Fig. 1. Elution profile of platelet-derived growth factor (PDGF) on gel chromatography. A volume of 0.9 ml of the human serum or PDGF-AB (400 ng/ml) was applied to a Sephacryl S-100 column (column size, 1.6 cm×60 cm). A flow rate was 0.15 ml/min. Each fraction volume was 0.65 ml. The column was calibrated with blue dexitran (void volume, V_0). ○, PDGF-AB ; ●, human serum.



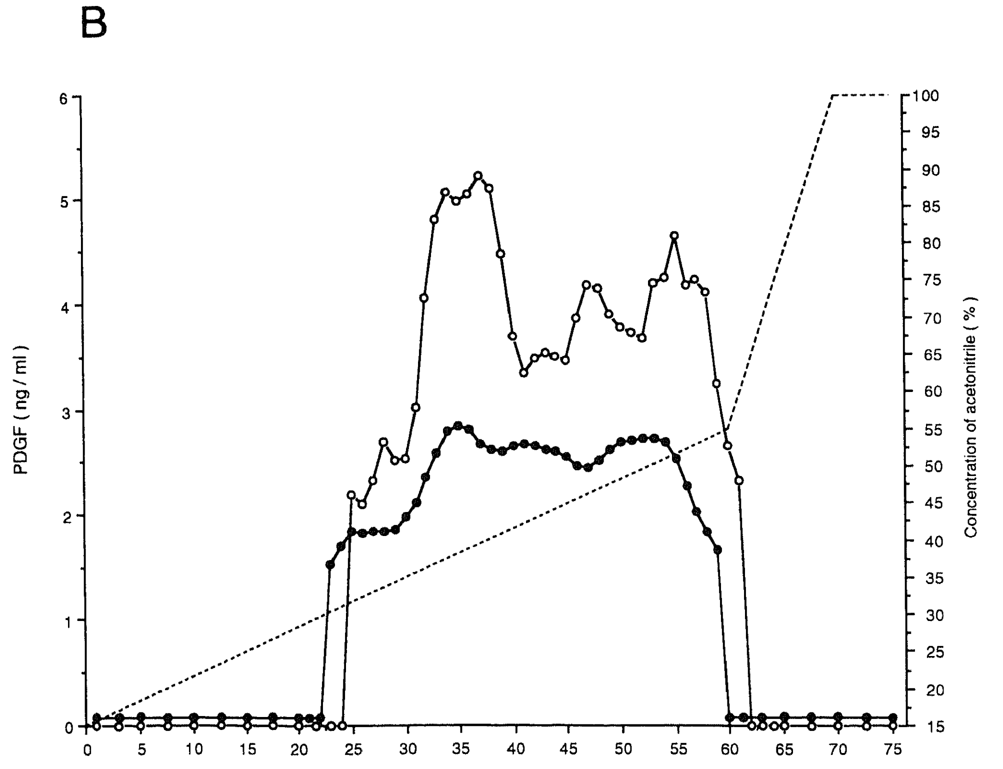


Fig. 2. Elution profile of platelet-derived growth factor (PDGF) on high performance liquid chromatography (HPLC). A standard solution of PDGF (A) and PDGF partially purified from human serum or a mixture of PDGF-AB and PDGF-BB (1 : 2 mixture) (B) were applied to a TSK gel ODS-120T column (column size, 4.6 mm×15 cm; particle size, 5 μm). The column was operated at 42℃ at a flow rate of 1.0 ml/min. Each fraction volume was 0.8 ml. The column was eluted with a gradient of acetonitrile. A. ○, PDGF-AB, ●, I^{125}-PDGF-BB ; -----, concentration of acetonitrile. B. ○, a mixture of PDGF-AB and PDGF-BB (1 : 2 mixture) ; ●, PDGF partially purified from human serum ; -----, concentration of acetonitrile.

成　　績

Ⅰ．健常人の健康診断時の基礎統計量および PDGF 値

健常人182名における次の指標に対する平均値±標準誤差は以下の通りであった．年齢，51.8±0.85 歳；Brinkman 指数，323±27 本・年；収縮期血圧，127±0.96mmHg；拡張期血圧，79±0.67mmHg；総コレステロール，197±2.74mg/dl；HDL-コレステロール，48.4±0.86mg/dl；ヘマトクリット，44.0±0.32% であった．また正常集団の PDGF の値は対数変換にて正規分布を示した．

Ⅱ．PDGF アイソフォームの分離

1．ゲル濾過法

図1に PDGF-AB 標準品とヒト血清のゲル濾過法の結果を示した．PDGF-AB 標準品ではフラクション 88-106 番にピークが認められ，ヒト血清では，PDGF 標準品で得られた結果とほとんど同じフラクション 83-105 番にピークが認められた．この結果からゲル濾過法により PDGF が粗分離されたことがわかった．そこで RIA 法により PDGF 活性を持つと確認された分画，つまり PDGF が粗分離されている分画を凍結乾燥サンプルとし，これを用いて次に述べる HPLC による PDGF のアイソフォームの分離を試みた．

2．HPLC

図 2A に PDGF-AB および PDGF-BB をそれぞれ HPLC のカラムに注入した結果を示す．PDGF-BB ではフラクション21番から35番にピークが，PDGF-AB ではフラクション36番から60番にピークが認められた．次に PDGF-AB 標準品 100ng と PDGF-BB 標準品 50ng の混合品およびゲル濾過で得たヒト血清のサンプルの凍結乾燥品の2種類の試料を注入した．その結果を図 2B に示す．PDGF の混合品およびヒト血清のサンプルのピークはほぼ重なり，20番代前半から60番までの間に溶出された．なお HPLC での分離の再現性を検討するためにヒト血清での分離は正常成人男性5人の検体を用いて計5回測定した．測定間の変動係数は AB 鎖は 2.2%，BB 鎖は 5.0% であった．

Ⅲ．一般健常人に対する疫学的検討

一般健常人182名に対し PDGF の疫学的検討を行った．血中 PDGF は Brinkman 指数，ヘマトクリットとの間に有意の負の相関を認め，年齢，総コレステロール，HDL-コレステロールとは有意の正の相関が認められた（表1）．血圧とは関連がみられなかった．

Table 1. Correlation between plasma platelet-derived growth factor (PDGF) and other health indicators

Variables	CC[a]	P value
Age	0.188	0.0108
Brinkman index	−0.276	0.0008
Systolic BP	0.078	0.2966
Diastolic BP	0.016	0.8354
Total cholesterol	0.167	0.0242
HDL-cholesterol	0.173	0.0347
Hematocrit	−0.201	0.0076

a) Correlation coefficient calculated by Pearson's method

Table 2. Multiple regression analysis on plasma platelet-derived growth factor (PDGF) level for the main health indicators in 182 healthy subjects

Variables	SPRC[a]	F value	P value
Age	0.133	2.248	0.136
Brinkman index	−0.196	4.925	0.028
Systolic BP	0.050	0.368	0.545
Total cholesterol	0.111	1.689	0.196
HDL-cholesterol	0.098	1.341	0.249
Hematocrit	−0.088	0.885	0.349

Multiple correlation coefficient is 0.369. F value is 3.442. ($p<0.005$)
a) Standard partial regression coefficient.

Table 3. Health indicators in the controls and subjects with vibration-induced white finger (VWF)

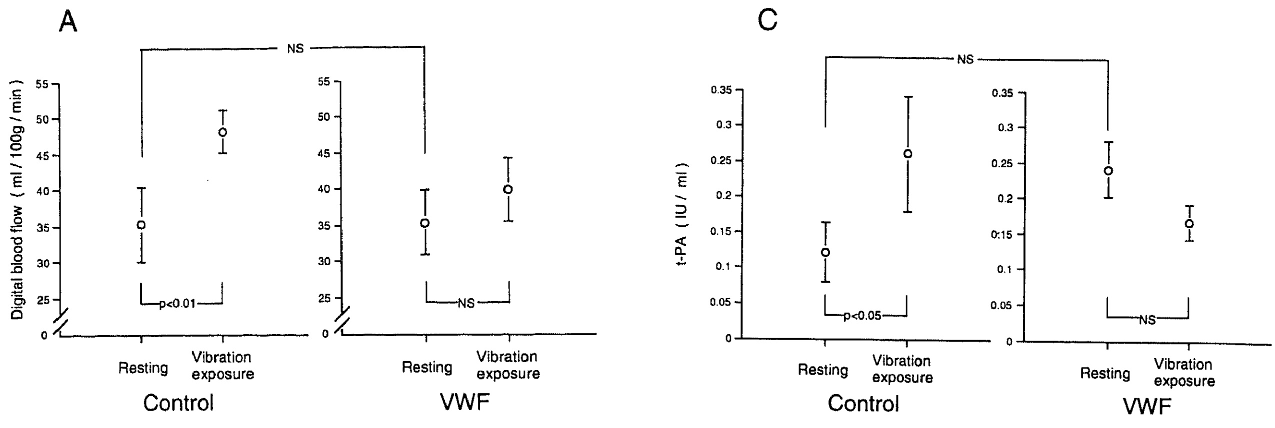
Group	Number of subjects examined	Values (mean±SEM) of						
		Age (years)	Exposure period (years)	Brinkman index (cigarettes・years)	Systolic BP[a] (mmHg)	Diastolic BP (mmHg)	Total cholesterol (mg/dl)	HDL-cholesterol (mg/dl)
Control	8	56.9±1.27	24.1±1.31	302±121	122±3.2	76±2.8	212±6.4] *	71.3±6.61
VWF	7	60.0±1.81	29.4±2.42	255±71	125±3.8	71±2.6	187±9.8	64.4±7.33

a) BP, blood pressure. Student t-test was used in testing the difference of the mean. Statistical significance, $p<0.05$*.

Table 4. Biochemical and physiological indicators in the controls and the subjects with vibration-induced white finger (VWF)

Group	Number of subjects examined	Value (mean±SEM) of		Laboratory data (mean±SEM) of					
		Digital blood flow (ml/100 g/min)		PDGF* (ng/ml)		t-PA (IU/ml)		Platelet (10^4/mm^3)	Fibrinogen (mg/dl)
		Resting	After exposure	Resting	After exposure	Resting	After exposure	Resting	Resting
Control	8	35.5±5.4	48.4±3.4	0.90±0.03	1.00±0.02	0.13±0.05	0.26±0.09	21.0±1.2	171±18
VWF	7	35.9±4.7	40.4±4.2	0.98±0.02	0.93±0.03	0.24±0.05	0.19±0.03	18.4±2.0	216±20

*, log transformed value.



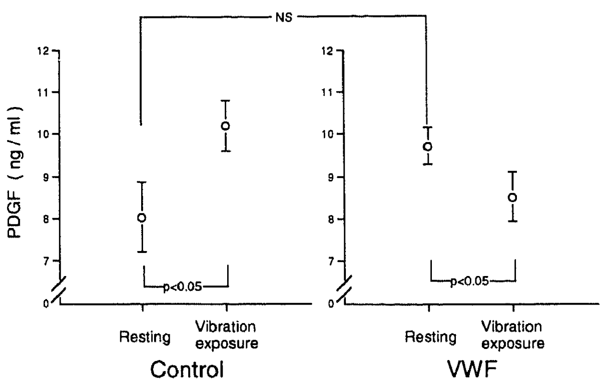


Fig. 3. Effects of vibration exposure with the sustained handgrip on digital blood flow (A), platelet-derived growth factor (PDGF) (B) and tissue-plasminogen activator (t-PA) (C) in the subjects with vibration-induced white finger (VWF) and those without symptoms (control). Each point represents the mean±SEM. Paired t-test was used in detecting the difference of the mean. NS, not significant.

次に PDGF を基準変数とし，年齢，Brinkman 指数，収縮期血圧，総コレステロール，HDL-コレステロール，ヘマトクリットを説明変数として重回帰分析を行った．その結果 Brinkman 指数と PDGF に有意な負の相関が見られた (表 2)．

Ⅳ．振動検診受診者に対する疫学的検討

振動検診受診者の一般基礎データを表 3 に，各種血液データおよび指皮膚血流量の値を表 4 に示した．

振動暴露試験による局所血流量，血中 PDGF, t-PA の 3 項目の変化を検討するために，振動暴露前後の平均値の変化を VWF 群と対照群の 2 群に分けて検討した．表 4 に示されているように 3 項目とも振動暴露前の値は 2 群の間で有意な差はなかった．

図 3A, 3B, 3C で，それぞれ局所血流量，PDGF, t-PA の振動暴露前後の平均値を 2 群で比較した．局所血流量では，VWF 群では振動暴露により上昇傾向が認められるものの有意ではなかった．一方，対照群では暴露前後で有意に上昇した．PDGF は VWF 群においては有意に低下したのに対し，対照群では有意に増加した．t-PA は VWF 群においては有意な差がなかったのに対し，対照群では有意に上昇した．

考 察

PDGF には 3 種類のアイソフォームがあり，また PDGF のレセプターも 2 種類のポリペプチドからなり，これらには相同性のある α タイプと β タイプが存在する．アイソフォームとレセプターの組み合わせであるが，AA は $\alpha\alpha$ レセプターに，AB は $\alpha\beta$ レセプターに，BB はすべての組み合わせつまり $\alpha\alpha$, $\alpha\beta$, $\beta\beta$ の 3 種類のレセプターに結合する．また PDGF-AA は平滑筋細胞に対して増殖刺激が弱く，また遊走刺激活性がない[36]．このように PDGF はアイソフォームによって働きが異なるため，血中でのそれらの存在比を明らかにする目的でゲル濾過法および HPLC を用いて PDGF アイソフォームの分離を試みた．

その結果図 2A に示されているように，PDGF-AB と PDGF-BB はそれぞれピークが離れており，フラクション番号が35から37番の所で両者は分離するのではないかと考えられた．そこで PDGF-AB 標準品 100ng と PDGF-BB 標準品 50ng の混合品およびゲル濾過で得たヒト血清のサンプルの凍結乾燥品の 2 種類の試料を注入した場合も，図 2A の結果より 36番を境界として，36番以前を PDGF-BB，それ以降は PDGF-AB が溶出されているのではないかと考えた．PDGF-AB と PDGF-BB の混合品のピークの面積比は，36番を境に前後 1：2.3となり実際に注入した比 1 ： 2 にほぼ近くなり，混合比と面積比がよく一致することが確かめられた．ヒト血清のサンプルの凍結乾燥品の場合では，同様に36番を境に面積比を計算すると PDGF-BB と -AB の比は 1 ：1.92となり，これらの結果よりヒト血清中の PDGF のアイソフォーム比は PDGF-AB が約 65%, PDGF-BB が約 35% であると考えられた．

ヒト血中 PDGF のアイソフォーム比については多くの報告があるが AA がほとんどないことはよく知られている[1)8)~14)]．Heldin らは，HPLC および金属イオンアフィニティクロマトグラフィーを用い，PDGF のアイソフォームを分離し，AB が

70%，残りが BB と報告している[8)13)14)]．今回の著者の結果は Heldin らとほぼ同様なアイソフォーム比が得られた．ただし彼らの分離方法はカラムの安定性や溶出液の組成の複雑さ，操作の煩雑性など技術的に困難な面が多い．したがって著者の方法は個々の症例における PDGF アイソフォームの存在比を知る上で，より簡便な方法として有用な手法であり，またそれぞれのアイソフォームの生理的意義の解明にも役立つと考えられた．

今回，健常人に対し PDGF を測定し，動脈硬化の危険因子とされる高脂血症，高血圧症や糖尿病などの疾病，および喫煙と PDGF との関係を検討した結果，総コレステロールと PDGF に正の相関が見られたこと以外，動脈硬化症と PDGF との関連を示す証拠を得ることができなかった．PDGF の動脈硬化への関与は，動脈硬化巣に PDGF の m-RNA 発現が認められる[37)]など，PDGF が動脈硬化の成因に深く関わっている知見が報告されている．このように動脈硬化の進展に対する PDGF の機能的な関与は明らかにされつつあるが，平滑筋細胞の増殖に必要な PDGF は，その量的な問題[38)]よりも，PDGF が作用する血管平滑筋細胞の表現型により違いがあるとされる．血管平滑筋細胞は，通常は収縮型であるが，動脈硬化発生時には合成型に表現型を変えて液性因子，増殖因子に反応し，内膜に遊走し増殖する[15)]．したがって同じ PDGF 濃度でも生物的効果は健常人と動脈硬化を有する者では異なる可能性があり，PDGF と動脈硬化の関係を疫学的な量－反応関係として一元的に説明できないという本結果の理由がここにあると考えられる．実際，脳卒中患者の PDGF 濃度を測定したところ，動脈硬化の程度を反映していないとする報告[39)]も本結果によく一致している．

次に振動工具使用者に対する振動暴露試験の液性因子に及ぼす影響を検討してみた．振動に繰り返し暴露されると，局所の動脈の内膜肥厚，内腔閉塞などの器質的変化を起こすことが報告[22)]されており，振動暴露が引き起こす動脈内膜肥厚に血中 PDGF が何らかの関与をしているのではないかと予想された．成績で示した通り，PDGF の値は振動暴露前の安静時には，VWF 群と対照群の間に有意な差は見られなかったにも関わらず，暴露に対する反応はまったく異なり VWF 群では暴露後有意に低下したのに対し，正常群では有意に増加した．その結果に対して，手腕振動暴露中に PDGF が内皮細胞から放出される機序を図4の如く考えた．PDGF は内皮細胞もしくは血小板に蓄えられていて，振動による傷害が加わる度に放出され再分泌される．健常群である対照群では内皮細胞の傷害が起きていないため PDGF 放出後速やかに PDGF の再分泌が起きる．そのため暴露後 PDGF の増加がみられる．一方，振動傷害が進むにしたがって内皮細胞が傷害されると考えられるので[20)]，蓄えられる PDGF の総量は低下する．また放出後の PDGF の再分泌の速度も低下するため，一定時間に放出できる PDGF の総量は減少する．すなわち VWF 発作を起こすほど内皮細胞の傷害が進行すると，PDGF の合成・再分泌が低下しその結果放出も低下すると考えた．5分間の手腕振動暴露後の PDGF 濃度の低下が観察された大きな理由は以上のためと推察した．局所振動暴露直後の刺激近傍部位の静脈からの液性因子の変化は局所の変化を示しているとされており[19)]，本実験でも刺激部位の肘静脈から採血を行っており手腕振動暴露による PDGF の値の変化は局所の状態を反映していると考えた．この考察は PDGF は血中消失速度が極めて速く半減期が約2分であること[40)]にもよく一致する．以上より繰り返しの局所振動暴露は刺激部位のPDGF の放出をもたらし，その PDGF は局所の血管に作用し器質的変化をもたらすと考えられた．

また t-PA についての今回の実験結果は，振動負荷により対照群では増加し，VWF 群では増加しなかった．t-PA は血管内皮から産生され，フィブリンを溶解させ強力な血栓溶解作用をおこし，かつ血小板凝集能を低下させる役割を持つ[41)]ので，t-PA が血液中に増加していれば線溶系活性化による抗凝固状

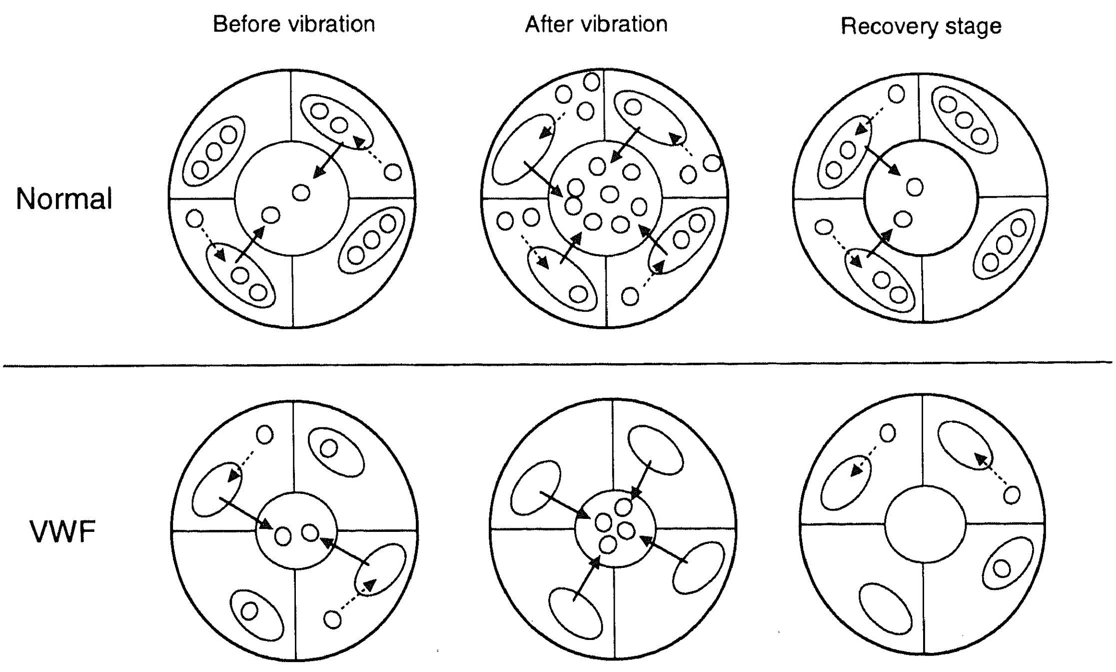


Fig. 4.　Scheme of release and reaccumulation of platelet-derived growth factor (PDGF) by vibration exposure in local vessels. ○, PDGF ; ⬭, endothelial cell ; ⟶, release ; ┈►, reaccumulation.

態が考えられる．先に振動障害者の全血粘度は上昇していると述べたが，この原因として振動により産生された血栓が血中 t-PA の低下により，血栓が溶解しにくくなっているものと考えられる．

振動暴露による指皮膚血流の変化およびその機序については様々な報告がある．Welsh は手腕振動により血管は収縮し，指血流量は減少すると報告している[42]．一方，麻酔や神経除去した場合は血流量が増加するとの報告もある[43][44]．振動暴露がもたらす血流量の変化とその機序については，これまでの報告から軸索を介する血管収縮反応[45]と局所性の何らかの因子，例えばプロスタサイクリンや内皮細胞由来血管拡張因子などが関与する局所血管拡張反応[46]の2要因が考えられる．今回の著者の結果では，局所血流量は振動暴露開始2分から3分後まで低下し続け，その後回復，上昇傾向に転じた．さらに暴露直前値と暴露後を比較すると，対照群では有意に上昇した．一方，VWF 群では振動暴露により上昇傾向が認められるものの有意ではなかった．対照群でこのような結果が得られた機序として，振動暴露開始の最初の1分から2分間は血管収縮反応により血流量は低下するがやがて最低レベルに達し，次に局所の血管拡張反応による血流増加の影響がより大きくなるためと考えられた．これは Greenstein ら[41]が，対照群に対し1分間の振動暴露では血流量が低下したのに対し，3分間の暴露の場合は血流量が増加したとの結果と一致する．また VWF 群で有意な増加が認められなかったのは，先に述べたように血管内皮細胞が傷害されたために局所性因子の放出が阻害され[19]，血管が拡張しにくくなっているためと考えた．

最後に本実験に用いた加速度 50m/sec^2，周波数 120Hz の振動負荷条件は，現実に使用されている振動工具の加振力より若干大きい．このように幾分大きな振動負荷を用いた理由は，正常人と VWF 患者における振動負荷での液性因子の変化の差異がより大きくなるようにするためである．日常の振動工具使用においては異常がなくても，本実験の振動暴露条件により液性因子の変化が観察されれば，潜在的な VWF 患者であることも考えられる．ゆえにこの振動暴露実験は正常者と VWF 患者とのスクリーニングの検査法として活用できる可能性があることが示唆された．

結　論

PDGF のヒト血中での存在形式を明らかにするためにゲル濾過法および HPLC を用いて，PDGF のアイソフォームの分離を試みた．次に PDGF の測定意義を検討するために，一般健常人の PDGF 値と一般健康診断項目との関係を疫学的に解析した．また VWF の発現機序を解明するために，振動工具使用者に対し手腕振動暴露試験前後の PDGF 値の変化を調べ次のような知見を得た．

1．ゲル濾過法および HPLC を用いてヒト血清から PDGF を分離した．その結果ヒト血清中の PDGF のアイソフォーム比は PDGF-AB が約 65%，PDGF-BB が約 35% であった．

2．健常人182名を対象に一般健康診断項目および血中 PDGF 値を測定した． PDGF と動脈硬化症の発生機序を一元的に説明できる結果は得られなかった．

3．振動検診受診者15名（対照群8名，VWF 群7名）につき1回の手腕振動暴露前後の血中 PDGF 値の変化につき検討した結果，対照群では振動負荷後血中 PDGF 値は有意に上昇したが，VWF 群では負荷後有意に低下した．VWF の発現機序の一つとして繰り返しの振動暴露が引き起こす刺激部位における PDGF の放出が，局所の血管に作用し器質的変化をもたらすのではないかと示唆された．

謝　辞

稿を終えるにあたり，御指導と御校閲を賜りました恩師岡田　晃金沢大学長に謹んで謝意を表します．また御懇切な御校閲を賜りました生化学第一講座の福田龍二教授に深謝いたします．本研究の遂行にあたり直接の御指導と御校閲を戴きました公衆衛生学講座の中村裕之助教授に深謝し，御協力下さいました同教室員各位に厚くお礼申し上げます．

なお，本論文の要旨の一部は第4回日本疫学会総会（仙台，1994），第64回日本衛生学会総会（金沢，1994），Stockholm Workshop 94, Hand-Arm Vibration Syndrome: Diagnostics and Quantitative Relationships to Exposure (Stockholm, 1994) において発表した．

文　献

1) **Ross, R.**: Platelet-derived growth factor. Lancet, **8648**, 1179-1182 (1989).

2) **Ross, R., Raines, E. W. & Bowen-Pope, D. F.**: The biology of platelet-derived growth factor. Cell, **46**, 155-169 (1986).

3) **Kazlauskas, A., Bowen-Pope, D., Seifert, R., Hart, C. H. & Cooper, J. A.**: Different effects of homo- and heterodimers of platelet-derived growth factor A and B chains on human and mouse fibroblasts. EMBO J., **7**, 3727-3735 (1988).

4) **Grotendorst, G. R., Igarashi, A., Larson, R., Soma, Y. & Charette, M.**: Differential binding, biological and biochemical actions of recombinant PDGF AA, AB, and BB molecules on connective tissue cells. J. Cell. Physiol., **149**, 235-243 (1991).

5) **Heldin, C. -H., Bäckström, G., Östman, A., Hammacher, A., Rönnstrand, L., Rubin, K., Nistér, M. & Westermark, B.**: Binding of different dimeric forms of PDGF to human fibroblasts: evidence for two separate receptor types. EMBO J., **7**, 1387-1393 (1988).

6) **Matsui, T., Pierce, J. H., Fleming, T. P., Greenberger, J. S., LaRochelle, W. J., Ruggiero, M. & Aaronson, S. A.**: Independent expression of human α or β platelet-derived growth factor receptor cDNAs in a naive hematopoietic cell leads to functional coupling with mitogenic and chemotactic signaling pathways. Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A., **86**, 8314-8318 (1989).

7) **Stroobant, P. & Waterfield, M. D.**: Purification and properties of porcine platelet-derived growth factor. EMBO J., **3**, 2963-2967 (1984).

8) **Hammacher, A., Hellman, U., Johnsson, A., Östman, A., Gunnarsson, K., Westermark, B., Wasteson, Å. & Heldin, C. -H.**: A major part of platelet-derived growth factor purified from human platelets is a heterodimer of one A and one B chain. J. Biol. Chem., **263**, 16493-16498 (1988).

9) **Antoniades, H. N.**: Human platelet-derived growth factor (PDGF): purification of PDGF-I and PDGF-II and separation of their reduced subunits. Proc. Nat. Acad. Sci.

U. S. A., **78**, 7314-7317 (1981).

10) **Heldin, C. -H., Westermark, B. & Wasteson, Å.**: Platelet-derived growth factor: isolation by large-scale procedure and analysis of subunit composition. Biochem. J., **193**, 907-913 (1981).

11) **Deuel, T. F., Huang, J. S., Proffitt, R. T., Baenziger, J. U., Chang, D. & Kennedy, B. B.**: Human platelet-derived growth factor: purification and resolution into two active protein fractions. J. Biol. Chem., **256**, 8896-8899 (1981).

12) **Raines, E. W. & Ross, R.**: Platelet-derived growth factor: I. High yield purification and evidence for multiple forms. J. Biol. Chem., **257**, 5154-5160 (1982).

13) **Heldin, C. -H., Johnsson, A., Wennergren, S., Wernstedt, C., Betsholtz, C. & Westermark, B.**: A human osteosarcoma cell line secretes a growth factor structurally related to a homodimer of PDGF A-chains. Nature, **319**, 511-514 (1986).

14) **Johnsson, A., Heldin, C. -H., Westermark, B. & Wasteson, Å.**: Platelet-derived growth factor: Identification of constituent polypeptide chains. Biochem. Biophys. Res. Commun., **104**, 66-74 (1982).

15) **Ross, R.**: The pathogenesis of atherosclerosis —an update. N. Engl. J. Med., **314**, 488-500 (1986).

16) **Ogawa, H., Yasue, H., Misumi, I., Masuda, T., Okumura, K., Bannai, S., Takanashi, N. & Tsukada, Y.**: Plasma platelet-derived growth factor levels in coronary circulation in unstable angina pectoris. Am. J. Cardiol., **69**, 453-456 (1992).

17) **Tahara, A., Yasuda, M., Itagane, H., Toda, I., Teragaki, M., Akioka, K., Oku, H., Takeuchi, K., Takeda, T., Bannai, S., Takanashi, N. & Tsukada, H.**: Plasma levels of platelet-derived growth factor in normal subjects and patients with ischemic heart disease. Am. Heart J., **122**, 986-992 (1991).

18) **Bath, P. M. W. & Martin, J. F.**: Serum platelet-derived growth factor and endothelin concentrations in human hypercholesterolaemia. J. Intern. Med., **230**, 313-317 (1991).

19) **Okada, A.**: Pathogenic mechanism of vibration-induced white finger (VWF) —Recent findings and speculation—. *In* A. Okada, W. Taylor & H. Dupuis (eds.), Hand-Arm Vibration, 1st ed., pl-8, Kyoei Press, Kanazawa, 1990.

20) **Gemne, G.**: Pathophysiology and pathogenesis of disorders in workers using hand-held vibrating tools. *In* P. L. Pelmear, W. Taylor & D. E. Wassermann (eds.), Hand-Arm Vibration: A Comprehensive Guide for Occupational Health Professionals, 1st ed., p41-76, Van Nostrand Reinhold, New York, 1992.

21) **Olsen, N.**: Vibration-Induced White Finger —Physical & Clinical Aspects—, 1st ed., pl-26, Legeforeningens Forlag, Copenhagen, 1988.

22) **Okada, A. & Nakamura, H.**: Some features of peripheral circulatory and nervous functions in workers with hand-held vibratory tolls. *In* H. Dupuis, E. Christ, D. J. Sandover, W. Taylor & A. Okada (eds.), Hand-Arm Vibration, 1st ed., p37-60, Hauptverband der Gewerblichen Berufsgenossenschaften, Sankt Augustin, 1992.

23) **Bovenzi, M., Giansante, C., Fiorito, A. & Calabrese, S.**: Relation of haemostatic function, neurovascular impairment, and vibration exposure in workers with different stages of vibration induced white finger. Br. J. Ind. Med., **42**, 253-259 (1985).

24) **Bovenzi, M.**: Vibration white finger, digital blood pressure, and some biochemical findings on workers operating vibrating tools in the engine manufacturing industry. Am. J. Ind. Med., **14**, 575-584 (1988).

25) **Biondi, M. L. & Marasini, B.**: Abnormal platelet aggregation in patients with Raynaud's phenomenon. J. Clin. Pathol., **42**, 716-718 (1989).

26) **金井 泉，金井正光**：臨床検査法提要，第29版，金原出版，東京，1983.

27) **北村元仕，三輪史朗，三輪谷俊夫，狩野恭一，江部 充，高橋正宣**：臨床検査マニュアル，第1版，分光堂，東京，1988.

28) **岡田 晃，鈴木勝巳**：振動障害ー研究動向と診療の実際ー，第1版，277-310 頁，篠原出版，東京，1982.

29) **Gemne, G., Pyykkö, I., Taylor, W. & Pelmear, P. L.**: The Stockholm Workshop scale for the classification of cold-induced Raynaud's phenomenon in the hand-arm vibration syndrome (revision of the Taylor-Palmear scale). Scand. J. Work Environ. Health, **13**, 275-278 (1987).

30) **Rånby, M., Norrman, B. & Wallén, P.**: A sensitive assay for tissue plasminogen activator. Thromb. Res., **27**, 743-749 (1982).

31) **多附勝利，佐藤千恵子，大場 勉，藤田真理子，藤江利枝子，石堂扶美子，嘉瀬智子**：全自動血液凝固測定装置 Model CA-4000 の使用経験．Sysmex Journal, **10**, 18-33 (1987).

32) **阪内佐登子，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).

33) **Bolton, A. E. & Hunter, W. M.**: The labelling of proteins to high specific radioactivities by conjugation to a ^{125}I-containing acylating agent. Biochem. J., **133**, 529-539 (1973).

34) **Nakamura, H., Nohara, S., Nakamura, H. & Okada, A.**: Combined effects of local vibration and noise on peripheral circulatory function. *In* A. Okada & O. Manninen (eds.), Recent Advances in Researches on the Combined Effects of Environmental Factors, 1st ed., p762-781, Kyoei Press, Kanazawa, 1987.

35) **Griffin, M. J.**: Handbook of Human Vibration, 1st ed., p33-36, Academic Press, London, 1990.

36) **Koyama, N., Morisaki, N., Saito, Y. & Yoshida, S.**: Regulatory effects of platelet-derived growth factor-AA homodimer on migration of vascular smooth muscle cells. J. Biol. Chem., **267**, 22806-22812 (1992).

37) **Barrett, T. B. & Benditt, E. P.**: Platelet-derived growth factor gene expression in human atherosclerotic plaques and normal artery wall. Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.

A., 85, 2810-2814 (1988).
38) **Lamb, M. A., Manning, J. E., Reddick, R. L. & Griggs, T. R.**: Smooth muscle cell proliferation in response to endothelial injury in coronary arteries of normal and von Willebrand's disease swine. Arteriosclerosis, 4, 84-90 (1984).
39) **佐々木明徳, 岩本俊彦, 柳川清孝, 参木保至, 深谷修一, 高崎 優**: 動脈硬化性疾患における血漿 PDGF (血小板由来増殖因子) 濃度と血小板活性化マーカーの変動. 動脈硬化, 20, 909-915 (1992).
40) **Bowen-Pope, D. F., Malpass, T. W., Foster, D. M. & Ross, R.**: Platelet-derived growth factor in vivo: levels, activity, and rate of clearance. Blood, 64, 458-469 (1984).
41) **Heptinstall, S., Berridge, D. C. & Judge, H.**: Effects of streptokinase and recombinant tissue plasminogen activator on platelet aggregation in whole blood. Platelets, 1, 177-188 (1990).
42) **Welsh, C. L.**: The effect of vibration on digital blood flow. Br. J. Surg., 67, 708-710 (1980).
43) **Ljung, B. & Sivertsson, R.**: Vibration-induced inhibition of vascular smooth muscle contraction. Blood Vessels, 12, 38-52 (1975).
44) **Greenstein, D. & Kester, R. C.**: Acute vibration —its effect on digital blood flow by central and local mechanisms. Proc. Instn. Mech. Engrs., 206, 105-108 (1992).
45) **Liedtke, A. J. & Schmid, P. G.**: Effect of vibration on total vascular resistance in the forelimb of the dog. J. Appl. Physiol., 26, 95-100 (1969).
46) **Lamontagne, D., Pohl, U. & Busse, R.**: Mechanical deformation of vessel wall and shear stress determine the basal release of endothelium-derived relaxing factor in the intact rabbit coronary vascular bed. Circ, Res., 70, 123-130 (1992).

Basic and Epidemiologic Study on Human Platelet-Derived Growth Factor (PDGF) Masami Yoshida, Department of Public Health, School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920 — J. Juzen Med Soc., **103,** 811—820 (1994)

Key words atherosclerosis, gel chromatography, high performance liquid chromatography (HPLC), platelet-derived growth factor, vibration-induced white finger (VWF)

Abstract

Platelet-derived growth factor (PDGF), a potent mitogen, is a dimeric protein composed of A-and B-chains. In order to determine the ratio of PDGF isoforms, purification and analysis of PDGF from human serum was performed by gel chromatography and high performance liquid chromatography (HPLC). The percentage of PDGF-AB heterodimer and PDGF-BB homodimer in human serum was 65% and 35%, respectively. To reveal the role of PDGF in atherosclerosis, the author examined PDGF and other health indicators in 182 persons who had not taken any medications. No significant relationship was found between PDGF and other risk factors of atherosclerosis except for the total cholesterol level. Vibration-induced white finger (VWF) is one of the typical features seen in workers exposed to hand-arm vibration, although the pathophysiology of VWF remains to be elucidated. The changes of PDGF level induced by the vibration exposure test were investigated in chain-saw workers who receive special medical examinations for vibratory tool users on an annual basis. The vibration exposure decreased serum PDGF level significantly in VWF group, whereas it increased the level in the control group of almost the same distribution of age and vibration exposure period. Repetitive release of PDGF in local vessels in response to vibration exposure may lead to the development of VWF. The vibration exposure test may be useful for screening VWF in workers.