

頻度の ITP における感度は 91%、特異度は 100%であった。

ITP47 例中 4 例が 20 個/10⁶PBMC をカットオフ値とすると陰性と判定された。これら 4 例において血小板溶出液および血漿中の抗 GPIIb-IIIa 抗体を調べたところ、

いずれも陰性であった。それに対し、ランダムに選んだ ELISPOT 法で陽性と判定された 10 例のうち、血小板溶出液、血漿中の抗 GPIIb-IIIa 抗体が検出された症例は、それぞれ 8 例、2 例であった。

表 1. 各種条件下で ELISPOT により得られたスポット数*

	GPIIb-IIIa			BSA	
	PBMC	CD19 ⁺ PBMC [†]	CD3 ⁺ PBMC [†]	PBMC	
ITP 患者					
SN		72	5	84	3
YI	26	3		71	0
ON		216	11	188	4
OA		189	5	197	1
NH		128	14	110	0
健常人					
MK		4	2	3	0
FT		1	3	1	2
HK		2	0	0	0
AT		2	2	1	1
HT		1	0	1	0

*10 ウェルの合計を示す。

[†]CD19⁺または CD3⁺細胞の除去後に細胞数の補正は行っていない。

表 2. 抗 GPIIb-IIIa 抗体産生 B 細胞頻度の ITP、ITP 以外の血小板減少症、健常人における陽性頻度

	症例数	陽性数	陽性頻度
ITP	47	43	91 %
ITP 以外の血小板減少症	18	0	0 %
健常人	50	0	0 %

カットオフを 20/10⁶末梢血単核球とした。

D. 考 察

臨床の場で現在オーダーできる ITP に特異的な臨床検査はない。ITP (特に慢性型) は血小板に対する自己抗体により誘導される自己免疫疾患であることから、抗血小板抗体の検出が診断に有用と考えられる。この点に関しては、重症筋無力症では抗アセチルコリンリセプター抗体、バセドウ病では抗 TSH リセプター抗体の測定が特異的な検査法としてすでに臨床で広く用いられていることから明らかである。抗血小板抗体の検出法として、これまで厚生省の診断基準にも含まれている血小板結合性 IgG (PAIgG) が広く用いられてきた。ただし、PAIgGには血小板膜表面の抗原を認識して結合している抗体 (抗血小板抗体) 以外の非特異的な抗体も含まれ、ITP 以外の血小板減少症や自己免疫性甲状腺疾患でも高値となる⁵⁾。そのため、ITP における感度は高いものの、疾患特異性は低い。固相化したモノクローナル抗体を用いた antigen-capture ELISA、イムノビーズ法などにより GPIIb-IIIa などの血小板膜抗原に対する特異抗体を検出する方法が特異性の面では優れている⁶⁾。ただし、これらアッセイ法では血小板膜抗原に対するモノクローナル抗体を用いるために、用いる抗体のクローンにより結果が異なり、標準化が困難である。また、病的活性をもつ抗血小板抗体のほとんどは流血中で血小板膜表面に結合しているため、抗体の検出には血清や血漿よりも血小板溶出抗体を用いる必要がある。そのため、血小板減少症患者では検査に必要な血液量が増え、操作も煩雑なために、現時点では普及していない。それに対して、今回我々が確立した抗 GPIIb-IIIa 抗体産生 B 細胞を検出する ELISPOT 法は、これら従来の手法に比べて優れている点が多い。まず、ITP における感度は 91%、特異性は 100%であり、この成績は血小板溶出液を用いた特異抗体の測定法に比べて、感度は高く、特異度は同等である。また、ELISPOT 法は非常に簡便な手法であり、精製抗原さえあれば特別な装置を必要とせず、一般検

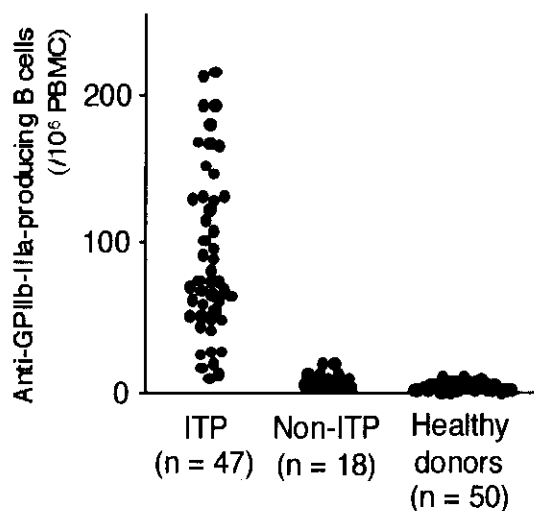


図1. ELISPOT法により測定した末梢血単核球中における抗GPIIb-IIIa抗体産生B細胞頻度。

査室でも簡単に行うことができる。さらに、検査に必要な血液量も 2-3 ml で十分であり、8時間あれば結果も得られる。

今回検討した ITP47 例のうち 4 例は ELISPOT 法で陰性と判定された。カットオフ値の設定の問題もあるが、これらの症例では GPIb-IX や GPV など GPIIb-IIIa 以外の血小板膜抗原に対する自己抗体が病態と関わっている可能性がある。そのため、GPIIb-IIIa に加えて他の血小板膜抗原を用いることにより、本検査法の感度の向上が可能と思われる。

本検査法では原理的に GPIIb-IIIa に対するアロ抗体を産生する B 細胞も検出される可能性が高い。血小板減少症を有する患者では血小板輸血を受ける機会が多く、それらの患者では GPIIb-IIIa に対するアロ抗体が存在する可能性がある。そのような症例では、スポット数が見かけ上多くなり、偽陽性の結果が得られる危険がある。今回検討した ITP、MDS 患者において、血小板輸血歴の有無で層別化し、抗 GPIIb-IIIa 抗体産生 B 細胞頻度を比較したところ 2 群間で有意な差は得られなかった。したがって、GPIIb-IIIa に対するアロ抗体を産生する B 細胞の頻度は GPIIb-IIIa に対する自己抗体を産生する B 細胞に比べて少ないと推測される。ただし、ITP 以外の血小板減少症患者、特に頻回に血小板輸血を受けた MDS 患者におけるアロ抗体の影響を明らかにす

おけるアロ抗体の影響を明らかにするためには、今後の多数例を用いた検討が必要である。

今回はヒト血小板からアフィニティーで精製した GPIIb-IIIa を ELISPOT 法の抗原として用いたが、今度の標準化のためには GPIIb-IIIa のリコンビナント蛋白の使用が必須である。ITP 患者において抗血小板抗体活性を有する抗 GPIIb-IIIa 抗体の多くは GPIIb と GPIIIa により構成される高次構造を認識することが報告されており⁷⁾、バキュロウイルスのシステムなどを利用した有核細胞での GPIIb-IIIa の発現が必要と考えられる。

最近、血小板回転の簡便な指標である網状血小板の上昇⁸⁾や血清 TPO 値の軽度の上昇⁹⁾が ITP の診断に有用であることが示されている。そこで、ELISPOT 法による抗 GPIIb-IIIa 抗体産生 B 細胞の検出に加えて、これら検査項目を組み合わせることで、積極的な ITP の診断のための基準の作成が可能と考えられる。今後、多数例でこれらのデータを集積し、ITP の診断基準の試案を作成する予定である。

E. 結 論

ELISPOT 法により抗 GPIIb-IIIa 抗体産生 B 細胞を検出するアッセイ法を確立した。末梢血中における抗 GPIIb-IIIa 抗体産生 B 細胞頻度の増加は ITP 患者に高頻度にみられる特異的な検査所見であり、ITP の診断に有用であることが示された。

参考文献

- 1) 蔵本淳: 厚生省特定疾患特発性造血障害調査研究班平成二年度研究業績報告書, 1990, p59
- 2) George JN, Woolf SH, Raskob GE, et al: Idiopathic thrombocytopenic purpura: A practice guideline developed by explicit methods for the American Society of Hematology. *Blood* 1996; 88: 3-40.
- 3) Nishifuji K, Amagai M, Kuwana M, et al: Detection of antigen-specific B cells in patients with pemphigus vulgaris by enzyme-linked immunospot assay: Requirement of T cell collaboration for autoantibody production. *J Invest Dermatol* 2000; 114: 88-94.
- 4) Hürlmann-Forster M, Steiner B, von Felten A. Quantitation of platelet-specific autoantibodies in platelet eluates of ITP patients measured by a novel ELISA using purified glycoprotein complexes GPIIb/IIIa and GPIb/IX as antigens. *Br J Haematol* 1997; 98: 328-335.
- 5) 倉田義之: 特発性血小板減少性紫斑病の診断・鑑別診断. *日常診療と血液* 1998; 8: 1504-1511.
- 6) Berchtold P, Müller D, Beardsley D, et al: International study to compare antigen-specific methods used for the measurement of antiplatelet autoantibodies. *Br J Haematol* 1997; 96: 477-483.
- 7) Fujisawa K, Tani P, McMillan R. Platelet-associated antibody to glycoprotein IIb/IIIa from chronic immune thrombocytopenic purpura patients often binds to divalent cation-dependent antigens. *Blood* 1993; 81: 1284-1289.
- 8) Takubo T, Yamane T, Hino M, et al: Usefulness of determining reticulated and large platelets in idiopathic thrombocytopenic purpura. *Acta Haematol* 1998; 99: 109-110.
- 9) Kosugi S, Kurata Y, Tomiyama Y, et al: Circulating thrombopoietin level in chronic thrombocytopenic purpura. *Br J Haematol* 1996; 93: 704-706.

F. 研究発表

論文発表

1. 桑名正隆、池田康夫: ITP の病態における自己反応性 T 細胞の役割と免疫療法への応用. *臨床血液* 2000; 41: 454-457.
2. 桑名正隆、河上裕、池田康夫: 特発性血小板減少性紫斑病における病因的自己反応性 T 細胞の同定. *日本臨床免疫学会雑誌* 2000; 23: 555-557.
3. Kuwana M, Kaburaki J, Pandey JP, Murata M, Kawakami Y, Inoko H, Ikeda Y. HLA class II alleles in Japanese patients with immune thrombocytopenic purpura: associations with anti-platelet glycoprotein antibodies and responses to splenectomy. *Tissue Antigens* 2000; 56: 337-343.

学会発表

- 1) 鏑木淳一、桑名正隆、池田康夫: 抗リン脂質抗体陽性の特発性血小板減少性紫斑病(ITP)における臨床特徴. 第44回日本リウマチ学会総会(横浜). 2000年5月
- 2) 桑名正隆、河上裕、池田康夫: 特発性血小板減少性紫斑病(ITP)における病因的

自己反応性 T 細胞の同定. 第 28 回日本
臨床免疫学会総会(東京). 2000 年 9 月

- 3) 桑名正隆、河上裕、池田康夫: 免疫血液
疾患研究の進歩と現状; 特発性血小板
減少性紫斑病. 第 47 回日本臨床病理学
会総会(福島). 2000 年 11 月

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

「血小板減少症の診断用キット」

出願番号: 特願 2000-316269

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

フォンビルブランド 因子特異的プロテアーゼの欠損による 血栓性疾患の病態解析に関する研究 (分担) 研究者 藤村 吉博 奈良県立医科大学 輸血部

研究要旨

造血幹細胞移植術(SCT)後の肝中心静脈閉塞症(VOD)や血栓性血小板減少性紫斑病(TTP)は致命的疾患であるが、その病態生理は不明で有効な治療法は確立されていない。私は、SCT 後のこれらの血栓性疾患において、von Willebrand 因子特異的切断酵素(vWF-CPase) 活性を測定した。まず小児患者群において、SCT 後に VOD を合併した 7 例と、非合併 7 例について移植前から 1 週毎に移植後 4 週まで vWF-CPase 活性を測定した。その結果、VOD 合併例においては、移植前を含め全てのポイントで酵素活性が有意に低下していた。また、前記とは別の成人患者群でも SCT 後 VOD を疑われた 6 例では、全ての症例で vWF-CPase 活性は 40%以下に低下していた。また、VOD 合併例全ての症例で、vWF-CPase に対するインヒビターは認めなかった。次に、SCT 後 TTP を合併した 4 例中、3 例において vWF-CPase 活性の低下を認め、うち活性著減の 1 例ではこの酵素活性に対する高力価 IgG 型インヒビターの存在が確認された。2 例にはインヒビターは検出できなかった。また、4 例目の TTP 症例では酵素活性は正常であった。以上のことより、SCT 後の VOD や TTP において、vWF-CPase 活性とそのインヒビターの測定は、治療方針を決定する上で必須の検査であると考えられた。

A. 研究目的

骨髄移植、末梢血幹細胞移植、臍帯血移植といった SCT は、確立した治療法として急速に広がりつつあるが、GVHD、VOD、TTP 等の移植後の致命的合併症はの問題は依然として残っている。SCT 後に合併する VOD は、移植後 30 日以内に黄疸、有痛性肝腫大、腹水等の症状を認める疾患であるが、その発症頻度は 6-53%と施設によって大きなばらつきがあり、死亡率も 21-53%と報告されている。肝内細静脈の血栓性閉塞によっておこるとされているが、その病態生理は不明な点が多く、適切な治療法や予防法は確立されていない。

一方、骨髄移植後の TTP(BMT-TTP)は、同種移植で 14%、自家移植で 7%の頻度でおこるとされ、古典的 TTP と同様の臨床症状であるが、一般的に血漿交換が無効であることが報告されている。一方、最近 Furlan らによって、古典的 TTP 患者において、vWF-CPase 活性が低下しており、その原因として本酵素に対する自己抗体の発生が明らかにされた。その後 von der Plas らは、BMT-TTP 患者においては vWF-CPase 活性は正常であり、古典的

-CPase 活性は正常であり、古典的 TTP とは異なることを報告している。

私は昨年、先天性の慢性反復性血栓性血小板減少症で少量の血漿輸注で血小板減少が改善することを特徴とする Upshaw-Shulman 症候群(USS)の病因として、vWF-CPase の先天的欠損であることを報告した。本年度は後天的血栓症として SCT 後の VOD と TTP のそれぞれの合併例において、vWF-CPase 活性を測定し、その病態解析を通じて、治療法や予防法の確立を目的とする。

B. 研究方法

VOD に関して、小児患者群として BMT 後に VOD を合併した 7 例と非合併例 7 例において、移植前から day 28 まで 1 週間ごとに、レトロスペクティブに vWF-CPase 活性を測定した。また、成人患者群として SCT 後に VOD を疑われた 6 症例において、1 ポイントのみであるが本酵素活性を測定した。TTP に関しては、SCT 後に TTP を合併した 4 症例において、vWF-CPase 活性を測定した。また、これら全症例において、vWF-CPase に対す

全症例において、vWF-CPase に対するインヒビターを検索した。

vWF-CPase 活性の測定方法として Furlan ら(Blood 87:4223-4234, 1996)の方法を一部改変して行った。すなわち、1.5M 尿素と 10 mM Ba²⁺ 存在下に、精製 vWF と被検または希釈正常血漿を混じ、37°C、24 時間酵素反応後、SDS アガロースゲル電気泳動解析にて測定した。インヒビターの測定は、被検血漿を 56°C、30 分で非動化し、正常血漿と等量混合して 37°C、2 時間附置後、前記の方法で酵素活性を測定した。酵素活性の 50% 阻害を 1 Bethesda 単位とした。

(倫理面への配慮)

本検査は、主治医より十分な説明を行い、同意を得て施行した。

C. 研究結果

BMT 後に VOD を合併した 7 症例においては、非合併例に比べ、移植前(34±20% vs 69±17%)を含めたすべてのポイントで有意に vWF-CPase 活性は低下していた。特にその傾向は day28 において顕著であった(12±4% vs 79±21%)。また、SCT 後に VOD を疑われた 6 症例の本酵素活性は、すべて約 40% 以下と低下していた。全例でインヒビターは存在しなかった。SCT 後に TTP を合併した 4 症例において、3 例に vWF-CPase の低下を認め、そのうち活性が 3% 未満と著明に低下していた 1 例では、100 Bethesda U/ml 以上の高力価のインヒビターの存在が認められた。残りの 1 例では、酵素活性は正常であった。

D. 考察

SCT 後の VOD においては、移植前より有意に vWF-CPase 活性が低下していることより、移植前に本酵素活性を測定することにより VOD 発症予測が可能である。また、VOD ではインヒビターが存在せず vWF-CPase 活性が低下していることより、FFP の輸注によって、VOD の発症予防、治療が可能であると思われる。

SCT 後の TTP は、従来から報告されてい

る vWF-CPase 活性が正常であるもの以外に、酵素活性が低下している症例も存在することが判明した。特に酵素活性が著明に低下していた症例は、高力価のインヒビターが存在し、古典的 TTP と同様の病態であることが示唆された。このような症例においては血漿交換が絶対的に有用であると考えられた。

E. 結論

vWF-CPase 活性の測定は、VOD の診断のみならず SCT 前における VOD の発症予測に有用であり、本酵素の低下が判明すれば、本酵素を補充するために積極的に FFP を投与すべきであると考えられた。また、SCT 後の TTP においては、従来報告されているタイプ以外のもも存在し、治療方針を決定する上でも、vWF-CPase 活性の測定とインヒビターの検索は必須の検査であると考えられた。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 八木秀男、藤村吉博：血栓性血小板減少性紫斑病/溶血性尿毒症症候群-病態の鍵を握る新しい因子-. *medicina* 37 : 731-734, 2000.
- 2) 松本雅則、藤村吉博：血栓性血小板減少性紫斑病と von Willebrand 因子特異的切断酵素. *日本内科学会雑誌* 89 : 85-90, 2000.
- 3) 松本雅則、八木秀男、藤村吉博：抗血小板剤と TTP. *血液・腫瘍科* 41 : 238-244, 2000.
- 4) Seiji Kinoshita, et al. Upshaw-Schulman syndrome revisited: A concept of congenital thrombotic thrombocytopenic purpura. *International Journal of hematology* (in press)
- 5) Hideo Yagi, et al. Enhanced low shear stress induced platelet aggregation by Shiga-like toxin 1 purified from *Escherichia coli* O157 *American Journal of Hematology* 66:105-115, 2001
- 6) Hideo Takatsuka, et al. Molecular characterization of L-amino acid oxidase from *Agkistrodon halys blomhoffii* with special

reference to platelet aggregation. *Biochimica et Biophysica Acta* 1544: 267-277, 2001

2. 学会発表

- 1) Yong-Dong Park, et al. Impaired activity of plasminogen activator-cleaving protease in patient with hepatic veno-occlusive disease after bone marrow transplantation. The 42th Annual Meeting of The American Society of Hematology, San Francisco, USA, 2000.12.5.
- 2) Hideo Yagi, et al. Plasmas with Upshaw-Schulman syndrome, a congenital deficiency of von Willebrand factor-cleaving protease, augment the aggregation of normal washed platelets under high-shear stress. The 42th Annual Meeting of The American Society of Hematology, San Francisco, USA, 2000.12.6.
- 3) Masanori Matsumoto, et al. Liver transplantation rescues a deficient state of von Willebrand factor-cleaving protease activity in patients with liver cirrhosis due to congenital biliary atresia. The 42th Annual Meeting of The American Society of Hematology, San Francisco, USA, 2000.12.6.
- 4) 岡野晃、他. 非血縁者間骨髄移植後に vWF 特異的切断酵素活性の著明な低下を認め VOD が疑われた ALL(L2) の一例. 第 23 回日本造血細胞移植学会総会、京都、2000.12.9.
- 5) 八木秀男、他. Upshaw-Schulman 症候群患者血漿による正常ヒト洗浄血小板の高ずり応力惹起血小板凝集補性能. 第 42 回日本臨床血液学会総会、倉敷、2000.11.9.
- 6) 八木秀男、他. vWF 特異的切断酵素インヒビターを検出したチクロピジン TTP. 第 23 回日本血栓止血学会学術集会、名古屋、2000.11.21
- 7) 森美貴、他. TTP 患者の臨床経過と vWF 特異的切断酵素活性. 第 23 回日本血栓止血学会学術集会、名古屋、2000.11.21.
- 8) 松本雅則、他. 生体部分肝移植例での vWF 特異的切断酵素活性の変化. 第 23 回日本血栓止血学会学術集会、名古屋、2000.11.21.
- 9) 石指宏通、他. 運動負荷前後における vWF と vWF 特異的切断酵素. 第 23 回日本血栓止血学会学術集会、名古屋、2000.11.21.

G. 知的所有権の取得状況 なし

血小板凝集に対するメイラード反応後期生成物 (AGE) の影響

(分担) 研究者 垣下 榮三
兵庫医科大学病院 第2内科

研究要旨

メイラード反応後期生成物 (AGE) の血小板機能に及ぼす影響を明らかにするため、セロトニン及びADP刺激血小板凝集に対するAGEの作用を、レーザー散乱光凝集測定装置を用い測定した。また、糖尿病患者における血小板凝集能とAGEの関連を検討した。AGEはin vitroで血小板凝集を亢進させ、これには何らかのセロトニン受容体を介する伝達系が関与すると想定された。糖尿病患者において血中AGE濃度と血小板凝集の間に正の相関関係が認められた。AGEの血小板凝集に対する亢進作用は老化による血栓傾向の増大や糖尿病における血栓性合併症の発症に関与することが示唆された。

A. 研究目的

メイラード反応後期生成物 Advanced Glycation Endproducts 以下AGEは、生体内において蛋白質とグルコースの非酵素的糖付加反応、いわゆるメイラード反応の終末産物として知られる構造体の総称である。AGEは加齢に伴い増加するが、糖尿病・アルツハイマー病といった病的老化状態においてはさらに蓄積が増加しているとされ、老化関連物質として注目されている。このメイラード反応は前期反応・後期反応の2つの段階に分けられ、前期反応では蛋白のアミノ基 (リジン残基) とグルコースのアルデヒド基が反応し Schiff 塩基が形成され、さらにアマドリ転移生成物など可逆性の前期反応生成物が生じる。これらのうち、アマドリ転移生成物の一つとして発見されたヘモグロビンA_{1c}は、現在糖尿病患者の経過観察に汎用されている。後期反応では、前期反応生成物に酸化・脱水・縮合などの複雑な反応が加わり、非可逆的・褐色化したAGEと呼ばれる構造を持つ物質になる。

AGEの血小板に関する作用は血栓形成性作用と推測され、糖尿病等の血栓性合併症の発症に関与すると想定される。今回我々は、セロトニン及びADP刺激血小板凝集に対するAGEの作用を、レーザー散乱光凝集測定装置を用い測定した。また、低濃度ADP刺激時のAGEによる血小板凝集亢進にもセロトニンが関与している可能性を検討するため、血小板セロトニン受容体

阻害剤であるサルボグレラートを用い検討した。さらに、糖尿病患者においては血栓性合併症とAGEの関連が注目されており、糖尿病患者における血小板機能亢進との関連性についても検討した。

B. 研究方法

1. AGEアルブミンの準備とAGEの測定

AGEは、ヒトアルブミンを250mMグルコースを含むPBSで、8週間・37℃でインキュベートすることにより作成し、ELISAおよび370nm励起440nm検出による蛍光光度の変化によりAGEの生成を確認し定量した。また、対照としてはグルコースを含まないPBSで同じく8週間インキュベートしたヒトアルブミンを用意した。

2. 健常人のセロトニンおよびADP刺激血小板凝集に対するAGEの影響

健常人より3.8%クエン酸ナトリウム10分の1容で抗凝固した全血を80G 10分間遠沈して得たPRP 180 μ lに、8週間インキュベートしたAGEアルブミンもしくは対照のアルブミン20 μ lを加え終濃度を5mg/mlとした。レーザー散乱光凝集測定装置を用いて3分間プレインキュベートした後、セロトニン10 μ MまたはADP1 μ MまたはADP0.5 μ Mを加え、凝集塊生成のピーク値で比較した。

3. 低濃度ADP刺激時の凝集亢進におけるセロトニンの関与の検討

同様に健常人より得たPRPにAGEアル

ブミンを添加し、ADP 0.5 μ M と同時に血小板セロトニン受容体阻害剤である塩酸サルボグレラート 10 μ M を加え凝集塊生成を測定し、サルボグレラート非添加時と比較してセロトニンの関与を検討した。

4. 2型糖尿病患者におけるセロトニン刺激血小板凝集

当院通院中の2型糖尿病患者46名より早朝空腹時に採血して得たPRPに、セロトニン 10 μ M を加えて小凝集塊生成を測定した。また、血中AGE濃度、ヘモグロビンA1c、空腹時血糖値も測定し血小板凝集との関連を検討した。

C. 研究結果

1. AGEの測定

ELISAではAGEの中でもカルボキシメチルリジン (CML) を強く認識する。使用したアルブミンでは3.2mU/mlのCMLが検出され、グルコースを添加してインキュベートしたものは4週間後に98mU/ml、8週間後には700mU/mlに達したがグルコースを加えなかったものでは8週間でもCMLの増加はみとめられなかった。

一方、蛍光光度の測定では、370nm励起440nm検出によりピラリン・クロスリンを検出できる。コントロールのアルブミンに対するAGEアルブミンの蛍光強度比はインキュベート4週間後で2.5倍、8週間後には3.8倍になり時間の経過とともにAGEが増加していることが確認された。

1. セロトニンおよびADP刺激による血小板小凝集塊生成に及ぼすAGEの影響
弱い血小板凝集刺激であるセロトニンにより血小板は一時的に小さな凝集塊を形成する。セロトニン 10 μ M による血小板凝集塊生成は、レーザー散乱光凝集計による小凝集のピーク値の平均で比較すると、コントロールAlb添加時の0.96 \pm 0.16に対してAGE-Alb添加時は1.14 \pm 0.16になり、AGEアルブミンの添加により有意に亢進した。

一方、ADP 1 μ M の刺激では、コントロールAlb添加時でも血小板は大凝集塊を形成してしまい、AGE-Alb添加時との明らかな差異は認められずAGEによる影響は

判然としない。そこで0.5 μ M と低濃度のADPで刺激すると血小板はセロトニン刺激の時と同様に一時的に小凝集塊を形成しその後解離した。小凝集のピーク値の平均で比較すると、コントロールAlb添加時の1.34 \pm 0.10に対してAGE-Alb添加時は1.60 \pm 0.06となり、ADP 0.5 μ M による血小板凝集塊生成もセロトニンの時と同様にAGEアルブミンの添加により有意に亢進した。

3. 低濃度ADP刺激血小板凝集亢進へのセロトニンの関与の検討

AGEアルブミンで3分間プレインキュベートした後、ADP 0.5 μ M と同時にサルボグレラート 10 μ M を添加した時は、小凝集のピーク値の平均で1.30 \pm 0.09となつたのに対してサルボグレラート非添加時は1.54 \pm 0.10であり、AGE-Albによる凝集亢進作用はサルボグレラート添加により抑制された。

一方、対照としてコントロールアルブミンを用い、ADP 0.5 μ M と同時にサルボグレラート 10 μ M を添加した時は、小凝集のピーク値の平均で1.60 \pm 0.12、サルボグレラート非添加時は1.48 \pm 0.13となり、サルボグレラートによる影響は認められなかった。

4. 2型糖尿病患者46名における血小板凝集の亢進とAGE

2型糖尿病患者46名の血小板凝集能はセロトニン 10 μ M による小凝集塊生成のピーク値を以て表した。糖尿病症例では、血小板凝集能は血中AGE濃度と有意に正相関したが、空腹時血糖やヘモグロビンA1cとの相関は無かった。

D. 考察

血小板凝集とAGEの関連について検討し次の結果を得た。

セロトニン 10 μ M およびADP 0.5 μ M による血小板凝集塊生成はAGEアルブミンの添加により有意に亢進した。このAGE-Albによる凝集亢進作用はサルボグレラート添加により抑制された。このことより、低濃度ADPによる小凝集塊生成がAGE添加により亢進した機序の、少なくとも一

部にはセロトニン受容体を介する刺激が関与している可能性があると考えられた。

一方、これまでの報告で、糖尿病症例では血中のセロトニン濃度上昇が存在することが知られており、このことが糖尿病における血栓性合併症と何らかの関連をもつことが想定される。そこで糖尿病症例においてセロトニン凝集と血中AGE濃度との相関を見ると有意な正相関関係が認められた。

一方、AGEと血糖値やヘモグロビンA1cとの相関は無かった。これらの成績も糖尿病患者における血栓性合併症の発症にセロトニンを介したAGEの関与が示唆される。

E. 結 論

AGEはin vitroで血小板凝集を亢進させる作用があり、これには何らかのセロトニン受容体を介する伝達系が関与すると想定さ

れた。

また、糖尿病患者において血中AGE濃度と血小板凝集の間に正の相関関係が認められた。

これらの成績より、AGEの血小板凝集に対する亢進作用は老化による血栓傾向の増大や糖尿病における血栓性合併症の発症に関与することが示唆される。

F. 研究発表

学会発表

長谷川善一, 末廣 謙, 丸茂幹雄, 辻岡 洋, 紺屋浩之, 日笠 聡, 難波光義, 垣下榮三: メイラード反応後期生成物 (AGE) による血小板凝集促進作用. (第 23 回日本血栓止血学会学術集会, 2000 年 11 月 22 日, 名古屋)

**ポジショナルクローニングによる
May-Hegglin anomaly 原因遺伝子の同定
(分担) 研究者 小嶋 哲人
名古屋大学医学部 保健学科**

研究要旨

May-Hegglin 血小板異常症 (MHA) は、巨大血小板、血小板減少症および顆粒球 Döhle 様封入体を 3 主徴とし、常染色体優性遺伝形式をとる血小板異常症で、特発性血小板減少性紫斑病との鑑別や輸血の適応について問題となることがある。本研究ではポジショナルクローニング法によって MHA/Sebastian 症候群の原因遺伝子を nonmuscle myosin heavy chain-A (NMMHCA) 遺伝子(MYH9)と同定し、6 家系で 5 種類の異なる変異を見出した。今後、NMMHCA 蛋白の基本的機能を知ることは血小板および顆粒球生成の理解を深める一助になると考えられる。

A. 研究目的

May-Hegglin anomaly (MHA) は、巨大血小板、血小板減少症および顆粒球 Döhle 様封入体を 3 主徴とするまれな常染色体優性遺伝疾患である。本疾患の病因は長らく不明であったが、生化学的異常が特定されていなかったために機能的解析法による原因遺伝子の同定は不可能であった。われわれは昨年度、全ての常染色体を対象とした連鎖解析によって本疾患の責任遺伝子座を第 22 番染色体長腕(22q12.3-13.2)へマッピングした。第 22 番染色体の全塩基配列が解読され、位置的候補遺伝子検索が可能になり、本疾患の原因遺伝子を non-muscle myosin heavy chain-A (NMMHC-A) 遺伝子(MYH9)と同定した。

B. 研究方法

昨年度連鎖解析を施行した MHA 家系に加え、本年度は新たに 5 家系を追加し MHA とは顆粒球封入体の電顕所見が異なるとされている Sebastian 症候群も解析対象とした。それぞれの家系について遺伝子解析施行についての同意を得た後に末梢血の提供を受けた。

MYH9 のエクソン/イントロン境界領域を含む全ての構造エクソンを PCR 増幅し、その塩基配列を決定した。患者において見出した変異については家系内で疾患表現型との連鎖を確認すると共に正常人 100-170 人において見い出されないことを確認した。

確認した。

白血球および血小板における抗 NMMHCA 抗体を用いた免疫蛍光染色は、末梢血塗沫標本をアセトン処理した後に施行した。

C. 研究結果

昨年度解析した MHA 家系での発端者では、Asp1424 が Asn へと変異していた (D1424N)。D1424N 変異は罹患者全てにヘテロ接合性に認められ、正常人 170 例には検出しなかった。また、他の MHA/Sebastian 症候群症例 5 家系で同様に MYH9 の変異解析を施行したところ 4 種類の異なる変異が見い出された。興味深いことに全ての変異が MYH9 の尾部をコードする領域にあった (図 1)。また、3 種類のミスセンス変異は種を越えて高度に保存されているコドンに起きていた¹³⁾。

異常 NMMHCA 蛋白の血小板および白血球での細胞内局在を解析するために末梢血塗沫標本における抗 NMMHCA 抗体を用いた免疫蛍光染色を施行した。正常顆粒球では NMMHCA は細胞質全体にびまん性に染色されるのに対し、患者顆粒球では封入体同様に顆粒状に染色された。リンパ球での局在は正常と患者で違いは認められなかった。したがって、本疾患に見られる顆粒球封入体は NMMHCA 蛋白の細胞内局在と何らかの関連があることが示唆された。

D. 考 察

われわれが本疾患の責任遺伝子座を第22番染色体長腕(22q12.3-13.2)へマッピングした後、複数のグループによってMHA遺伝子座領域は1Mb以下へと狭められた。この領域に存在する機能遺伝子はおよそ10種類であり、MYH9はnonmuscle myosin heavy chain-A (NMMHCA)をコードし、巨核球および顆粒球に発現しているものであった。

他のグループからの報告においてもMHA/Sebastian症候群ではMYH9遺伝子変異が見い出されている。また、難聴、白内障および腎不全を合併するFechtner症候群においても同様にMYH9遺伝子異常が報告されており、これら疾患はallelic diseaseである事が明らかとなった。変異位置により表現型が規定される可能性が考えられるが、一部の變異(D1424H)についてはSebastian症候群とFechtner症候群双方で見い出されている。今後は症例を集積し病態解析を進めることにより巨大血小板産生と顆粒球封入体形成機序が明らかになることが期待される。さらにNMMHCA蛋白の基本的機能を知ることは血小板および顆粒球生成の理解を深める一助になると考えられる。

E. 結 論

ポジショナルクローニング法によってMHA/Sebastian症候群の原因遺伝子をnonmuscle myosin heavy chain-A (NMMHCA)遺伝子(MYH9)と同定し、6家系で5種類の異なる変異を見い出した。

F. 研究発表

論文発表

1. T. Kojima: Molecular biology of ryudocan, an endothelial heparan sulfate proteo-glycan. *Semin. Thromb Hemost* 26 (1): 67-73, 2000.
2. A. Katsumi, T. Kojima, et al.: Severe Factor VII Deficiency Caused by a Novel Mutation His348 to Gln in the Catalytic Domain. *Thromb Haemost* 83 (2): 239-243, 2000
3. K. Ishiguro, T. Kojima, et al.: Syndecan-4 Deficiency Impairs Focal Adhesion Formation Only under Restricted Conditions. *J Biol Chem* 275 (8), 5249-5252, 2000
4. K. Iba, T. Kojima, et al.: The cysteine-rich domain of human ADAM12 supports cell adhesion through syndecans and triggers signaling events that leads to b1-dependent cell spreading. *J Cell Biol* 149 (5): 1143-1155, 2000.
5. M. Sakata, T. Kojima, et al.: Ryudocan expression by luteinized granulosa cells is associated with the process of follicle atresia. *Fertil Steril* 74 (6): 1208-1214, 2000
6. K. Ishiguro, T. Kojima, et al.: Complete antithrombin deficiency in mice results in embryonic lethality. *J Clin Invest* 106 (7): 873-878, 2000.
7. Y. Nakayama, T. Kojima, et al.: Cloning and Characterization of the Murine Anti-thrombin Gene. *Thromb Res* 100 (3): 179-183, 2000.
8. T. Shimokawa, T. Kojima, et al.: Down-regulation of murine tissue factor pathway inhibitor mRNA by endotoxin and tumor necrosis factor- α in vitro and in vivo.

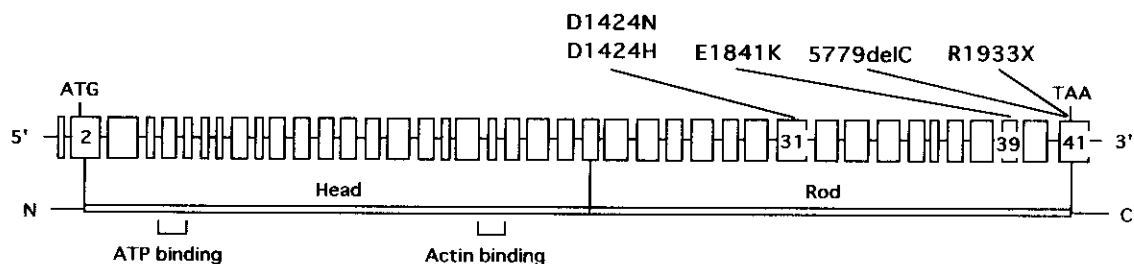


図1 MYH9 遺伝子構造と患者で見い出された変異

MYH9 遺伝子はおよそ105kbで41のエクソンからなり、1960残基のアミノ酸をコードしている。NMMHCA 蛋白はATPおよびアクチン結合部位を含むN末側の頭部とC末側の尾部よりなる。6家系のMHA/Sebastian症候群の解析で5種類の変異が見い出された。R1933X変異はハプロタイプ解析により血縁関係が否定された2家系において見い出された。

Thromb Res. 100 (3): 211-221, 2000.

9. S. Kunishima, T. Kojima, et al.: Mutations in the NMMHC-A gene cause autosomal dominant macrothrombo-cytopenia with leukocyte inclusions (May-Hegglin anomaly/Sebastian syndrome). **Blood** 97 (4): 1147-1149, 2001.

学会発表

1. 国島伸治、小嶋哲人ら：連鎖解析による May-Hgglin Anomaly 責任遺伝子座の同定 第 62 回日本血液学会、福岡、平成 12 年 3 月
2. 石黒和博、小嶋哲人ら：ジーンターゲットティングを用いたフォーカルアドヒージョンにおけるリュウドカンの機能解析 第 62 回日本血液学会、福岡、平成 12 年 3 月
3. K. Ishiguro, and T. Kojima : Syndecan-4 (Ryudocan) is a transmembrane protein with heparan-sulfate glycosaminoglycans. XVth International Congress on Fibrinolysis and Proteolysis, Hamamatsu, Japan, 平成 12 年 6 月
4. 石黒和博、小嶋哲人ら：シンデカン 4 (リュウドカン) 欠損による胎盤胎児血管の障害 第 23 回日本血栓止血学会学術集会、名古屋、平成 12 年 11 月
5. 小嶋哲人、高木明ら：Long PCR 法を用いた血液凝固第 VIII 因子遺伝子の逆位 (Inversion) 解析 第 23 回日本血栓止血学会学術集会、名古屋、平成 12 年 11 月
6. 高木明、小嶋哲人ら：血液凝固第 XIII 因子の遺伝子多型解析 第 23 回日本血栓止血学会学術集会、名古屋、平成 12 年 11 月
7. 山本晃士、小嶋哲人ら：LPS 投与老齢マウスにおける PAI-1、TF 発現変化と血栓傾向 第 23 回日本血栓止血学会学術集会、名古屋、平成 12 年 11 月
8. 竹下享典、小嶋哲人ら：早期老化モデル「klotho 遺伝子欠損マウス」における線溶系因子の発現と病理学的検討 第 23 回日本血栓止血学会学術集会、名古屋、平成 12 年 11 月

9. 清水敦哉、小嶋哲人ら：アラニンスキヤニング法を用いた血小板膜蛋白 GP Ib α 鎖の VWF への結合機序の解明 第 23 回日本血栓止血学会学術集会、名古屋、平成 12 年 11 月
10. 清水敦哉、小嶋哲人ら：抗 GP Ib α 鎖抗体を用いた GP Ib α 鎖の VWF への結合機序の解明 第 23 回日本血栓止血学会学術集会、名古屋、平成 12 年 11 月
11. 石黒和博、小嶋哲人ら：ジーンターゲットティングにより解明されたシンデカン 4 (リュウドカン) の生体における機能と疾患における役割 第 23 回日本分子生物学会、神戸、平成 12 年 12 月

G. 研究発表

- | | |
|-----------|----|
| 1. 特許取得 | なし |
| 2. 実用新案登録 | なし |
| 3. その他 | なし |

H. 研究協力者

国島伸治、高木明、村手隆：名古屋大学医学部保健学科
柳田正光、中山享之、竹下享典、清水敦哉、山本晃士、松下 正、齋藤英彦：名古屋大学医学部第一内科

播種性血管内凝固症候群の発症頻度と臨床症状における多様性 (分担) 研究者 岡嶋 研二 熊本大学医学部臨床検査医学

研究要旨

播種性血管内凝固症候群 (DIC) の発症頻度と臨床症状をいろいろな基礎病態に合併する DIC 症例で解析した。1882 例の DIC を疑われた症例中、204 例が DIC と診断された (発症頻度は 10.8%)。これらの症例における基礎病態別の DIC 発症頻度は、3.7-20.4% と基礎疾患の種類に応じて差異が認められた。臨床症状は、基礎病態の種類に応じて多様で、大動脈瘤や術後症例では、多くの症例で臨床症状を呈しなかった。産科疾患に伴う DIC 例では、すべての症例で出血症状を認めたが、臓器症状は、その 20.0% にしか認められなかった。逆に、感染症に伴う DIC 例では、出血症状は 15.4% にしか認められなかったが、臓器不全症状は、その 76.9% に認められた。その他の基礎疾患に合併する DIC では、出血症状が 31.9-50.0%、臓器症状が 21.7-33.3% に認められた。出血症状の発現は、消費性凝固障害よりも、 $\alpha 2$ -プラスミンインヒビターの低下により引き起こされる過剰線溶の発現と関連を認めた。このように、DIC の発症頻度や臨床症状は、微小血栓形成に加えて基礎疾患の病態に応じて多様であり、そのため、これらに対する治療も基礎疾患の病態に応じてなされるべきであると考えられた。

A. 研究目的

播種性血管内凝固症候群(DIC)は、多くの基礎疾患に合併する重篤な病態である。DIC の病態は、産科疾患に合併するものから病態解析が始まった。その結果、これらの病態では、胎盤や羊水由来の組織因子が血中に流入し、全身で微小血栓が形成され、消費性凝固障害や臓器不全症状が発現することが判明した。しかし、その後、DIC の病態は基礎疾患の種類に応じて多様である可能性が示されてきた。例えば、感染症に合併する DIC では、エンドトキシンによって刺激された単球が産生する炎症性サイトカインである腫瘍壊死因子やインターロイキン 1β によって単球や血管内皮細胞が活性化され、それらの表面の組織因子発現やプラスミノゲンアクチベーターインヒビター-1(PAI-1)が発現し、微小血栓が形成される。また、これらに加えて、活性化された好中球による血管内皮細胞障害も感染症に伴う DIC の臓器不全の発症に関与していると考えられている。このように、DIC の病態は、基礎疾患の種類により、大きく異なる可能性があり、この多様性を明らかにすることで、それぞれの基礎病態の種類

に応じた適切な DIC 治療を行うことが可能である。

このような背景の下に、本研究では、基礎疾患別の DIC の発症頻度や臨床症状を解析し、DIC 病態の多様性の有無について検討した。

B. 研究方法

DIC を疑われた 1882 例を対象に解析した。DIC の診断基準は文献(1)に示した。これらの症例のうち 204 例が DIC であった。それらの基礎病態は、固形腫瘍(33.8%)、血液学的悪性疾(12.7%)、大動脈瘤(10.8%)、感染症(6.4%)、術後(4.4%)、肝疾患(2.9%)、産科疾患(2.5%)、そして、その他(26.5%)であった。これらの症例では、血小板減少を示した症例が 44.1%、また血漿フィブリノゲン濃度の減少を認めたものが 12.3% で、多くの DIC 症例では、これらの物質の低下は認められなかった。出血症状は皮膚、消化管、尿路、歯ぎん、結膜、腹膜および胸膜内、喀血、腫、眼底および手術創からの出血を含み、臓器不全症状は呼吸不全、心不全、消化管出血、腎不全、肝不全を含む。これらの診断基準は文献(1)に述

べた。

血漿検体を用い、凝固線溶系の分子マーカーであるトロンビン-アンチトロンビン複合体(TAT)、D-ダイマー(XDP)、プラスミン-アンチプラスミン複合体(PAP)、および $\alpha 2$ プラスミンインヒビター($\alpha 2$ PI) 活性を測定した。

統計学的方法は、a two-sided Fisher's exact test を発症頻度および臨床症状の比較に、Student's test を分子マーカーの濃度の比較のために用いた。

C. 研究結果

DIC の頻度は、全体では 10.8% で、最も高いのは大動脈瘤に伴う DIC で、20.3%、最も低いものは産科病態に合併するもので、3.7% であった。大動脈瘤に合併する DIC の発症頻度は、血液学的悪性疾患(10.1%)、固形腫瘍(10.9%)、産科病態にそれぞれ合併するものよりも有意に高値であった。大動脈瘤および術後に伴う DIC 症例では、多くは出血や臓器症状は認められなかった。

臨床症状のうち、出血症状は産科に合併する DIC 症例の全例で認められ、血液学的悪性疾患や肝疾患では、その約半分に認められた。ところが、感染症、術後、および大動脈瘤に合併するものでは、出血症状は、それらの 20% にしか認められなかった。産科病態の DIC 症例の出血症状発現頻度は、感染症および大動脈瘤に合併する DIC 症例のそれらに比べて有意に高かった。臓器症状は、感染症に合併する DIC 症例の 76.9% に認められたが、産科病態、血液学的悪性疾患、固形腫瘍に合併する DIC では、その発現頻度は有意に低く、それらの 20.0% にしか認められなかった。

凝固線溶系の分子マーカー濃度では、TAT はこれらの基礎疾患に伴う DIC 症例間で有意差は認められなかったが、PAP は、産科病態と血液学的悪性疾患に伴う DIC 症例で、感染症に伴う DIC 症例よりも有意に増加していた。XDP 濃度は、産科病態に合併する DIC で、固形腫瘍の DIC 症例のそれより、有意に高値であった。

これまでに我々は、DIC で、 $\alpha 2$ PI 活性が正常の 50% 未満になると、過剰線溶が惹起され出血の危険が認められる可能性を

示した。肝疾患に伴う DIC では、その約 80% に過剰線溶が惹起されていた。また、血液学的悪性疾患(34.6%)や産科疾患(40.0%)に合併する DIC における過剰線溶発現頻度は、他の基礎疾患に合併する DIC の過剰線溶の発症頻度よりも有意に高かった。また、血液学的悪性疾患や固形腫瘍群では、過剰線溶を伴う群で、それを伴わない群に比べて、有意に高い出血症状の発現頻度が認められた。また、産科疾患では過剰線溶を伴わない群および伴う群の両方で、すべての症例に出血症状の発現を認めた。肝疾患および大動脈瘤に伴う DIC 症例では、出血傾向はすべて過剰線溶を認めた群のみに発現していた。

D. 考察

本解析で明らかになったように、DIC でもその発症頻度や臨床症状は、基礎疾患の種類に応じて多様であることが判明した。全体の DIC の発症頻度は、10.8% であったので、基礎疾患の種類や臨床症状から DIC を疑った場合、約 10 人に 1 人は DIC であると考えられる。臨床症状で特徴的であったのは、大動脈瘤に伴う DIC では、多くの症例に臨床症状を認めないという点である。このようなタイプの DIC は従来より代償型 DIC とよばれている。また、術後の DIC 症例の多くも無症状であるが、これは手術により一過性に血中に組織因子が放出され、一過性の DIC 様の所見を呈したためであろうと考えられる。産科病態に合併した DIC では、すべての症例に出血症状を認めたが、胎盤に由来する大量の組織因子が血中に流入し、そのため消費性凝固障害が惹起され出血症状が発現したものと思われる。さらに、産科疾患や血液学的悪性疾患では、出血症状の発現頻度が高いが、血中 PAP 濃度や過剰線溶の発現頻度も高く、DIC ではその出血症状の発現に消費性凝固障害以外に、過剰線溶も重要な関与をしている可能性が高い。

産科疾患に伴う DIC 症例とは対象的に、感染症に伴う DIC 症例では、出血症状の発現頻度(20.0%)は低い、臓器不全症状の発現頻度(76.9%)が高い。この理由として感染症に伴う DIC の発症に TNF- α など

の炎症性サイトカインが関与していることによると考えられる。すなわち、これらのサイトカインは単球や血管内皮細胞を活性化して、その表面に組織因子を発現させるが、さらに、好中球の活性化を引き起こし、血管内皮細胞を傷害し、また、血管内皮細胞から線溶系の活性化を抑制するプラスミノゲンアクチベーターインヒビター-1の産生を促進する。すなわち、微小血栓形成および溶解阻害に加えて、血管内皮細胞傷害による微小循環障害により、出血症状は起こりにくいですが、臓器不全症状が発現しやすくなると考えられる。

このような DIC 病態の多様性を考慮すると、すべての DIC に画一的な抗凝固療法を行うことは効果的ではないと考えられる。産科疾患や血液学的悪性疾患で、微小血栓形成や過剰線溶を認める場合には、出血傾向が起こりにくい低分子ヘパリンを用い、また、過剰線溶が合併している場合は、低分子ヘパリンに加え、トラネキサム酸を投与する必要がある。また、炎症性サイトカインが関与する感染症に伴う DIC では、サイトカイン産生抑制作用が認められるメシル酸ガベキサートやアンチトロンピンなどを投与することが病態に応じた効果的な治療であろうと思われる。また、近い将来に登場してくるであろう活性型プロテイン C 製剤も TNF- α 産生抑制作用があるので、感染症などの DIC に使用することが効果的であろうと思われる。

E. 結論

DIC の病態機序は、基礎疾患の種類に応じて多様である。出血症状は産科疾患や血液学的悪性疾患に伴う DIC で発現しやすく、これには消費性凝固障害に加えて過剰線溶が重要な関与をすすると思われた。感染症に伴う DIC では、逆に、出血症状の発現頻度は低いですが、臓器不全症状を発現する頻度が高く、これは、炎症性サイトカインがこの DIC の発症に関与するため、微小血栓形成に加えて、好中球の活性化や線溶活性の抑制が加わるためと考えられた。このような多様な DIC 病態に対応した抗凝固療法を行うべきであると考えられた。

F. 研究発表

1. Okajima K, Sakamoto Y, Uchiba M. Heterogeneity in the incidence and clinical manifestations of disseminated intravascular coagulation: A study of 204 cases. *Am J Hematol* 65, 210-222, 2000.

ラット DIC モデルにおける血管作動性物質の役割

(分担) 研究者 朝倉 英策

金沢大学医学部附属病院高密度無菌治療部

研究要旨

動物 DIC モデルの作成にあたって、DIC 誘発物質として TF または LPS が頻用されてきたが、昨年までの我々の検討で、両モデル間で特に線溶活性化、臓器障害の病態は大きく異なり、前者は臨床の線溶優位型 DIC に、後者は凝固優位型 DIC に類似した性格を有することを報告した。今回は、血管作動性物質に注目したところ、TF 誘発 DIC モデルにおいては、相対的に血管拡張性物質である一酸化窒素 (NO) の産生が亢進しており、LPS 誘発 DIC モデルにおいては、相対的に血管収縮性物質であるエンドセリン (ET) の産生が亢進していることが明らかになった。血管作動性物質の観点からも、前者では血流維持・血栓形成阻止の方向に作用し、後者では微小循環障害・臓器障害の進展の方向に作用しているのではないかと思われた。両モデルの相違点が一層明らかになるとともに、DIC 治療を開発する上でも DIC の病態の差を考慮することは重要と思われた。

A. 研究目的

DIC の病態解明、新規治療薬の探究を目的とした研究では、動物 DIC モデルがしばしば用いられるが、この際 DIC 誘発物質として TF および LPS が頻用されてきた。従来、両モデルは区別されることなく使用されてきたが、昨年までの我々の検討で、両モデル間で特に線溶活性化、臓器障害の病態は大きく異なり、LPS 誘発 DIC モデルは臨床例の凝固優位型 DIC に、TF 誘発 DIC モデルは線溶優位型 DIC に類似した性格を有するモデルであることを報告した。一方、DIC における臓器不全の進展は、微小循環障害によるものが主因であるとする、循環動態に影響をおよぼす血管作動性物質が DIC の病態に関与している可能性が高いが、この点についての詳細な検討はほとんどない。この度我々は、二種類のラット DIC モデル (TF 誘発 DIC モデルおよび LPS 誘発 DIC モデル) を用い、血管拡張性物質である一酸化窒素 (NO) および血管収縮性物質であるエンドセリン (ET) の動態を比較検討した。

B. 研究方法

ラット DIC モデルは、体重 180~200 g、6~7 週齢の Wistar 系雄性ラットにおいて、尾静脈より 4 hr かけ TF 3.75 単位/kg/4 hr、または、LPS 50 mg/kg/4 hr を持続点滴することにより作成した (それ

ぞれ n=12, 13)。採血は、TF または LPS 投与開始時間を 0 hr とし 4 hr 後に開腹し、腹部大動脈より採血を行った。検査項目は、血小板数 (PLT)、プロトロンビン時間 (PT)、活性化部分トロンボプラスチン時間 (APTT)、フィブリノゲン (Fbg)、D ダイマー (DD)、血中 NOX 濃度 (NO の生体内における半減期は 4 秒程度と極めて短いと考えられており、最終的には亜硝酸塩 nitrite および硝酸塩 nitrate に代謝される。両者を総合的に測定することは可能であり、NOX として表現される)、血中 ET 濃度、また腎障害マーカーとして血中クレアチニン (Cr) を測定した。病理学的検討として、腎系球体におけるフィブリン沈着の程度を検討するため、リンタングステン酸ヘマトキシリン染色 (PTAH 染色) を行い、100 個の糸球体中フィブリン沈着陽性の糸球体の個数を数え、%GFD (percentage of glomerular fibrin deposition) として示した。データは平均値 ± 標準誤差 (mean ± S.E.) で示し、Wilcoxon 検定を用いて $p < 0.05$ を有意差有りとした。

C. 研究結果

TF3.75 単位/kg/4 hr または LPS 50mg/kg/4hr 投与群のマーカーの変動を生理食塩液投与群 (コントロール群; 生理食塩液を 4 時間持続点滴した群, n=6) と比

較し検討を行った。TF または LPS 投与により、PLT の有意な減少（コントロール：725±17, TF 179±11, LPS 186±14 × 10³/μL; とともに p<0.01, 以下同様の順で記載）, PT の延長（測定感度以上）（12.9 ± 0.2, 測定不能, 測定不能 sec; -, -）, APTT の延長（測定感度以上）（21.6±1.1, 測定不能, 測定不能 sec; -, -）, 血中 Fbg の低下（191.5 ± 7.3, < 50.0, < 50.0 mg/dL; とともに p<0.01）, 血中 DD の上昇（< 0.06, 11.64±3.12, 2.54±0.33, μg/mL; とともに p<0.01）がみられた。血中 Cr 値は有意に上昇（0.13±0.02, 0.26 ± 0.05, 0.33 ± 0.02 mg/dL; p<0.05, 0.01）した。血中 NOX は有意に上昇し（5.7 ± 0.2, 66.5±3.2, 28.4±3.3 μmol/L; p<0.01, 0.05）, 血中エンドセリンも有意に上昇した（0.7 ± 0.1, 1.6 ± 0.2, 13.7 ± 1.5 ng/mL; p<0.01, 0.01）。腎糸球体におけるフィブリン沈着（%GFD）はコントロール群と比較して LPS 投与群でのみ有意に高度であった（0.0±0.0, 0.0±0.0, 73.1 ± 4.5%; NS, p<0.01）。

上記マーカーの変動を、TF 投与群と LPS 投与群の間で比較すると、PLT は有意差なく、PT および APTT はどちらも測定感度以上に延長し、Fbg はどちらも測定感度以下に低下した。血中 DD は TF 投与群で有意に上昇し（p<0.01）, 血中 Cr は LPS 投与群で高値傾向（p<0.10）であった。腎糸球体フィブリン沈着は、LPS 投与群では高度であったが、TF 投与群では全く見られなかった（p<0.01）。血管作動性物質関連マーカーとしての、血中 NOX は TF 投与群で有意に高値であったのに対し（p<0.05）, 血中 ET は逆に LPS 投与群で有意に高値であった（p<0.01）。

D. 考 察

昨年までの我々の検討により、TF 誘発 DIC モデルと LPS 誘発 DIC モデルは DIC の病態は大きく異なることを凝固線溶分子マーカーを駆使して明らかにした。今回は血管作動性物質に注目し、血中 NOX, ET の動態について両モデルの比較を行った。

今回我々が使用した両モデルは、PLT および Fbg の低下度、PT および APTT の延長度が同等であることより、ほぼ同程度の消費性凝固障害を伴った典型的な DIC モデルとなっているものと思われた。まず、凝固線溶両者の活性化を反映する血中 DD の上昇は TF, LPS 投与群のいずれでも見られたが、LPS モデルでは、TF モデルと比較すると、その上昇がごく軽度であることは注目された。

また、TF モデルでは全くみられない腎糸球体フィブリン沈着が LPS モデルでは高度であることや、腎障害が LPS モデルで高度傾向である所見についても明らかな相違点であった。これらの所見は、TF モデルでは線溶活性化が高度であり（血中 DD の著増で反映されている）、血栓が溶解されやすいため臓器障害をきたしにくいのに対して、LPS モデルでは、線溶活性化が軽度であり（血中 DD の上昇は軽度であることで反映されている）、血栓が溶解されにくく臓器障害をきたしやすいものと考えられる。

さらに、今回特に注目した血管作動性物質は、両 DIC モデル間で際立った差異がみられた。すなわち、TF 誘発 DIC モデルにおいては著しい血中 NOX の上昇がみられたのに対し、LPS 誘発 DIC モデルにおいては血中 NOX の上昇は中等度にとどまった。一方、血中 ET については LPS 誘発 DIC モデルにおいては著増したのに対し、TF 誘発 DIC モデルでは軽度の上昇にとどまった。過剰な NO は血圧低下（ショック）というマイナス作用がある反面、NO は TF の産生抑制、血小板機能抑制、PAI 産生の抑制作用といった抗血栓作用も有している。

一方、ET は、強力な血管収縮性をもつペプチドで、血管内皮細胞よりエンドトキシンまたはサイトカインの刺激により血中に放出されることが知られている。LPS 誘発 DIC モデルにおいては、微小血栓が溶解されにくいことが臓器障害の大きな原因の一つと考えられてきたが、血管作動性物質の動態より次のような病態も考察される。すなわち、LPS 誘発 DIC モデルにおいて

は ET の血管収縮効果が NO の血管弛緩反応よりも強く (LPS 投与群においては ET の上昇が NS 投与群と比較して約 20 倍であったのに対し, NOX の上昇は NS 投与群と比較して約 5 倍にとどまっている), NO が ET による血管収縮に伴う循環障害を抑制できず, 臓器障害をさらに助長させた可能性である. 一方, TF 誘発 DIC モデルにおいては線溶活性化に伴い微小血栓が溶解されやすいことが, 臓器障害の少ない理由と考えられてきたが, 血管作動性物質の動態から, 良好な循環の維持, NO による抗血栓作用も臓器障害防止に関与しているかもしれない.

E. 結 論

血管作動性物質の観点からも, TF 誘発 DIC モデルと LPS 誘発 DIC モデルは病態が大きく異なっていた. すなわち, 前者は相対的に NO 産生が盛んで, 良好な血流維持・血栓形成阻止に関与しており, 後者は相対的に ET 産生が盛んで微小循環障害・臓器障害の伸展に関与しているのではないかと考えられた. DIC 治療の開発の際も, DIC 病態ごとに治療法の選択を考慮する方向へ発展すべきではないかと思われた.

F. 研究発表

- 1) Asakura H, Aoshima K, Nakao S et al: Beneficial Effect of the Active Form of Vitamin D3 against LPS-Induced DIC but not against Tissue-Factor-Induced DIC in Rat Models. *Thromb Haemost* 85: 287-290, 2001.
- 2) Asakura H, Aoshima K, Nakao S et al: All-trans Retinoic Acid is Partially Effective against Lipopolysaccharide-Induced but not against Tissue-Factor-Induced DIC in Rat Models. *Blood Coagulation & Fibrinolysis*, in press.

フィブリノゲン高値の播種性血管内凝固症候群 (DIC) 例に 関する研究

(分担) 研究者 和田英夫
三重大学医学部 臨床検査医学

研究要旨

フィブリノゲン値と DIC の予後ならびに病態との関係を多数例で検討した。造血器腫瘍のフィブリノゲン高値群では予後が悪く、非造血器腫瘍においてはフィブリノゲン値と予後に関係は認められなかった。臨床症状とフィブリノゲン値の関係では、臓器症状の出現頻度はフィブリノゲン高値群でより多く、臓器症状の出現が予後不良の原因と考えられた。フィブリノゲン低値群では、PT 比は大きくなり、FDP 値も高くなり、DIC スコアも有意に高値を示し、フィブリノゲン低値群の方がより進行した DIC と考えられた。また、フィブリノゲンの低下に伴い TAT、PPIC ならびに tPA-PAI-I complex は有意に増加し、フィブリノゲン高値群では有意に PAI-I は高値を示すことから、フィブリノゲン低値群は過線溶状態で、フィブリノゲン高値群は低線溶状態であることが示唆された。フィブリノゲン高値群で血中 IL-6 が有意に高値であることから、高サイトカイン血症が PAI-I の産生を亢進させたことが考えられる。

A. 研究目的

重症敗血症に対するアンチトロンビン(AT)や活性化プロテイン C(APC)の大規模 study が行われるなど、播種性血管内凝固症候群(DIC)に対する関心が国際的に高まり、国際血栓止血学会(ISTH)は Global Test による overt DIC の診断基準作成の準備を進めている。日本においても厚生省の DIC 診断基準ができて約 15 年が経過し、診断基準の改定の機運も高まっている。昨年度、我々は厚生省 DIC の診断基準の再検討を行い、PT のカットオフ値を下げ、フィブリノゲンを診断基準から除外する事を提案した。また、一般にフィブリノゲンが低いと非代償性の DIC と考えられ、フィブリノゲンの低下を待ってから DIC の治療を行う医師もいる。このような状況の下、我々はフィブリノゲン値と予後の関係ならびに高フィブリノゲン血症を呈する DIC の病態について検討した。

B 研究方法

対象症例は厚生省の DIC 診断基準で診断された造血器腫瘍 DIC254 例、非造血器腫瘍群 DIC306 例で、フィブリノゲン 200 mg/dl 以上 (高値群)、100— 200 mg/dl (中等値群)、100 mg/dl 以下 (低値群) の 3 群に分

け (表 1)、予後、臨床症状の出現頻度、Global Test {プロトロンビン時間(PT)比、フィブリノゲン、血小板数、FDP}、止血系分子マーカー {thrombin-antithrombin complex (TAT)、plasmin-plasmin inhibitor complex (PPIC)、D-dimer、soluble fibrin (SF)、plasminogen inhibitor-1 (PAI-I)、tissue type plasminogen activator (t-PA)-PAI-I complex, thrombomodulin (TM)} 生理的止血系阻害因子{AT, PC, antiplasmin (APL)}、サイトカイン (IL-1, IL-6) 値を検討した。止血系分子マーカーは ELISA にて測定し、生理的止血系阻害因子は発色気質法にて測定した。研究にあたっては、ヘルシンキ宣言を尊重した。

C. 研究結果

造血器腫瘍における高フィブリノゲン群の 4 週後の予後は他の 2 群に比べて悪く、非造血器腫瘍群においては 3 群間に有意な予後の違いは認められなかった (表 2)。出血症状の出現頻度は、造血器腫瘍群では高値群 63.5%、中等値群 71.6%、低値群 75.4% であり、非造血器腫瘍群はそれぞれ 66.9%、72%、64.2%であった。臓器症状の出現頻度は、造血器腫瘍群では高値群 51.9%、中等値群 22.2%、低値群 24.6%であり、非造血器腫瘍群はそれぞれ 73.9%、65.9%、55.2%