

cidating the profiles of these polymorphisms. Among these SNPs, a common C to T substitution at position 677 of the MTHFR gene (MTHFR C677T polymorphism) results in an alanine to valine amino acid substitution in the protein and leads to a 30% decrease of enzyme activity in the heterozygote and a 60% decrease in the homozygote (Frosst et al. 1995). This homozygote (TT genotype) was known to cause mild hyperhomocysteinemia more frequently than the major allele homozygote. Furthermore, its allele frequency approaches 30% in many ethnic groups (Wilcken 2003). Thus, in the present study, we focused our attention upon this SNP as the target for tailor-made prevention of atherosclerosis.

There was uncertainty over whether the association between MTHFR C677T polymorphism and atherosclerotic diseases actually existed. In 1998, Brattstrom et al. reported a negative result in a meta-analysis of the relative risk of vascular disease associated with the TT genotype 1.12 (0.92–1.37) (Brattstrom et al. 1998). In 2002, however, this hypothesis came to be positively supported by two persuasive meta-analyses (Klerk et al. 2002; Wald et al. 2002) with more data included. [Klerk et al. reported CHD risk as 1.16 (1.05–1.28), and Wald et al. 1.21 (1.06–1.39).] Thus, it is inferred that the MTHFR C677T TT genotype is an independent risk factor for atherosclerosis via mild hyperhomocysteinemia. In addition, B vitamin supplementation such as folic acid has been shown to lower homocysteine levels (Homocysteine Lowering Trialists' Collaboration 1998; Vermeulen et al. 2000; Wald et al. 2001). The MTHFR C677T homozygote could therefore be a target of effective prevention by folic acid supplementation from the viewpoint of high-risk approach. However, quantitative data do not currently exist regarding the degree of response to folic acid in each genotype. This study thus aimed at assessing the effect of folic acid supplementation quantitatively in each MTHFR C677T genotype and considered the efficiency of tailor-made prevention of atherosclerosis in genotype-stratified, randomized, double-blind, placebo-controlled trials prepared in concordance with the CONSORT statement (Moher et al. 2001).

## Materials and methods

### Study subjects

Since we intended to examine the effect of folic acid supplementation as the primary prevention against atherosclerosis, we needed to recruit healthy people. Considering the higher incidence and mortality of atherosclerotic diseases in men than women, we focused on healthy men only. After the approval of the ethical committee of Keio University School of Medicine, we obtained the written informed consent from 210 healthy men for participation in the study. They were considered genetically unrelated according to the information by

the company. Subjects in this trial finally consisted of 203 healthy men after exclusion of those who were taking folic acid or drugs known to effect folic acid metabolism. Mean age and body mass index (BMI) were  $45.8 \pm 11.5$  years and  $23.7 \pm 3.66$  kg/m<sup>2</sup> (mean  $\pm$  SD), which are typical values in Japanese healthy male workers. The follow-up period was from December 2003 to March 2004. The flow diagram of the progress throughout the phases of randomized trials is shown in Fig. 1.

### Study design

The study was designed around genotype-stratified, randomized, double-blind, placebo-controlled trials (nested RCTs). Intervention consisted of folic acid 1 mg/day per o.s. or an identical-looking placebo for 3 months since tHcy reduction is known to be maximal at a folic acid dosage of 1 mg/day (a minimum of 0.8 mg/day has been reported as necessary to achieve the maximum reduction in the tHcy level) (Vermeulen et al. 2000). The primary endpoint was the change in the plasma tHcy level, and the secondary endpoint was changes in the pulse wave velocity (PWV), ankle-brachial pressure index (ABI), and high-sensitive C-reactive protein (hsCRP) levels. All the measurements were done at baseline, 1, and 3 months after the start of intervention. As for deciding when intervention should be stopped in any subject, we made arrangements for monitoring and judging unexpected adverse events, including vitamin-B12-deficiency anemia, the masking of which is the only known side effect of folic acid supplementation. We decided that if any important adverse events judged by doctors in our group were observed, we would stop the trial quickly, and vitamin B12 levels were continuously monitored in all subjects to prevent vitamin-B12-deficiency anemia.

To generate the random allocation sequence, we used SAMPSIZE ver.2 software (Blackwell Science, London, UK) on a Windows workstation RX-65 (Sony, Tokyo, Japan). Randomization (blocking size set as four) was done after genetic stratification of three genotypes (i.e., independent three times randomization). Subjects were randomly allocated to the folic acid group and placebo group at a ratio of one to one. The doctor and nurses in the clinic had no information of the group assignment, and the nurses measuring PWV/ABI and the blood chemistry technicians also had no information of group assignment or any subject profiles. The success of blinding was evaluated by comparing the follow-up rate and the mean capsule-intake rate between both groups.

### Measurements

Age and smoking status were self-reported, and medical history was acquired by interview. Height, weight, systolic and diastolic blood pressures, fasting blood glucose

level, serum lipid levels [total cholesterol, triglyceride, high-density lipoprotein (HDL) cholesterol], aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), gamma-glutamyl transpeptidase (gamma-GTP), blood urea nitrogen (BUN), serum creatinine (Cr), and serum uric acid (UA) were measured in all subjects.

To monitor the intake of the folic acid or placebo capsules, we asked all participants to report the actual daily intake every month in a specific format and measured the serum folate level at baseline, 1, and 3 months after the start of intervention. We also monitored the vitamin B12 level at the same time to prevent vitamin-B12-deficiency anemia. Serum folate and vitamin B12 concentrations were measured using chemiluminescence enzyme immunoassay (CLEIA) on UniCel DxI 800 immunoassay systems (Beckman Coulter Inc., CA, USA).

Fasting blood samples were drawn, and plasma for tHcy determination was separated with minimal delay and stored at  $-20^{\circ}\text{C}$  until analysis. tHcy levels were assayed using the high-performance liquid chromatography (HPLC) method (Ubbink et al. 1991). The PWV and ABI were measured with the AT-form PWV/ABI (Nippon Colin, Aichi, Japan), which can monitor

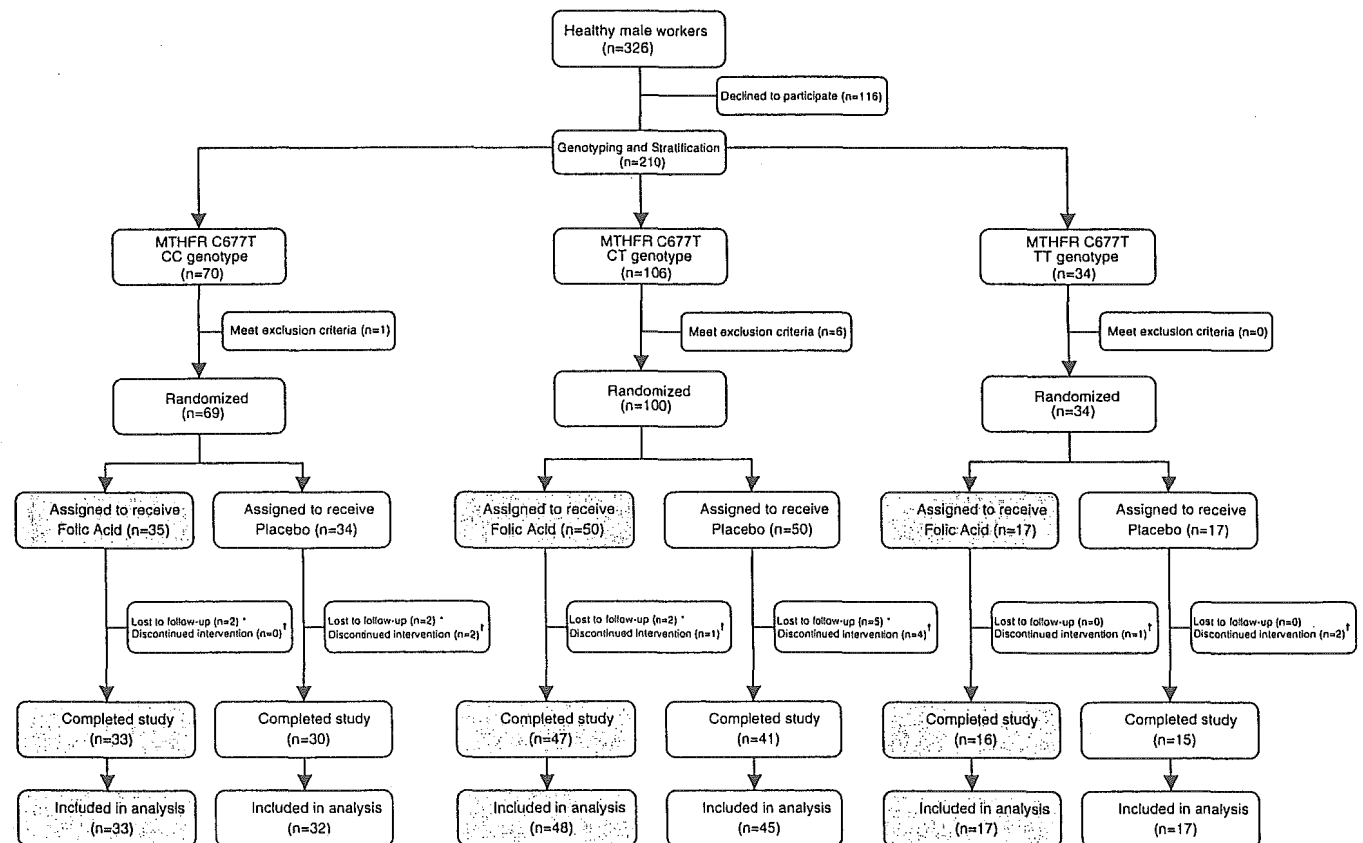
bilateral brachial and ankle pressure wave forms simultaneously using the volume plethysmographic method, with two optional tonometry sensors for carotid and femoral arterial wave measurements. The hsCRP was measured using the N-latex CRP II kit (Dade Behring Inc., IL, USA).

Genotyping for the MTHFR C677T polymorphism was performed by the polymerase chain reaction (PCR) technique and restriction fragment length polymorphism (RFLP) analysis. We designed PCR primers 5'-CCCAGCCACTCACTGTTTGTAG-3' (sense) and 5'-TGGGAAGAAGCTCAGCGAACT-3' (antisense) with DNASIS Pro Ver.2.0 (Hitachi Software Engineering Co. Ltd., Tokyo, Japan). Since the C to T transition at nucleotide 677 produces a Hinf I digestion site, the amplified 469-bp product derived from the mutant gene was cleaved into 393-bp and 76-bp fragments by Hinf I (TaKaRa Bio Inc., Shiga, Japan), which leaves the wild-type gene unaffected. After electrophoresis through 6% polyacrylamide gel, the digestion products were visualized by staining with ethidium bromide.

## Statistics

We calculated the sample size according to the results of our pilot trial. We estimated the standard effect size in

Fig. 1 Process during phases of the randomized trials



Overall follow up rate after 3 months : 94.6% (CC : 92.8%, CT : 93.0%, TT : 100%)

\* No post randomization contact

† Discontinued intervention means insufficient mean capsule intake rate (< 70%)

each genotype (CC, CT, and TT) as 0.5, 0.55, and 0.75 by the serum folate stratified analysis of the cross-sectional data in the pilot study. The planned enrollment of 68, 56, and 32 in each genotype gave an 80% power to detect a pairwise difference, with a two-sided test at  $\alpha=0.05$ .

Analysis was based on the intention-to-treat policy. The distributions of triglyceride, HDL cholesterol, AST, ALT,  $\gamma$ -GTP, Cr, folate, vitamin B12, tHcy, and hsCRP concentrations were all skewed and regarded as log-normal. Therefore, these data were logarithmically transformed and Student's *t* test was applied. As to age, since the distribution was skewed and not log-normal, Wilcoxon's rank sum test was applied. The other variables were regarded as normally distributed and Student's *t* test was applied. As to cross-table analysis, the chi-square test or Fisher's exact test were applied. Hardy-Weinberg equilibrium was also assessed by the chi-square test. Comparisons with the baseline level were conducted with a paired *t* test. Differences in the above variables among different genotype subgroups (multiple comparisons) were assessed with Tukey's post hoc analysis of variance (ANOVA). Odds ratios (OR) and 95% confidence intervals (95% CIs) were calculated using logistic regression analysis. Changes were evaluated from the baseline level in each group. All statistical analyses were performed using SPSS for Windows version 11.0 (Statistical Product and Service Solutions, IL, USA), and statistical significance was accepted for a two-tailed  $P < 0.05$ . Interim analysis was done at 1 month after the start of intervention.

#### Role of the funding source

The sponsor of this investigator-initiated project (the Ministry of Economy, Trade and Industry, Japan) had no role in study design; in collection, analysis, or interpretation of data; in writing the paper; or in the decision to submit the paper for publication.

## Results

Genotyping for the MTHFR C677T polymorphism in the 210 healthy Japanese male subjects showed that 70 were homozygous for the major allele (CC genotype), 106 were heterozygous (CT genotype), and 34 were homozygous for the minor allele (TT genotype). These results were in Hardy-Weinberg equilibrium and consistent with the results previously reported in another Japanese population (Nishio et al. 1996; Lwin et al. 2002). Seven the subjects (CC 6; CT 1; TT 0) who were taking folic acid or drugs known to effect folic acid metabolism were excluded.

The baseline characteristics of the study subjects in each of the MTHFR C677T genotypes (CC, CT and TT)

in the folic acid and placebo groups are shown in Table 1.

Of the 203 people who were randomly allocated into the trial groups, 11 (folic acid group four, placebo group seven) were lost during the follow-up. Two subjects complained of a chilled sensation in the hands or numbness in the fingers and stopped taking the capsules. Both were in the folic acid group. Of the remaining 192 people, ten (folic acid group two, placebo group eight) discontinued intervention (less than 70% mean capsule intake rate), and 182 completed the study. Thus, the intention-to-treat population consisted of 192 people, and the follow-up rates in the folic acid and placebo groups were 96.1% and 93.1%, respectively. The flow of participants through each stage is shown in Fig. 1. Reviewing the records on the capsule intake revealed that the mean capsule-intake compliance rates were 91.8% and 92.8% in the folic acid and placebo groups, respectively.

As shown in Fig. 2, the serum folic acid level in the folic acid group was significantly higher than in the placebo group at both 1 and 3 months after the start of intervention (both  $P < 0.001$ ). The plasma tHcy level in the folic acid group was significantly lower than in the placebo group at both 1 and 3 months (both  $P < 0.001$ ).

There were no significant differences between the folic acid and placebo groups in regard to hsCRP, PWV, and ABI after the intervention. There were no significant differences between groups in regard to changes from the baseline level in hsCRP, PWV, and ABI. These are the results of the intervention trial without considering genotypes.

In addition to the significant increase of folic acid and significant decrease of tHcy, there were also significant changes in the folic acid groups in all three genotypes. As shown in Table 2, the TT homozygote group showed the largest decrease in tHcy, and there was a significant linear trend between the minor allele number and the degree of tHcy decrease. The PWV decreased in folic acid group at 1 month, but the trend with the allele number was not observed, and no significant change was observed at 3 months. The hsCRP significantly decreased in the folic acid group at 3 months, but no trend was observed in the allele number. The ABI did not change significantly in either group. In each of the MTHFR C677T genotypes (CC, CT, and TT), there were significant differences between the folic acid and placebo groups in regard to the decrease of plasma tHcy and the increase of serum folic acid, but there were no significant differences between the two groups in regard to the changes in hsCRP, PWV, and ABI after the intervention.

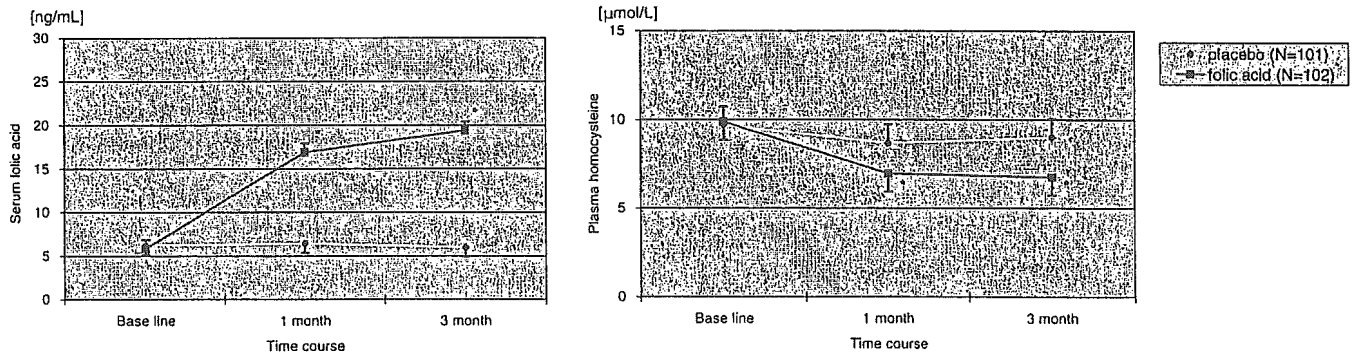
The significant differences between the MTHFR C677T genotypes in the decrease of plasma tHcy in the folic acid group are shown in Fig. 3. The TT homozygote group showed the largest decrease in plasma tHcy at both 1 and 3 months after intervention. Based on the stable results observed twice in the time course, the effect size of tHcy reduction in the TT homozygote subjects

**Table 1** Baseline characteristics in each MTHFR C677T genotype. Mean (SD) or geometric mean (GSD) are shown. *AST/GOT* aspartate aminotransferase/glutamic oxaloacetic transaminase, *ALT/GPT* alanine aminotransferase/glutamic pyruvic transami-

nase,  $\gamma$ -*GTP* gamma-glutamyl transpeptidase, *hsCRP* high-sensitive C-reactive protein, *baPWV* brachial-ankle pulse wave velocity, *ABI* ankle-brachial pressure index

	MTHFR C677T genotypes					
	CC		CT		TT	
	Folic acid group <i>n</i> = 35	Placebo group <i>n</i> = 34	Folic acid group <i>n</i> = 50	Placebo group <i>n</i> = 50	Folic acid group <i>n</i> = 17	Placebo group <i>n</i> = 17
<b>Demographics</b>						
Age (years)	45.5 (11.5)	46.1 (12.2)	44.9 (12.1)	46.2 (11.2)	45.2 (10.1)	48.4 (11.4)
Gender (male/female)	35/0	34/0	50/0	50/0	17/0	17/0
Body-mass index (kg/m <sup>2</sup> )	24.5 (4.98)	23.3 (2.9)	23.8 (3.33)	23.7 (3.46)	23.1 (3.2)	22.7 (3.83)
Smoking	17 (48.6%)	20 (58.8%)	29 (58.0%)	30 (60.0%)	10 (58.8%)	12 (70.6%)
Alcohol intake (g/week)	189.7 (185.0)	129.2 (179.0)	118.5 (175.8)	171.7 (214.4)	322.4 (303.6)	134.2 (152.0)
<b>Blood pressure</b>						
Systolic (mmHg)	136.4 (19.1)	132.5 (14.7)	137.1 (20.1)	131.5 (18.9)	135.8 (13.6)	133.7 (17.3)
Diastolic (mmHg)	83.2 (12.4)	78.5 (10.1)	83.6 (14.4)	81.0 (13.0)	85.6 (13.9)	81.4 (12.4)
<b>Laboratory values</b>						
Total cholesterol (mg/dl)	215.3 (34.5)	204.1 (39.0)	207.1 (42.2)	200.4 (37.5)	208.8 (41.4)	210.8 (31.3)
Triglyceride (mg/dl)	131.8 (1.82)	135.9 (1.82)	108.8 (1.66)	122.0 (1.85)	102.2 (1.48)	111.1 (1.56)
HDL cholesterol (mg/dl)	55.5 (1.27)	49.6 (1.24)	52.8 (1.27)	51.7 (1.23)	60.0 (1.27)	51.4 (1.33)
AST/GOT (IU/L)	23.4 (1.29)	22.8 (1.35)	23.5 (1.37)	24.0 (1.57)	23.7 (1.26)	21.3 (1.21)
ALT/GPT (IU/l)	26.4 (1.55)	23.0 (1.69)	27.1 (1.75)	25.7 (1.88)	22.7 (1.41)	20.6 (1.53)
$\gamma$ -GTP (IU/l)	47.6 (1.92) *	34.5 (1.90)	49.0 (2.08)	38.5 (1.96)	41.5 (2.08)	30.5 (1.66)
Blood urea nitrogen (mg/dl)	13.7 (3.31) *	15.4 (2.33)	14.4 (2.83)	13.8 (2.38)	13.4 (2.75)	13.7 (3.12)
Serum creatinine (mg/dl)	0.87 (1.13)	0.90 (1.16)	0.82 (1.14)	0.87 (1.16)	0.82 (1.14)	0.81 (1.12)
Serum uric acid (mg/dl)	5.86 (1.09)	5.74 (1.16)	5.53 (1.14)	5.68 (1.20)	5.72 (1.31)	5.54 (1.03)
Serum Vitamin B <sub>12</sub> (pg/ml)	548.9 (1.75)	503.7 (1.31)	483.4 (1.33)	475.2 (1.44)	468.1 (1.30)	535.6 (1.35)
Serum folic acid (ng/ml)	6.09 (1.39)	6.68 (1.44)	5.97 (1.56)	6.26 (1.72)	5.61 (1.83)	5.36 (1.50)
<b>Outcome index</b>						
Plasma homocysteine ( $\mu$ mol/l)	9.36 (1.28)	8.70 (1.23)	9.46 (1.20)	9.15 (1.25)	12.8 (1.66)	14.5 (1.72)
hsCRP(mg/dl)	0.44 (2.80)	0.51 (2.70)	0.63 (3.16)	0.48 (3.19)	0.42 (2.71)	0.49 (3.02)
baPWV (cm/s)	1410 (235.8)	1367 (231.9)	1407 (239.6)	1393 (211.5)	1381 (152.4)	1349 (228.4)
ABI (no dimension)	1.14 (0.09)	1.13 (0.09)	1.11 (0.07)	1.11 (0.08)	1.15 (0.07)	1.12 (0.08)

\*  $P < 0.05$  by  $t$  test for comparison with the placebo group



\*  $p < 0.001$  for the comparison with the placebo group. Mean and S.E.M. are shown.

**Fig. 2** Serum folic acid and plasma total homocysteine (tHcy) levels in folic acid and control groups

was estimated as 2.4 $\times$  compared with the wild type. There were significant linear trends between the allele number and the decrease of plasma tHcy at 1 and 3 months (both  $P < 0.01$ ). Both these results of the trend tests were statistically significant, even after being adjusted for age, BMI, smoking status, and alcohol

consumption at 1 and 3 months (both  $P < 0.01$ ). Tukey's post hoc test of ANOVA demonstrated a statistically larger decrease in the TT genotype group than seen in the CC and CT genotype groups (both  $P < 0.01$  at 1 and 3 months).

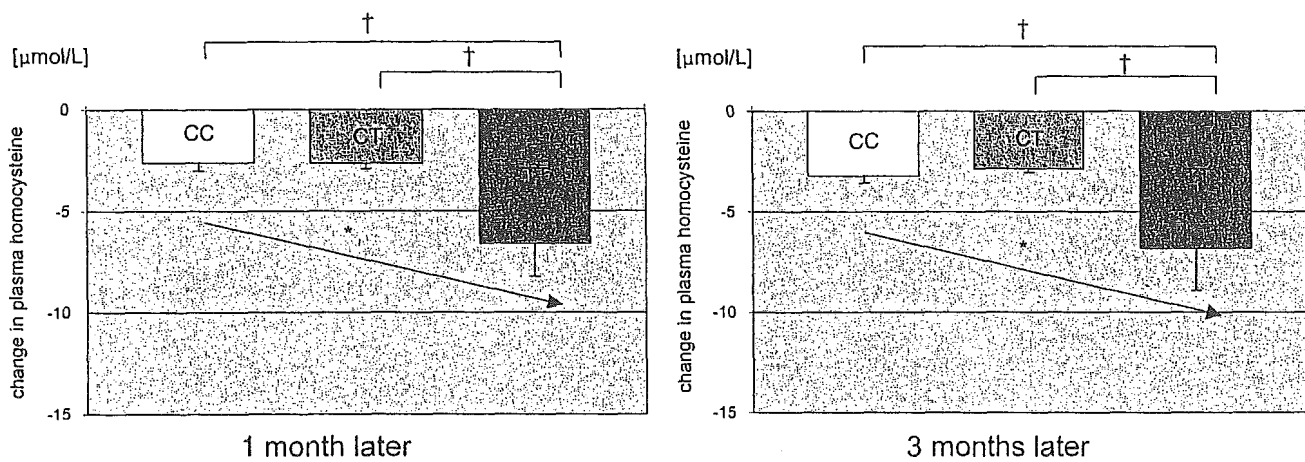
All of the analytical strategies were prespecified, including subgroup analyses and adjustment (no ancillary analysis), and based on the intention-to-treat analysis.

Table 2 Changes of outcome variables in each MTHFR C677T genotype

	MTHFR C677T genotypes					
	CC		CT		TT	
	Folic acid group (n = 35)	Placebo group (n = 34)	Folic acid group (n = 50)	Placebo group (n = 50)	Folic acid group (n = 17)	Placebo group (n = 17)
Change in plasma homocysteine (mol/l) <sup>a</sup>						
After 1 month	-2.59 (2.27)**	-0.40 (1.65)	-2.64 (1.68)**	-1.02 (1.18)	-6.61 (6.42)	-2.09 (6.96)
After 3 months	-3.05 (2.13)**	-0.90 (1.51)	-2.85 (1.28)**	-0.83 (1.40)	-6.84 (8.42)*	4.87 (16.2)
Change in serum folic acid (ng/ml) <sup>a</sup>						
After 1 month	12.8 (5.28)**	0.23 (2.25)	11.6 (6.4)**	-0.08 (4.23)	7.85 (9.27)**	0.16 (1.33)
After 3 months	13.6 (4.42)**	-0.38 (2.45)	14.8 (4.86)**	-1.19 (4.74)	9.87 (7.94)**	-0.49 (2.22)

<sup>a</sup> Mean (SD) is indicated

\*P < 0.05; \*\* P < 0.01 for t test versus placebo group. Changes are evaluated from the baseline level in each group



Only folic acid group is shown. (Mean and SEM)

\* stand for p < 0.01 for trend test

These are significant even after being adjusted with age, BMI, smoking status, and alcohol consumption.

† stand for p < 0.01 for Tukey's post-hoc test of analysis of variance

Fig. 3 Differences between MTHFR C677T genotypes in the decrease of plasma total homocysteine (tHcy) in the folic acid group

## Discussion

We have shown that a significant lowering effect of tHcy was observed in the folic acid group in all the MTHFR C677T genotypes, and the degrees of lowering from the baseline level were almost the same at 1 and 3 months after the start of intervention. This indicates that tHcy lowering effect by folic acid supplementation 1 mg/day begins to plateau after 1 month or so. The main result of our study is that the effect size of tHcy reduction in the minor allele homozygote (TT genotype) is estimated to be 2.4× compared with that in the major allele homozygote. Since there are significant differences in baseline homocysteine levels between the TT genotype and the others, it is possible the baseline level per se influences the degree of change after the intervention. But the

greater decrease of tHcy in the TT genotype was not due to the higher baseline level. The change was still larger in the TT genotype, even if the difference of baseline was concerned (52.5% reduction in the TT versus 30.1% in the CC and 29.0% in the CT genotype). This observation suggests that not only the folate level but also the MTHFR genotype per se influences the responsiveness to folate supplementation. Since this polymorphism is thought to change the affinity of MTHFR to folate (Guenther et al. 1999), this speculation seems reasonable from the viewpoint of molecular mechanisms.

In addition to the fact that the MTHFR C677T polymorphism is very common in many ethnic groups [allele frequency is about 0.30–0.35 (Wilcken et al. 2003)], it is more important that the mild hyperhomocysteinemia caused by this polymorphism can be improved with folic acid supplementation. Folic acid intake can easily be fortified by trying to take more green vegetables or taking supplements. Venn et al. proved the natural folate intake (350 µg folate derived from food) significantly changed the serum folate status

in a randomized controlled trial in free-living subjects (Venn et al. 2002). This interaction between the MTHFR genotype and folic acid on the tHcy level is a typical gene-environmental interaction. Thus, this polymorphism is one of the ideal targets of tailor-made prevention from the viewpoint of a high-risk approach.

Since hyperhomocysteinemia is suspected as being a risk factor for many diseases (oral clefts, Down syndrome, placenta-mediated diseases, colorectal neoplasias, Alzheimer's disease, etc.) in addition to vascular diseases and neural-tube defects (Ray and Laskin 1999; Ames 1999; Botto and Yang 2000; Ueland et al. 2001; Ames et al. 2002; Quadri et al. 2004), this information is useful not only for the prevention of atherosclerosis but also for that of other diseases when considering a tailor-made preventative approach.

As for our secondary endpoints, we could not find clear results on PWV and ABI in 3 months of folic acid supplementation. There was a significant difference in the PWV at 1 month, demonstrated by the paired *t* test compared with the baseline in the folic acid group ( $P = 0.021$ ) but not at 3 months. The paired *t* test showed a significant difference in the ABI at 3 months compared with the baseline in the folic acid group ( $P = 0.015$ ) but not at 1 month. Furthermore, there were no significant differences between the folic acid and placebo groups in regard to changes in PWV and ABI after the intervention.

Since the PWV and ABI are not fine indices of atherosclerosis and vascular stenosis respectively, to detect any change in such a short period seems difficult. It is compatible with the previous report by Mangoni et al. (Mangoni et al. 2002) that 4 weeks of folic acid intervention (5 mg/day) did not change the PWV significantly in healthy cigarette smokers. It is also compatible with the previous report by Vermeulen et al. that 2 years of folic acid intervention (5 mg folic acid + 250 mg vitamin B6/day) did not change the ABI significantly in healthy siblings of patients with premature atherothrombotic disease (Vermeulen et al. 2000). Via lowering the tHcy (Homocysteine Lowering Trialists' Collaboration 1998; Vermeulen et al. 2000; Wald et al. 2001) or directly improving endovascular dysfunction (Mangoni et al. 2002), folic acid may improve the PWV and ABI, but 3 months does not seem long enough to detect any significant changes. Longer observation will be needed to clarify this association in Japanese.

Although Doshi et al. reported that folic acid reduces intracellular endothelial superoxide (Doshi et al. 2001) and Nakano et al. reported folic acid protects against oxidative modification of human LDL (Nakano et al. 2001), we could not find any clear results with folic acid supplementation on hsCRP. Although there was a significant decrease in the hsCRP level in the folic acid group at 3 months (paired *t* test,  $P = 0.041$ ) compared with the baseline level, the changes from baseline in the folic acid group and those in the placebo group were not different significantly (data not shown).

As has been pointed out by Folsom et al., the B vitamin status is not presumed to be a strong correlate of circulating levels of inflammatory markers (Folsom et al. 2003).

As for generalizability (external validity), these findings were based on the results of a study of healthy Japanese male workers. Whereas the allele frequency of this polymorphism is not so different among ethnic groups, the response to folic acid can be to some extent different. In addition, the baseline level of folic acid will be a more important factor. Dividing our data into the two groups using baseline folate levels (more or less than the median value), the baseline homocysteine levels were significantly different between the TT and CC genotypes only in the lower folate group but not in the higher folate group. So, it is possible the baseline level of folic acid influences the individual response to folate supplementation. The Food and Drug Administration in the United States mandated the fortification of cereal-grain products with folic acid to prevent neural-tube defects in 1996 (effective by January 1998) (US Food and Drug Administration 1996). According to the report of Jacques et al. (Jacques et al. 1999), plasma folate level changed from 4.6 to 10.0 ng/ml before and after the fortification (No B vitamin supplements users) using the data of the Framingham Offspring Study Cohort. The baseline level of our study subjects was 6.09 ng/ml (Table 1). Although such a national intervention is rather rare in the world, the difference in the baseline level of folic acid is very important, as is shown by significant heterogeneity between the results obtained in European populations compared with North American populations in the meta-analysis by Klerk et al. (Klerk et al. 2002).

As for side effects from folic acid supplementation, nothing remarkable was observed. In the dropouts from the folic acid group, one complained of a chilled sensation in the hands and one had numbness in the fingers. Since these complaints were not reported as far as we know, the association is unclear. None of the subjects showed any sign of vitamin B12 deficiency during the serum vitamin B12 monitoring. This finding has verified that oral folic acid supplementation is quite safe, at least for 3 months or so.

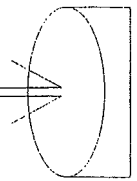
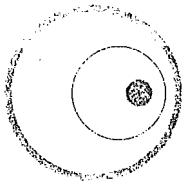
In conclusion, we report that the MTHFR C677T minor allele homozygote obtained a 2.4-fold beneficial decrease in tHcy levels compared with the major allele homozygote. Considering the high allele frequency of this polymorphism, the results of this quantitative assessment should be useful when considering tailor-made prevention of atherosclerosis with folic acid.

**Acknowledgements** This research was supported by the Ministry of Economy, Trade and Industry, Japan (R&D for practical use of university-based technology by matching government and private funds). We thank all staff and study participants. Koichi Miyaki conceived the study, designed the protocol, enrolled participants, participated in data collection and analysis, and drafted the manuscript. Mitsuru Murata was responsible for organization of the

genetic analyses, participated in data collection, and verified all results. Haruhito Kikuchi, Izumi Takei, and Kiyoaki Watanabe advised on important intellectual content for the concept of the study. Takeo Nakayama gave much valuable advice regarding study design. Kazuyuki Omae was responsible for the study design and organization, data interpretation, and overview of the project. All authors were involved in the data interpretation and contributed to the writing of the paper. The first author (Koichi Miyaki) had full access to all the data in the study and takes responsibility for the integrity of the data and the accuracy of the data analysis. No conflicts of interest exists, for any author.

## References

- Ames BN (1999) Cancer prevention and diet: help from single nucleotide polymorphisms. *Proc Natl Acad Sci USA* 96:12216-12218
- Ames BN, Elson-Schwab I, Silver EA (2002) High-dose vitamin therapy stimulates variant enzymes with decreased coenzyme binding affinity (increased  $K(m)$ ): relevance to genetic disease and polymorphisms. *Am J Clin Nutr* 75:616-658
- Botto LD, Yang Q (2000) 5,10-Methylenetetrahydrofolate reductase gene variants and congenital anomalies: a HuGE review. *Am J Epidemiol* 151:862-877
- Boushey CJ, Beresford SA, Omenn GS, Motulsky AG (1995) A quantitative assessment of plasma homocysteine as a risk factor for vascular disease. Probable benefits of increasing folic acid intakes. *JAMA* 274:1049-1057
- Brattstrom L, Wilcken DE, Ohrvik J, Brudin L (1998) Common methylenetetrahydrofolate reductase gene mutation leads to hyperhomocysteinemia but not to vascular disease: the result of a meta-analysis. *Circulation* 98:2520-2526
- Doshi SN, McDowell IF, Moat SJ, Lang D, Newcombe RG, Kredan MB, Lewis MJ, Goodfellow J (2001) Folate improves endothelial function in coronary artery disease: an effect mediated by reduction of intracellular superoxide? *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 21:1196-1202
- Folsom AR, Desvarieux M, Nieto FJ, Boland LL, Ballantyne CM, Chambless LE (2003) B vitamin status and inflammatory markers. *Atherosclerosis* 169:169-174
- Food and Drug Administration, HHS (1996) Food standards: amendment of standards of identity for enriched grain products to require addition of folic acid. *Fed Regist* 61:8781-8797
- Frost P, Blom HJ, Milos R, Goyette P, Sheppard CA, Matthews RG, Boers GJ, den Heijer M, Kluijtmans LA, van den Heuvel LP (1995) A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. *Nat Genet* 10:111-113
- Guenther BD, Sheppard CA, Tran P, Rozen R, Matthews RG, Ludwig ML (1999) The structure and properties of methylenetetrahydrofolate reductase from *Escherichia coli* suggest how folate ameliorates human hyperhomocysteinemia. *Nat Struct Biol* 6:359-365
- Hankey GJ, Eikelboom JW (1999) Homocysteine and vascular disease. *Lancet* 354:407-413
- Homocysteine Lowering Trialists' Collaboration (1998) Lowering blood homocysteine with folic acid based supplements: meta-analysis of randomized trials. *BMJ* 316:894-898
- Jacques PF, Selhub J, Bostom AG, Wilson PW, Rosenberg IH (1999) The effect of folic acid fortification on plasma folate and total homocysteine concentrations. *N Engl J Med* 340:1449-1454
- Klerk M, Verhoef P, Clarke R, Blom HJ, Kok FJ, Schouten EG, MTHFR Studies Collaboration Group (2002) MTHFR 677C → T polymorphism and risk of coronary heart disease: a meta-analysis. *JAMA* 288:2023-2031
- Lwin H, Yokoyama T, Date C, Yoshiike N, Kokubo Y, Tanaka H (2002) Are the associations between life-style related factors and plasma total homocysteine concentration different according to polymorphism of 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase gene (C677T MTHFR)? A cross-sectional study in a Japanese rural population. *J Epidemiol* 12:126-135
- Mangoni AA, Sherwood RA, Swift CG, Jackson SH (2002) Folic acid enhances endothelial function and reduces blood pressure in smokers: a randomized controlled trial. *J Intern Med* 252:497-503
- McCully KS (1969) Vascular pathology of homocysteinemia: implications for the pathogenesis of arteriosclerosis. *Am J Pathol* 56:111-128
- Moher D, Schulz KF, Altman DG. (2001) The CONSORT statement: revised recommendations for improving the quality of reports of parallel-group randomized trials. *Lancet* 357:1191-1194
- Nakano E, Higgins JA, Powers HJ (2001) Folate protects against oxidative modification of human LDL. *Br J Nutr* 86:637-639
- Nishio H, Lee MJ, Fujii M, Kario K, Kayaba K, Shimada K, Matsuo M, Sumino K (1996) A common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase gene among the Japanese population. *Jpn J Hum Genet* 41:247-251
- Quadri P, Fragiaco C, Pezzati R, Zanda E, Forloni G, Tettamanti M, Lucca U (2004) Homocysteine, folate, and vitamin B-12 in mild cognitive impairment, Alzheimer disease, and vascular dementia. *Am J Clin Nutr* 80:114-122
- Ray JG, Laskin CA (1999) Folic acid and homocyst(e)ine metabolic defects and the risk of placental abruption, pre-eclampsia and spontaneous pregnancy loss: a systematic review. *Placenta* 20:519-529
- Ubbink JB, Vermaak WJH, Bissbort S (1991) Rapid high-performance liquid chromatographic assay for total homocysteine levels in human serum. *J Chromatogr* 565:441-446
- Ueland PM, Hustad S, Schneede J, Refsum H, Vollset SE (2001) Biological and clinical implications of the MTHFR C677T polymorphism. *Trends Pharmacol Sci* 22:195-201
- Venn BJ, Mann JI, Williams SM, Riddell LJ, Chisholm A, Harper MJ, Aitken W (2002) Dietary counseling to increase natural folate intake: a randomized, placebo-controlled trial in free-living subjects to assess effects on serum folate and plasma total homocysteine. *Am J Clin Nutr* 76:758-765
- Vermeulen EG, Stehouwer CD, Twisk JW, van den Berg M, de Jong SC, Mackaay AJ, van Campen CM, Visser FC, Jakobs CA, Bulterjys EJ, Rauwerda JA (2000) Effect of homocysteine-lowering treatment with folic acid plus vitamin B6 on progression of subclinical atherosclerosis: a randomized, placebo-controlled trial. *Lancet* 355:517-522
- Wald DS, Bishop L, Wald NJ, Law M, Hennessy E, Weir D, McPartlin J, Scott J (2001) Randomized trial of folic acid supplementation and serum homocysteine levels. *Arch Intern Med* 161:695-700
- Wald DS, Law M, Morris JK (2002) Homocysteine and cardiovascular disease: evidence on causality from a meta-analysis. *BMJ* 325:1202
- Welch GN, Loscalzo J (1998) Homocysteine and atherothrombosis. *N Engl J Med* 338:1042-1050
- Wilcken B, Bamforth F, Li Z, Zhu H, Ritvanen A, Renlund M, Stoll C, Alembik Y, Dott B, Czeizel AE, Gelman-Kohan Z, Scarano G, Bianca S, Ettore G, Tenconi R, Bellato S, Scala I, Mutchinick OM, Lopez MA, de Walle H, Hofstra R, Joutchenko L, Kavteladze L, Bermejo E, Martinez-Frias ML, Gallagher M, Erickson JD, Vollset SE, Mastroiacovo P, Andria G, Botto LD (2003) Geographical and ethnic variation of the 677C > T allele of 5,10 methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR): findings from over 7000 newborns from 16 areas world wide. *J Med Genet* 40:619-625



# 血栓と循環の検査法

第 24 回 血小板機能シリーズ No.7

## PFA-100 による血小板凝集能測定

高橋 信一 第一製薬株式会社創薬第二研究所  
村田 満 慶應義塾大学医学部中央臨床検査部教授

Takahashi, Shinichi  
Murata, Mitsuru

### PFA-100 とは

PFA-100 (Platelet Function Analyzer) は、1995 年に Dade Behring 社から発売された比較的新しい血小板機能評価機であり、簡便かつ高感度を特徴とする(図 1)<sup>1)3)</sup>。血管壁への血小板の粘着および凝集、そして血小板血栓の形成を *in vitro* で再現するとされている。その測定原理を図 2 に示すが、高シア状態下(5000 ~ 6000/s)キャピラリーで吸引されて若干活性化した血小板<sup>4)</sup>が、2 種類の凝集誘起剤 [コラーゲンとエピネフリン(Col/EPI)もしくはコラーゲンと ADP (Col/ADP)] の塗布された膜に接触し、血小板血栓を形成することで膜孔を閉塞させる<sup>5)</sup>。形態観察によると、その際にできる血栓は、一部脱顆粒した血小板主体の血栓であり<sup>6)</sup>、血小板同士の接着にはフィブリノーゲンよりも VWF が大きな役割を果たしている<sup>6)</sup>。

Platelet rich plasma (PRP) を用いた血小板凝集機能検査の煩雑さや感度を改善するため、これまでに PA-200, RPFA, Cone-plate 法といった新しい血小板機能評価法が開発されてきた。それらの中で PFA-100 は、特に欧米で最も研究されている評価法の 1 つである。(なお、2005 年 8 月本稿作成時、日本では販売されていない)

### 使用方法および正常範囲

測定は採血後 4 時間以内に行う。1/10 容の 3.8% (もしくは 3.2%) クエン酸添加全血を 1 回の評価で 800  $\mu$ L 使用する。専用カートリッジは使い捨てで、凝集誘起剤の組み合わせにより、Col/EPI カートリッジ、Col/ADP カートリッジの 2 種

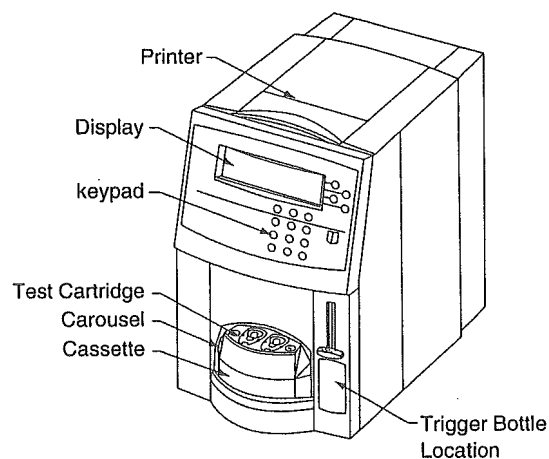


図 1 PFA-100

(文献 1 より改変引用)



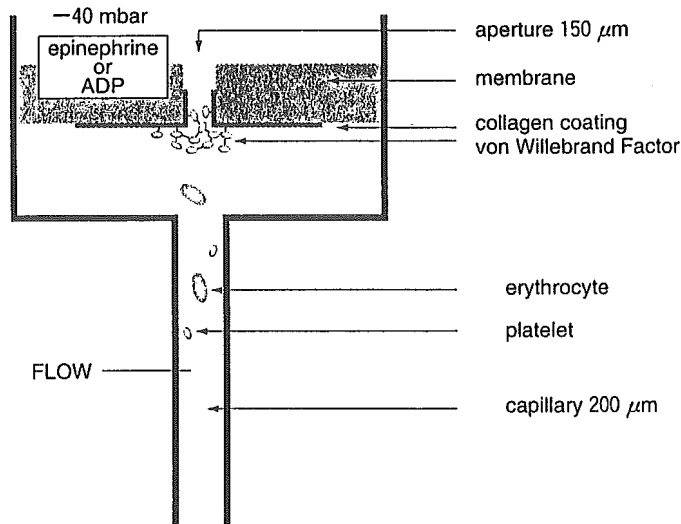


図2 カートリッジの断面図

(Dade Behring 社資料より改変引用)

類がある。最初に Col/EPI カートリッジを使用し、正常値から外れた場合、Col/ADP カートリッジを用いて原因を精査する、という使い方を製造元は提示している。

測定は非常に簡便で、特に訓練は必要ない。採血管からカートリッジに全血を移す際ピペット操作が必要であるものの、遠心分離操作の必要はなく、PRPを用いた一般的な血小板凝集検査に比べ使い勝手がよい。Dade Behring 社が発表している平均閉塞時間 [90% 範囲] は Col/EPI カートリッジが 124 秒 [85 ~ 165 秒]、Col/ADP カートリッジが 92 秒 [71 ~ 118 秒] であり、他グループの報告でも大きな違いはない<sup>7)</sup>。なお、300 秒がカットオフ時間として規定されており、1 回の測定 (2 サンプルの測定が可能) は 5 分から 15 分で完了する。試験誤差 (CV%) は、duplicate 測定間で 12% (Col/EPI)、10% (Col/ADP) 程度である<sup>8)</sup>。

### PFA-100 の臨床応用 —出血傾向の評価法として—

出血傾向の評価にはこれまで出血時間法が汎用されているが、必ずしも出血傾向と相関せず<sup>9)</sup>、感度の低さが問題となっている。そのため近年では本人および家族の出血歴の問診が重要視されている。

PFA-100 は一次止血を *in vitro* で再現する評価法とされており、出血時間法の代替になるかどうか検討されてきた。これまでの報告を総合すると、PFA-100 は、von Willebrand 病 (VWD) のスクリーニングとして出血時間法よりも検出感度がよい。ただし、PFA-100 の結果のみで診断に用いることはできず、PT、APTT など他の止血学的検査を含め様々な試験結果からの総合的な判断が必要である。一方、デスマプレッシン (DDAVP) 治療の薬効モニタリングの用途では、PFA-100 は感度

がよく、その有用性が認識されている (表 1)<sup>7)(10)(11)</sup>。

### PFA-100 の臨床応用 —薬効モニタリング法として—

PFA-100 は、血小板機能を抑制する薬剤の薬効モニタリングとしても汎用されている。一般的な用量・用法の結果、閉塞時間に影響を及ぼすかどうか、各々の薬剤の場合について表にまとめた (表 2)。

#### 1. アセチルサリチル酸 (アスピリン<sup>®</sup>)

血小板凝集抑制剤として最も使用されている薬剤の 1 つである。アスピリンは、Col/EPI カートリッジの閉塞時間を延長させ、その一方 Col/ADP カートリッジの閉塞時間は延長させない、という報告が多い<sup>12)(13)</sup>。Col/EPI カートリッジ閉塞時間の反応性が高感度であり、血小板凝集抑制の程度を簡便に数値化できることから、服薬状況および薬効のモニタリングに有効である。また近年、適切な服用にもかかわらず Col/EPI カートリッジ閉塞時間が延長しないケースをアスピリン不応症とした研究が多い<sup>14)(26)</sup>。

#### 2. チクロピジン (パナルジン<sup>®</sup>)、 クロピドグレル (Plavix<sup>®</sup> ; 本邦未承認)

チエノピリジン系抗血小板薬は P2Y<sub>12</sub> 受容体を非可逆的に阻害する。多くの報告では Col/EPI、Col/ADP いずれのカートリッジでも閉塞時間は延長しない<sup>15)</sup>。その一方、4 週間連続投与の結果、閉塞時間の延

表1 PFA-100による抗血小板/抗血栓作用の薬効モニタリング

薬剤名	薬効/阻害様式	Col/EPI カートリッジ	Col/ADP カートリッジ	参考文献
アスピリン	COX-1 阻害	+	-	12, 13
チクロピジン	P2Y <sub>12</sub> 受容体阻害	-	-	15, 18
クロピドグレル	P2Y <sub>12</sub> 受容体阻害	+ <sup>16)</sup> or - <sup>25)</sup>	+ <sup>8)</sup> or - <sup>25)</sup>	16, 25
アブシキシマブ	GPIIb/IIIa 阻害	ND	+	17, 18
インドメタシン	COX-1 阻害	+	ND	19, 21
メロキシカム	COX-2 阻害	+ <sup>21)</sup> or - <sup>19)</sup>	ND	19, 21
ヘパリン	抗凝固作用	-	-	7, 17, 18
ワルファリン	抗凝固作用	-	-	7

+: 閉塞時間延長, -: 閉塞時間延長せず  
ND: 参考文献に記載なし

表2 PFA-100の臨床応用と利点/欠点

臨床応用	利点	欠点
(1) 出血時間の代替法(スクリーニング)	出血時間より高感度, 高信頼性, 短時間で評価可能 簡便 低侵襲, 0.8 mL 全血で評価可能 4 時間後まで評価可能 VWD, 血小板機能欠損に高感度 ばらつきが小さい (健康人サンプルでは CV < 10%) 高シア依存で生理的条件に近い 正常値の場合, VWD および血小板無力症やベルナル・スーリエ症候群といった重篤な血小板機能障害の可能性を排除できる 薬物による血小板機能異常検出の感度が高い	単独で診断に用いることができない 原因疾患の特定はできない 条件が固定されおり変更不可 2 カートリッジ(2 条件)のみ クエン酸が必要 真空採血管での採血が結果に影響を与えることがある Type I VWD に偽陰性も 患者サンプルではばらつき大 カットオフ値付近の評価が難しい 血管壁の影響は考慮されない 異常値の場合, その他の試験と組み合わせ て判断が必要 異常値出現のためしばしば再検査が必要
(2) 止血療法のモニタリング	DDAVP による血管内皮由来 VWF 分泌に感受性有り 血小板輸血に感受性有り 凝固系異常の影響を受けず血小板機能異常を評価できる	血小板 VWF や高分子量 VWF の影響有り しばしば血小板数に影響する 血小板機能低下時の Factor VIIa 補充療法のモニタリング不可
(3) 抗血小板薬のモニタリング	アスピリンや NSAIDs が Col/EPI 閉塞時間を延長する	クロピドグレルの薬効確認ができない場合あり

(文献 10 より改変引用)

長がみられたとの報告もある<sup>16)</sup>.

果, Col/ADP カートリッジ閉塞時間を延長させる<sup>17)18)</sup>.

長が観察される<sup>19)</sup>.

### 3. アブシキシマブ(ReoPro® : 本邦未承認)

GPIIb/IIIa 阻害薬であるアブシキシマブは, 0.25 mg/kg ボーラス投与, 10 μg/h 12 時間持続投与の結

### 4. インドメタシン

インドメタシンは可逆的 COX-1 阻害薬である. 50 mg の 1 回投与で Col/EPI カートリッジ閉塞時間の延

### 5. メロキシカム(モービック®)

血小板に普段発現している COX のアイソザイムは COX-1 であり, 血小板におけるトロンボキサン A<sub>2</sub> 産生は COX-1 による. メロキシカ

ムは COX-2 阻害薬の 1 つであり、COX-1 阻害作用は弱い<sup>20)</sup>。そのため、アスピリンやインドメタシンと比べ、閉塞時間の延長は軽微<sup>21)</sup>または延長しない<sup>19)</sup>と報告されている。

## 6. ヘパリン、ワルファリン

凝固系の抑制は、上記のような抗血小板薬と異なり、閉塞時間への影響が少ないことが報告されている<sup>7)17)18)</sup>。

### 既存評価系との比較

VWD 検出の目的では、PFA-100 はテンプレート出血時間法よりも高感度に VWD を検出できる<sup>7)12)22)</sup>。これは、PFA-100 の特徴として、VWF 抗原量や VWF リストセチンコファクターへの感受性が高いためと考えられる。ただし、重篤度や VWD の型によって検出できないケースもあり、例えば、Type I で比較的軽微な症候の軽微なケースや、VWF-GPIb の正常な結合能を保つ Type 2N では閉塞時間は延長しないことが報告されている。トータルでは 9 割程度の VWD 検出成功率を示す<sup>7)</sup>。

また、VWD の止血療法として DDAVP が汎用される。その治療効果は PRP を用いた血小板凝集検査では確認できないが、PFA-100 では閉塞時間の短縮がみられ、薬効の確認が可能とされている<sup>23)24)</sup>。これも PFA-100 が VWF に感度よく反応するためと考えられている。

一方、薬剤感受性で既存評価系よりも鈍い場合がある。例えば、チクロピジンやクロピドグレルは、血小板凝集検査において ADP 刺激によ

る最大凝集率を抑制するが、PFA-100 の閉塞時間は延長しない場合が多い<sup>15)18)25)</sup>。

### 測定値の解釈の注意点—閉塞時間に影響を与える因子・与えない因子

PFA-100 は比較的新しい評価系であり、測定値に影響を及ぼす因子について注意深く認識しておく必要がある。閉塞時間に最も影響を与える因子として、VWF 抗原量および VWF リストセチンコファクター<sup>11)</sup>、採血時のクエン酸濃度<sup>8)26)</sup>が報告されている。低血小板数 ( $< 80 \times 10^9/l$ ) や低ヘマトクリット ( $< 30\%$ ) では閉塞時間が長くなる<sup>1)26)</sup>。年齢<sup>27)</sup>、喫煙<sup>28)29)</sup>は弱い相関があるとする報告もある。性差はほとんど影響を与えない<sup>27)28)</sup>。多少食い違う報告も散見されるが、評価条件や対象母集団(健常人 or 患者)の違いにより影響度が異なるからと考えられる。興味深いことに、フィブリノーゲンや第 V, VIII, IX, XI 凝固因子の影響はみられない<sup>7)26)</sup>。そのため、低フィブリノーゲン血症、異常フィブリノーゲン血症、血友病 A および B の評価に用いることはできない。

### 今後の展望

PFA-100 の臨床応用の 1 つとして抗血小板薬の薬効モニタリングを先に挙げた。それでは薬物によってどの程度の血小板機能抑制を維持すれば最大の効果(つまり将来におけるイベント再発の予防)を得ることができるだろうか? 残念ながら

PFA-100 を用いた大規模な臨床研究は未実施であり、今後の研究が期待される。

現在、ワルファリンなど一部の特別な薬剤を除き、薬効モニタリングは臨床の現場で一般的でない。PFA-100 は、操作が非常に簡便でかつモニタリング可能な薬剤も多いことから、血栓・循環領域での使用が一般的になるポテンシャルを持っていると考えられる。今後、薬効モニタリング研究が発達し、科学的根拠に基づいたより良い治療の結果、患者さんが恩恵を享受できるようになることを祈ってやまない。

### References

- 1) Kundu SK, Heilmann EJ, Sio R, et al : Description of an in vitro platelet function analyzer-PFA-100. *Semin Thromb Hemost* 21 (Suppl 2) : 106-112, 1995
- 2) Mammen EF, Alshameeri RS, Comp PC : Preliminary data from a field trial of the PFA-100 system. *Semin Thromb Hemost* 21 (Suppl 2) : 113-121, 1995
- 3) Kundu SK, Heilmann EJ, Sio R, et al : Characterization of an in vitro platelet function analyzer-PFA-100™. *Clin Appl Thromb Hemost* 2 : 241-249, 1996
- 4) Dunkley S, Harrison P. Platelet activation can occur by shear stress alone in the PFA-100 platelet analyser. *Platelets* 16 : 81-84, 2005
- 5) Poujol C, Nurden A, Paponneau E, et al : Ultrastructural analysis of the distribution of von Willebrand factor and fibrinogen in platelet aggregates formed in the PFA-100™. *Platelets* 9 : 381-389, 1998
- 6) Favalaro EJ, Facey D, Henniker A. Use of a novel platelet function analyzer (PFA-100) with high sen-

- sitivity to disturbances in von Willebrand factor to screen for von Willebrand's disease and other disorders. *Am J Hematol* 62 : 165-174, 1999
- 7) Favalaro EJ : Utility of the PFA-100 for assessing bleeding disorders and monitoring therapy : a review of analytical variables, benefits and limitations. *Haemophilia* 7 : 170-179, 2001
  - 8) Heilmann EJ, Kundu SK, Sio R, et al : Comparison of four commercial citrate blood collection systems for platelet function analysis by the PFA-100 system. *Thromb Res* 87 : 159-164, 1997
  - 9) Rodgers RP, Levin J : A critical reappraisal of the bleeding time. *Semin Thromb Hemost* 16 : 1-20, 1990
  - 10) Harrison P. The role of PFA-100 testing in the investigation and management of haemostatic defects in children and adults. *Br J Haematol* 130 : 3-10, 2005
  - 11) Fressinaud E, Veyradier A, Truchaud F, et al : Screening for von Willebrand disease with a new analyzer using high shear stress : a study of 60 cases. *Blood* 91 : 1325-1331, 1998
  - 12) Mammen EF, Comp PC, Gosselin R, et al : PFA-100 system : a new method for assessment of platelet dysfunction. *Semin Thromb Hemost* 24 : 195-202, 1998
  - 13) Homoncik M, Jilma B, Hergovich N, et al : Monitoring of aspirin (ASA) pharmacodynamics with the platelet function analyzer PFA-100. *Thromb Haemost* 83 : 316-321, 2000
  - 14) Cattaneo M. Aspirin and clopidogrel : efficacy, safety, and the issue of drug resistance. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 24 : 1980-1987, 2004
  - 15) Hezard N, Metz D, Nazeyrollas P, et al : PFA-100 and flow cytometry : can they challenge aggregometry to assess antiplatelet agents, other than GPIIb/IIIa blockers, in coronary angioplasty? *Thromb Res* 108 : 43-47, 2003
  - 16) Raman S, Jilma B : Time lag in platelet function inhibition by clopidogrel in stroke patients as measured by PFA-100. *J Thromb Haemost* 2 : 2278-2279, 2004
  - 17) Kottke-Marchant K, Powers JB, Brooks L, et al : The effect of antiplatelet drugs, heparin, and pre-analytical variables on platelet function detected by the platelet function analyzer (PFA-100). *Clin Appl Thromb Hemost* 5 : 122-130, 1999
  - 18) Hezard N, Metz D, Nazeyrollas P, et al : Use of the PFA-100 apparatus to assess platelet function in patients undergoing PTCA during and after infusion of c 7 E 3 Fab in the presence of other antiplatelet agents. *Thromb Haemost* 83 : 540-544, 2000
  - 19) van Kraaij DJ, Hovestad-Witterland AH, de Metz M, et al : A comparison of the effects of nabumetone vs meloxicam on serum thromboxane B 2 and platelet function in healthy volunteers. *Br J Clin Pharmacol* 53 : 644-647, 2002
  - 20) Grossman CJ, Wiseman J, Lucas FS, et al : Inhibition of constitutive and inducible cyclooxygenase activity in human platelets and mononuclear cells by NSAIDs and Cox 2 inhibitors. *Inflamm Res* 44 : 253-257, 1995
  - 21) de Meijer A, Vollaard H, de Metz M, et al : Meloxicam, 15 mg/day, spares platelet function in healthy volunteers. *Clin Pharmacol Ther* 66 : 425-430, 1999
  - 22) Marshall PW, Williams AJ, Dixon RM, et al : A comparison of the effects of aspirin on bleeding time measured using the Simplate method and closure time measured using the PFA-100, in healthy volunteers. *Br J Clin Pharmacol* 44 : 151-155, 1997
  - 23) Cattaneo M, Lombardi R, Bettiga D, et al : Shear-induced platelet aggregation is potentiated by desmopressin and inhibited by ticlopidine. *Arterioscler Thromb* 13 : 393-397, 1993
  - 24) Fressinaud E, Veyradier A, Sigaud M, et al : Therapeutic monitoring of von Willebrand disease : interest and limits of a platelet function analyser at high shear rates. *Br J Haematol* 106 : 777-783, 1999
  - 25) Grau AJ, Reiners S, Lichy C, et al : Platelet function under aspirin, clopidogrel, and both after ischemic stroke : a case-crossover study. *Stroke* 34 : 849-854, 2003
  - 26) Jilma B. Platelet function analyzer (PFA-100) : a tool to quantify congenital or acquired platelet dysfunction. *J Lab Clin Med* 138 : 152-163, 2001
  - 27) Sestito A, Sciahbasi A, Landolfi R, et al : A simple assay for platelet-mediated hemostasis in flowing whole blood (PFA-100) : reproducibility and effects of sex and age. *Cardiologia* 44 : 661-665, 1999
  - 28) Bock M, De Haan J, Beck KH, et al : Standardization of the PFA-100\* platelet function test in 105 mmol/l buffered citrate : effect of gender, smoking, and oral contraceptives-. *Br J Haematol* 106 : 898-904, 1999
  - 29) Brockmann MA, Beythien C, Magens MM, et al : Platelet hemostasis capacity in smokers. In vitro function analyses with 3.2 % citrated whole blood. *Thromb Res* 104 : 333-342, 2001

1. 抗血小板療法の基礎

# C. 血小板機能と遺伝子多型 (分子疫学的立場)



慶應義塾大学医学部内科専任講師 村田 満 (Murata, Mitsuru)

*THROMBOSIS and Circulation*

## § 論文のポイント

- [1] 血栓症には多くの後天的要因が関与するが、遺伝的要因を示唆する所見も少なくない。血小板機能の個体差の一部も遺伝的に決定されるといわれる。最近、血小板凝集能の家族性を示した興味深い報告がみられる。
- [2] 血小板膜糖蛋白は、凝集や粘着など血小板の重要な機能を担う受容体であり、これら膜糖蛋白にみられる遺伝的多様性(多型)は血小板機能の個体差と関連する可能性がある。
- [3] GPIa/IIa の多型はコラーゲン粘着能と、GPIb/IX/V 複合体の多型は VWF との反応性に、GPIIb/IIIa の多型は血小板凝集能や抗血小板薬の効果と、そして ADP 受容体 P2Y<sub>12</sub> の多型は血小板凝集能に影響する可能性が示唆されている。
- [4] 血小板受容体の遺伝子多型と血栓症発症率、重症度、治療効果などとの関連が報告されているが、いずれも確立された事実とはいいがたい。
- [5] 遺伝子多型が血小板機能の個体差やアスピリンをはじめとする抗血小板薬の感受性に影響する可能性が十分に考えられ、そのメカニズム解明に期待が寄せられる。

## § キーワード

血小板膜糖蛋白 / 遺伝子多型 / 血栓症 / 抗血小板薬 / アスピリン不応症

## 遺伝的要因による 血栓形成能の個体差

日本人には従来、血栓症が少ないとされてきた。しかし最近のデータでは日本での術後の深部静脈血栓症は整形外科領域で8.0～31.3%，婦人科領域では10.8%にみられており、欧米と比較してそれほど大きな差とは考えられない。血栓症には、多くの後天的要因が関与するが、若年発症者、家族内集積、ほかに危険因子を伴わない血栓症患者など、遺伝的要因を示唆する所見も少なくない。血小板機能の個体差の一部も遺伝的に決定されるといわれる。最近、血小板凝集能の家族性を示した興味深い報告がみられる。例えば健康人のADP、エピネフリン、コラーゲン凝集能を測定してみると、どの凝集惹起物質でも同胞では男-男、男-女、女-女、いずれの組み合わせでも凝集率はよく相関するが、同じ環境に生活する夫婦間では凝集率の相関は全くみられない(図1)<sup>2)</sup>。

## 血小板膜蛋白の 遺伝子多型と血小板機能

血小板膜糖蛋白の遺伝子多型の多くは血小板同種抗原(human platelet antigen: HPA)の原因として広く知られている。例えばGPIIbの843 Ile/SerはBak, GPIIaの33 Leu/ProはPI<sup>A</sup>, 143 Arg/GlnはPen, GPIb $\alpha$ の145 Thr/MetはSib(Ko)などの抗原名称が付けられている(図2)。いずれも凝集や粘着など血小板の重要な機能を担う受容体であるため、これら遺伝子多型が血小板機能の個体差に影響する可能

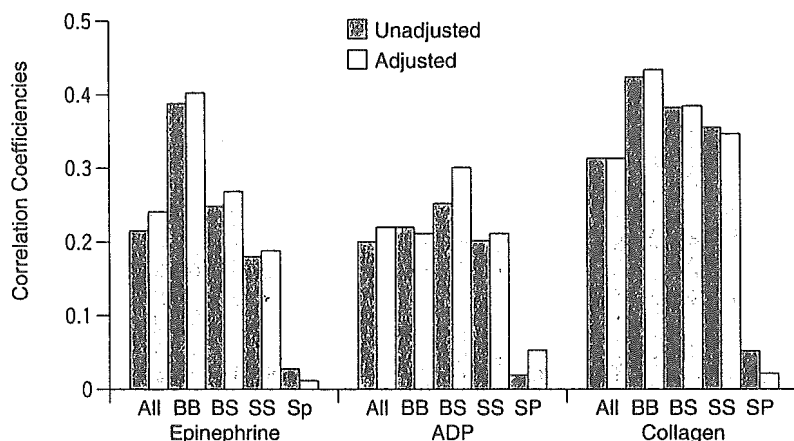


図1 血小板凝集能には遺伝的要因が強く関与する

BB: brother-brother, BS: brother-sister, SS: sister-sister, Sp: spouse pairs.  
(文献2より引用)

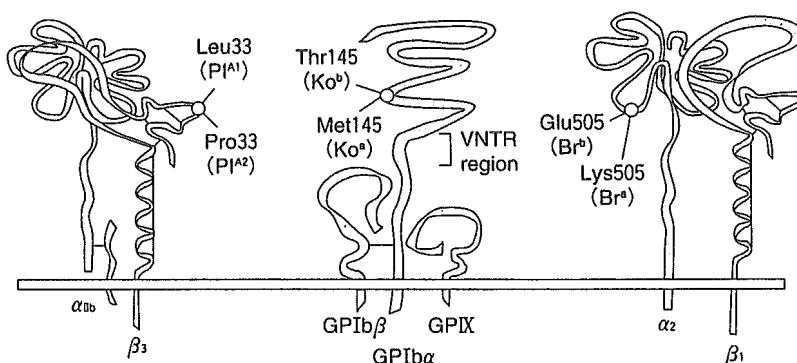


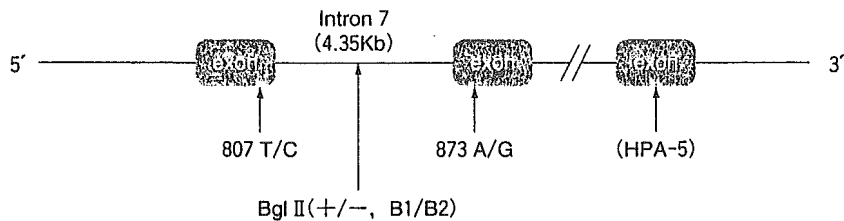
図2 血小板膜蛋白の代表的遺伝子多型

ある。遺伝子多型と血栓性疾患の関係は疫学的によく検討されているが、ここでは血小板機能に及ぼす影響を中心に述べる。

## GPIIa/IIa 複合体 (インテグリン $\alpha_2\beta_1$ )

GPIIa/IIa (インテグリン  $\alpha_2\beta_1$ )はコラーゲン受容体の1つで血小板のコラーゲンに対する粘着を司る。この受容体は主要な血小板膜受容体

のなかでは血小板膜上の発現量が少なく、しかも正常人での発現量の個体差が大きい。1997年、KunickiらはGPIIa/IIaの膜発現量の多様性が $\alpha_2$ サブユニットに存在する少なくとも3つの遺伝子多型と関連していると報告した<sup>3)</sup>。蛋白コード領域の807 T/C, 873 A/Gと、イントロン7のBgl II認識部位(+/-)であり、3者は連鎖不均衡にある(図3)。807 TやBgl II(+)-対立遺伝子を有



807(T/C), Bgl II(+/-), 873(A/G)の3つの多型は連鎖不均衡にある。

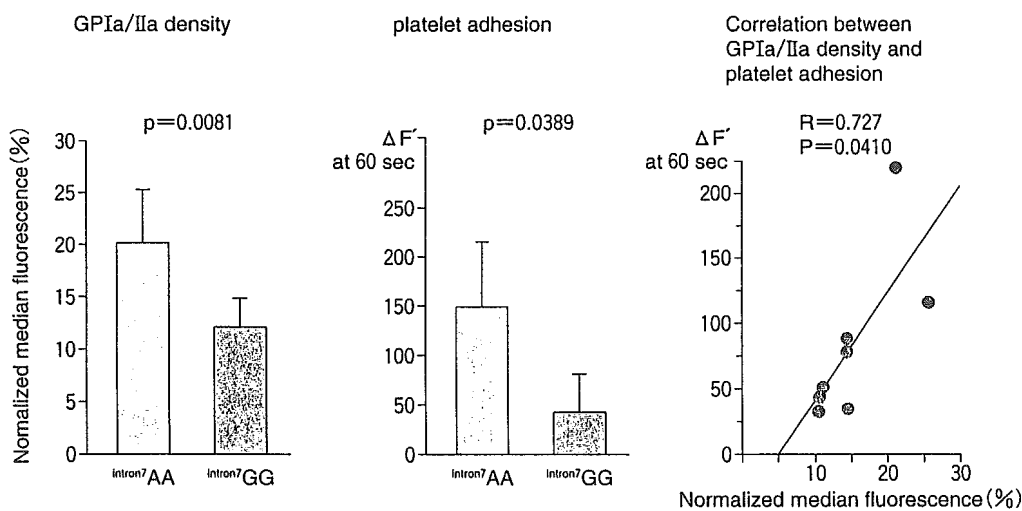


図3 血小板コラーゲン受容体( $\alpha_2\beta_1$  インテグリン)の $\alpha_2$ 遺伝子多型と、これらが蛋白発現量, 血小板コラーゲン粘着に与える影響

(文献3, 4より引用)

する個体は膜発現量が高く, 807 Cや Bgl II(-)対立遺伝子を有する個体は膜発現量が低い。これらの血小板機能に及ぼす影響が検討されたが, 予想どおり流動状態下での血小板コラーゲン粘着量は 807 Tや Bgl II(+ )対立遺伝子を有する血小板で高いことが示された(図3)<sup>15)</sup>。

Ia/IIa 複合体遺伝子多型は, ①出血性疾患有病者における出血症状の程度, ②血栓性疾患や血管障害の易罹病性, の2点から検討されている。前者では type 1 von Wille-

brand 病患者の出血症状は Ia/IIa 複合体遺伝子多型に一部依存すると報告されている。後者に関して, いくつかの報告があるが, 心筋梗塞や糖尿病性細小血管症との関連が示唆されている。

### GPIb/IX/V 複合体

GPIb/IX/V 複合体は VWF の膜受容体である。特に流速が速い血液の中では, GPIb/IX/V 複合体は血小板が内皮下組織への接触とその後の血

小板活性化を引き起こす tethering molecule として必須であり, 血小板血栓形成の初期段階を制御する分子として重要だと考えられている。

GPIb/IX/V 複合体には複数の遺伝子多型が知られている。なかでも GPIIb に存在する 3つの多型(145 Thr/Met, #399-411 の 13 アミノ酸配列の 1-4 回の反復多型, - 5 T/C 多型), がよく研究されている。

われわれは 145 Thr/Met および #399-411 の 13 アミノ酸反復多型と CAD との関連について検討し,

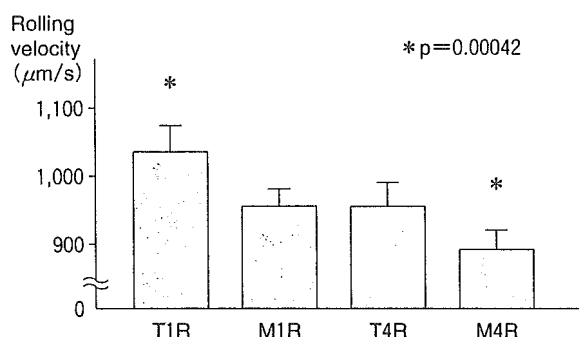


図4 種々遺伝子型の GPIIb/IIIa を発現する CHO 細胞が、固相化 VWF 上を rolling する速度(すり速度 114 s<sup>-1</sup>)

T1R : 145 Thr, VNTR 1 repeat  
 M1R : 145 Met, VNTR 1 repeat  
 T4R : 145 Thr, VNTR 4 repeat  
 M4R : 145 Met, VNTR 4 repeat

(文献7より引用)

Met-allele または 4-repeat allele が CAD の有病率, 重症度と関連があることを報告した<sup>9)</sup>。

通常の血小板機能検査で GPIIb/IIIa のこれら遺伝子多型による血小板機能の差は報告されていない。しかし *in vivo* では反復の多い分子は受容体の背が高いため高分子マルチマーである VWF と結合しやすい, 長い分子ほど発生する血小板内シグナルが強い, などのメカニズムが働いている可能性がある。最近われわれは 145 Thr/Met 多型と 1-repeat/4-repeat 多型を CHO 細胞で発現し, その VWF 結合能が異なる可能性を示した(図4)<sup>10)</sup>。すなわち, 心血管リスクとされる 145 Met または 4-repeat allele を有する GPIIb/IIIa では, CHO 細胞のすり速度下依存性 VWF 上 rolling の速度が低下することを明らかにした。

### GPIIb/IIIa 複合体 (インテグリン $\alpha_{IIb}\beta_3$ )

GPIIb/IIIa 複合体(インテグリン  $\alpha_{IIb}\beta_3$ )は血小板フィブリノゲン受容体であり, 血小板凝集に必須である。GPIIb/IIIa は血小板血栓形成における key molecule であることから, 抗血栓薬の標的となっており, 多数の抑制物質が開発されている。

33 Leu/Pro 多型の血小板機能に及ぼす影響については依然議論のあるところだが, Framingham Offspring Study では 1,442 人の血小板凝集能が測定されており, 33 Pro を有する個体では, 凝集惹起に必要な epinephrine 濃度が有意 ( $p < 0.001$ ) に低く, この傾向は 33 Pro をホモで有するものでより強かったとされている<sup>11)</sup>。このほか, 遺伝子型によるアスピリン効果の違いや抗 GPIIb-IIIa モノクローナル抗体 Reo Pro の効果の違いが報告されているが, いずれも確立された事実とはいえない

い。またこの多型は白人では血小板機能との関連で着目されているが, 日本人では対立遺伝子頻度は非常に低く, 臨床上問題とされることは少ない。

### ADP 受容体の 遺伝子多型と血小板機能

血小板にはいくつかの ADP 受容体が知られているが, このうち P2Y<sub>12</sub> は抗血小板薬チクロピジンやクロピドグレルの標的であり, その機能の個体差は臨床的に重要と思われる。健常人における ADP 凝集率が P2Y<sub>12</sub> 遺伝子型に影響されると最近報告された(図5)<sup>12)</sup>。

### いわゆるアスピリン不応症 の成因

抗血小板薬は動脈血栓症の再発予防や一部のハイリスク患者の一次予防に用いられ, その地位は EBM として確立されたものと考えられる。しかし一方では, その予防効果は不十分であり薬効は必ずしも満足できるものではない。抗血小板薬の臨床効果が不十分な原因の 1 つとして, いわゆる「アスピリン不応症」なる状態が認められることが近年判明している。事実, アスピリン不応症患者では実際に冠動脈疾患での再発率が高いことが最近報告された。不応のメカニズムとしてアスピリン吸収過程の個人差, 別の NSAIDs との競合, 血小板の turnover の促進, アスピリンへの反応性を弱める COX-1 の SNP の存在, 特定の病態下での COX-2 の発現, ADP 刺激時の GPIIb/IIIa の活性化反応性の上昇, コラーゲンへの反応性の上昇, など



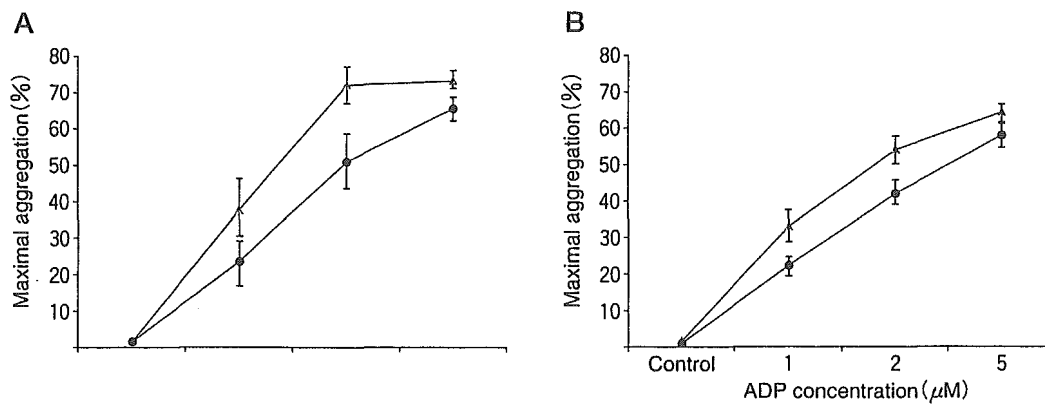


図5 ADP受容体遺伝子多型と血小板機能の関連

1, 2, または 5 μmol/L ADP による最大凝集率を示す。

▲: H2 haplotype を有する個体 (n = 10), ●: H2 haplotype を有さない個体 (n = 10), A: クエン酸添加 PRP, B: ヒルジンを添加 PRP.

(文献 9 より引用)

が提唱されているが、どれも決定的ではない。上述した遺伝子多型が血小板機能の個体差やアスピリンをはじめとする抗血小板薬の感受性に影響する可能性が十分に考えられ、今後の研究に期待が寄せられる。

#### References

- 1) 松本興治, 広瀬 一, 林 勝知, 他: 術後深部静脈血栓症に関する研究. 静脈学 5 : 163-170, 1994
- 2) O'Donnell CJ, Larson MG, Tofler GH, et al : Genetic and environmental contributions to platelet aggregation : the Framingham heart study. Circulation 103 : 3051-3056, 2001
- 3) Kunicki TJ, Kritzik M, Nugent DJ, et al : Hereditary variation in platelet integrin  $\alpha 2\beta 1$  density is associated with two silent polymorphisms in the  $\alpha 2$  gene coding sequence. Blood 89 : 1939-1943, 1997
- 4) 村田 満, 松原由美子: 遺伝子多型と疾患—血栓症—. 血液, 免疫, 腫瘍 6 : 63-70, 2001
- 5) 村田 満: 動脈血栓症と血小板膜糖蛋白遺伝子多型. 日本内科学会雑誌 89 : 47-54, 2000
- 6) Murata M, Matsubara Y, Ikeda Y, et al : Coronary artery disease and polymorphisms in a receptor mediating shear stress-dependent platelet activation. Circulation 96 : 3281-3286, 1997
- 7) Matsubara Y, Murata M, Ikeda Y, et al : Platelet glycoprotein Ib alpha polymorphisms affect the interaction with von Willebrand factor under flow conditions. Brit J Haematol 128 : 533-539, 2005
- 8) Feng D, Lindpaintner K, Larson D, et al : Increased platelet aggregability associated with platelet GPIIa/IIIa polymorphism. The Framingham offspring study. Arterioscler Thromb Vasc Biol 19 : 1142-1147, 1999
- 9) Fontana P, Dupont A, Gaussem P, et al : Adenosine diphosphate-induced platelet aggregation is associated with P2Y12 gene sequence variations in healthy subjects. Circulation 108 : 989-995, 2003

# 血栓性血小板減少性紫斑病

鈴木美佐子 村田 満

## 概念

血栓性血小板減少性紫斑病 (thrombotic thrombocytopenic purpura ; TTP) は1924年に Moschcowitz が初めて報告した疾患で血小板減少, 細小血管障害性溶血性貧血, 腎機能障害, 発熱, 動揺性精神神経症状の五徴候を特徴とする (表1)。一方, TTPとの鑑別が問題となる溶血性尿毒症症候群 (hemolytic uremic syndrome ; HUS) は血小板減少, 細小血管障害性溶血性貧血, 腎機能障害を主徴とする疾患である。

TTPとHUSは臨床症状と病態の類似性から血栓性細小血管障害 (thrombotic microangiopathy ; TMA) として1つのカテゴリーに属する疾患とされていた。その後, TTPの病因は von Willebrand 因子切断酵素 (VWF-cleaving protease ; VWF-CP, a disintegrin-like domain, and metalloproteinase, with thrombospondin type 1 motif 13 ; ADAMTS13) の活性低下であることが判明した。図1にTTPの発症機序を示す。先天性TTPではVWF-CP (ADAMTS13) の遺伝子変異により酵素活性が欠損しており, 後天性TTPではVWF-CP (ADAMTS13) に対してIgG型の自己抗体が存在するためにその酵素活性が低下, このため患者血漿中に超高分子量VWF複合体が存

表1 TTPの五徴

- ・血小板減少
- ・細小血管障害性溶血性貧血
- ・腎機能障害
- ・発熱
- ・動揺性精神神経症状

在, 血小板血栓を心臓, 腎臓, 脳などの細小動脈に形成する。

## 病型分類, 病因論的事項

表2に示すようにTTPは発症様式から家族性である先天性と非家族性である後天性に大別される。先天性TTPは遺伝的にVWF-CP (ADAMTS13) 活性が低下しており, インヒビターの存在によってVWF-CP (ADAMTS13) 活性が低下している後天性TTPとは区別される。先天性TTPのうち出生直後から重症の新生児黄疸を認め, 血小板減少や溶血性貧血を反復する早期発症型はUpshaw-Schulman症候群 (USS) と呼ばれる。また, 成人になるまで無症状で, 妊娠や感染を契機に発症する成人発症型の先天性TTPもある。後天性は原因不明である特発性と膠原病, 悪性疾患,

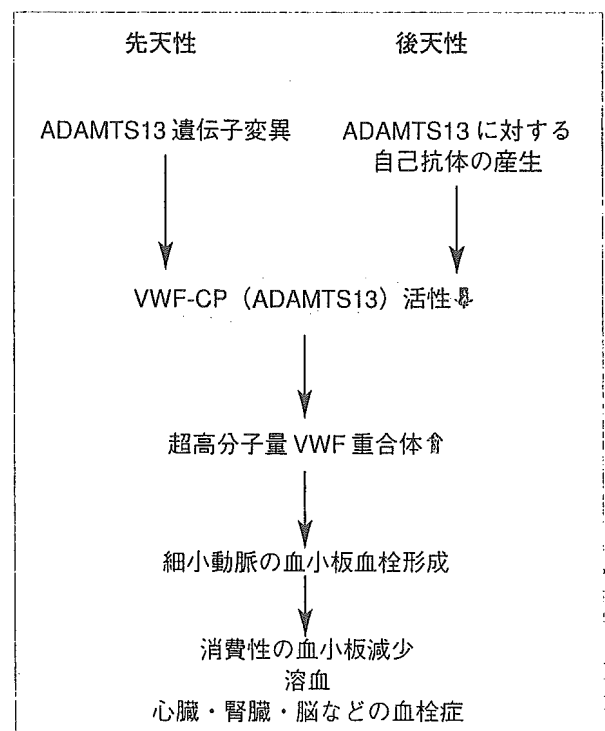


図1 TTPの発症機序

造血幹細胞移植，薬物（チクロピジン，バイアグラ<sup>®</sup>），ウイルス感染症や妊娠などに合併する二次性 TTP に分類されている。

## 主要症状

TTP に特徴的な症状としては前述の五徴として①点状出血，紫斑，歯肉出血，皮下出血などの血小板減少による出血傾向，②貧血症状，黄疸，血色素尿などの溶血性貧血症状，③腎機能障害（10%程度は急性腎不全に移行），④38℃前後の発熱，ときに40℃を超える高熱，⑤幻覚，妄想，せん妄，錯乱，意識障害，頭痛，四肢麻痺，構語障害，失語症，知覚障害，痙攣などの不安定で動揺する精神神経症状が挙げられる。消費性血小板減少による出血傾向はほぼ全例にみられる。精神神経症状は TTP の 90%において認められ，HUS との鑑別に重要である。

## 主要検査成績

### 細小血管障害性溶血性貧血

細小血管障害性溶血性貧血は免疫学的機序によらない溶血性貧血でありクームス試験は陰性である。末梢血液像における破碎赤血球や断片化赤血球（red cell fragmentation）の出

現，赤芽球，網状赤血球の増加，血清乳酸脱水素酵素，間接ビリルビン値の増加，血清ハプトグロビン値の減少などの所見がみられる。特に“fragmentation”は本疾患に特徴的所見であり，診断に非常に重要である。ただし破碎赤血球や断片化赤血球は症状出現後24～48時間は末梢血に出現しないことがあり留意する必要がある。

### 血小板数の低下

TTP の患者において消費性血小板数低下は必ずみられる所見である。

### 腎障害

TTP における腎障害では，中等度のタンパク尿を認めることが多い。尿中に細胞成分や円柱，尿潜血や赤血球円柱が認められることは少ない。

### VWF-CP (ADAMTS13) 活性とインヒビター

血漿を用いて VWF-CP (ADAMTS13) 活性とインヒビターを測定する方法としては VWF マルチマー解析に加え蛍光基質を用いた FRET-S-VWF73 が開発されている。後者に関しては間もなく大手検査センターで検査受託が開始されるものと思われる。

わが国での報告においても，後天性 TTP のうち特発性 TTP では VWF-CP (ADAMTS13) 活性は著減しており，高率にインヒビターを認めている。二次性 TTP ではインヒビターが存在し酵素活性が低下していたのは，薬物性と妊娠合併 TTP であり，造血幹細胞移植や悪性腫瘍に合併する TTP では酵素活性低下は軽度で自己抗体が存在しないものが多い。膠原病性 TTP では酵素活性は著減から正常まで様々で，インヒビターの陽性率も約 50%であった。VWF-CP (ADAMTS13) 活性，インヒビター測定は TTP / HUS の診断上非常に有用な検査ではあるが，これによる明確な病型分類は難しい。従来のように臨床症状の差異，すなわち精神神経症状の有無を重視して TTP と HUS の鑑別を行うべきと考えられている。

表 2 TTP の病型分類

先天性	後天性
ADAMTS13 遺伝子異常 (Upshaw-Schulman 症候群)	ADAMTS13 活性の低下を伴うもの <ul style="list-style-type: none"> <li>・特発性</li> <li>・薬剤</li> <li>・妊娠</li> <li>・HIV 感染</li> <li>・自己免疫疾患</li> <li>・血管内リンパ腫 (IVL)</li> <li>・肝疾患</li> </ul>
	ADAMTS13 活性の低下があまりみられないもの <ul style="list-style-type: none"> <li>・造血幹細胞移植</li> <li>・悪性腫瘍</li> </ul>

## 診断

### 先天性 TTP の診断

前述の五徴に加え、VWF-CP (ADAMTS13) に対するインヒビターを認めず VWF-CP (ADAMTS13) 活性の著減をみた場合、先天性 TTP を疑い、既往歴ならびに家族の VWF-CP (ADAMTS13) 活性測定を行う。近年続々と ADAMTS13 遺伝子変異が報告されており、今後、ADAMTS13 遺伝子解析が診断に貢献するようになると思われる。

### 後天性 TTP の診断

前述のように VWF-CP 活性ならびにその自己抗体価の測定法の確立は TTP の診断に大きく貢献しているものの、現時点では迅速検査が一般化されていない。実際の臨床の現場では早急な診断、治療開始が必須であり臨床症状から TTP を疑い、早期に血漿交換を導入し、症状経過をみていく。すなわち臨床症状、経過と VWF-CP (ADAMTS13) 活性、自己抗体価の測定結果を総合し、TTP と HUS、播種性血管内凝固症候群 (disseminated intra-vascular coagulopathy ; DIC) の鑑別ならびに TTP の病型分類を行う必要がある。

## 鑑別診断

TTP, HUS ならびに DIC では広範な微小血管内血栓形成により、臓器の循環障害をきたし、類似した臨床症状を示す。

HUS は血小板減少による下痢、血便などの出血傾向、溶血性貧血および急性腎不全を特徴とするが、TTP との鑑別が困難な症例もしばしばみられる。

DIC の症状は TTP, HUS と同様の出血症状に加え臓器症状として、脳神経症状 (昏睡, 痙攣), 循環器症状 (ショック), 呼吸器症状 (ARDS), 腎症状 (無尿, 乏尿), 消化器症状 (消化性潰瘍, 壊死に伴う下血), 貧血があるが基礎疾患による症状との判別が難しい。DIC において認められる検査所見としては、①血液凝固亢進 (トロンビン・アンチトロン

ビン複合体の高値, 可溶性フィブリンモノマー陽性, D-ダイマー高値), ②二次線溶亢進 (プラスミン・ $\alpha_2$ プラスミン・インヒビター複合体の高値, 血清 FDP 値の上昇), ③血栓形成に伴う血小板, 凝固線溶因子などの消費亢進 (血小板数減少, 血漿フィブリノーゲンの減少, プロトロンビン時間の延長), ④臓器の循環不全を反映するものが挙げられる。

TTP と HUS においては血小板減少を認める点では DIC と共通であるが、血液凝固亢進や二次線溶亢進の所見や凝固線溶因子などの消費亢進が認められることは少なく、この点が DIC と TTP, HUS を鑑別する上で重要である。

## 治療

### 先天性 TTP の治療法

治療法としては新鮮凍結血漿 (FFP) の輸注により VWF-CP の補充を行うことが唯一の治療法である。USS では 2~3 週に 1 度 FFP の輸注を反復継続している症例が多い。一方、成人発症型の TTP では発作時のみの FFP 輸注を要するが多い。

### 後天性 TTP の治療法

#### ●血漿交換

TTP は血漿交換が治療法として確立される以前は極めて予後不良の疾患と考えられてきたが、現在では発症早期から血漿交換を行うことで予後の改善傾向を認めている。血漿交換は患者血漿中の自己抗体と同時に血小板と反応する超高分子量 VWF 多量体をも除去し、不足している VWF-CP (ADAMTS13) を補充する効果、ならびに血管内皮障害や血小板活性化を助長する高サイトカイン血症を改善する効果がある。VWF-CP (ADAMTS13) 活性の著減のない症例でも血漿交換の有効性は認められており、発症早期から血漿交換を開始し病勢が安定するまで連日行うことが重要である。新鮮凍結血漿 (FFP) で通常 40~60ml / kg / 回の血漿交換を施行する。治療効果は血小板数の回復、精神神経症状の回復、