

図3 ずり応力下血小板血栓形成

野生型(+/+)およびADAMTS 13ホモ欠損マウス(-/-)より採取した血液を平行板型フローチャンバーに流し、固相化コラーゲン表面上での血栓形成を経時観察した(n=5、平均値±標準誤差)。ホモ欠損マウスでは、血小板血栓成長の亢進が認められた(*p<0.05)。

の症状が出現することを見出している。しかし、各個体のVWF量と症状に相関はなく、VWF以外の遺伝的要因が発症に関与したと推測される。彼らは、このマウスに志賀毒素を投与することで、TTP症状が顕在化することを見出した。また、塩化鉄処理による内皮細胞障害で、欠損マウスに顕著な血栓形成が認められることが、生体顕微鏡観察により示された¹⁴⁾。つまり、ADAMTS 13欠損によるVWF機能亢進に内皮機能障害が重なることで、TTPとなる可能性が示唆された。

おわりに

ADAMTS 13欠損マウスは易血栓

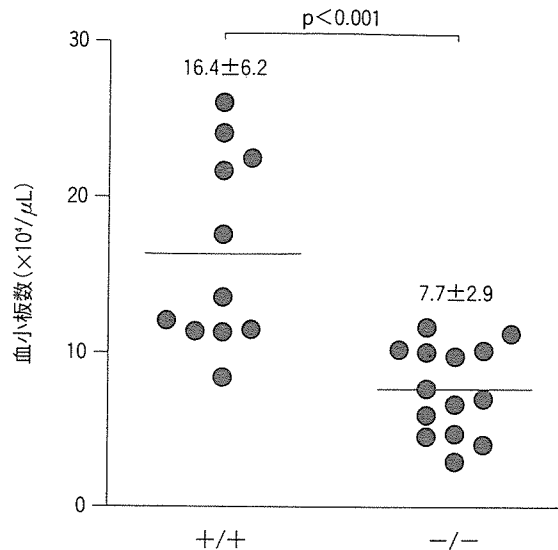


図4 コラーゲン誘発血小板減少モデル

野生型(+/+)およびADAMTS 13ホモ欠損マウス(-/-)の尾静脈からコラーゲン溶液を投与し、15分後の血小板数を測定した。未処理時の血小板数は群間で同等であったが(+/+、83.7 ± 3.3 × 10⁹/μL (n=4)；-/-、86.2 ± 3.3 × 10⁹/μL (n=4)；平均値±標準偏差)。コラーゲン静注後の血小板数はホモ欠損群で有意に低値を示した(+/+、16.4 ± 6.2 × 10⁹/μL (n=11)；-/-、7.7 ± 2.9 × 10⁹/μL (n=14)；p<0.001)。

形成傾向になっているものの、TTP症状を示さなかった。ヒトTTP患者のなかにも、妊娠によってはじめて症状が顕在化する先天性ADAMTS 13欠損症例¹⁵⁾、同じADAMTS 13変異を保有しながら発症時期や重症度が異なる症例¹⁶⁾¹⁷⁾など、ADAMTS 13欠損に加えて別の要因が発症に関わることを示す症例がある。これらの知見から、ADAMTS 13欠損はTTP発症の重大な要因であるが、十分条件ではないという見解が現在の主流となりつつある。TTP発症修飾要因の探索は、今後の重要な課題である。ADAMTS 13欠損マウスは、この要因の解明に有用と考えられる。

References

- 1) Fujikawa K, Suzuki H, McMullen B, et al : Purification of human von Willebrand factor-cleaving protease and its identification as a new member of the metalloproteinase family. *Blood* 98 : 1662-1666, 2001
- 2) Gerritsen HE, Robles R, Lämmle B, et al : Partial amino acid sequence of purified von Willebrand factor-cleaving protease. *Blood* 98 : 1654-1661, 2001
- 3) Soejima K, Mimura N, Hirashima M, et al : A novel human metalloproteinase synthesized in the liver and secreted into the blood : possibly, the von Willebrand factor-cleaving protease? *J Biochem (Tokyo)* 130 : 475-480, 2001
- 4) Zheng X, Chung D, Takayama TK,

- et al : Structure of von Willebrand factor-cleaving protease (ADAMTS 13), a metalloprotease involved in thrombotic thrombocytopenic purpura. *J Biol Chem* **276** : 41059-41063, 2001
- 5) Levy GG, Nichols WC, Lian EC, et al : Mutations in a member of the ADAMTS gene family cause thrombotic thrombocytopenic purpura. *Nature* **413** : 488-494, 2001
- 6) Federici AB, Bader R, Pagani S, et al : Binding of von Willebrand factor to glycoproteins Ib and IIb/IIIa complex : affinity is related to multimeric size. *Br J Haematol* **73** : 93-99, 1989
- 7) Furlan M, Robles R, Galbusera M, et al : von Willebrand factor-cleaving protease in thrombotic thrombocytopenic purpura and the hemolytic-uremic syndrome. *N Engl J Med* **339** : 1578-1584, 1998
- 8) Tsai HM, Lian EC : Antibodies to von Willebrand factor-cleaving protease in acute thrombotic thrombocytopenic purpura. *N Engl J Med* **339** : 1585-1594, 1998
- 9) Sadler JE, Moake JL, Miyata T, et al : Recent advances in thrombotic thrombocytopenic purpura. *Hematology (Am Soc Hematol Educ Program)* : 407-423, 2004
- 10) Kokame K, Matsumoto M, Soejima K, et al : Mutations and common polymorphisms in ADAMTS 13 gene responsible for von Willebrand factor-cleaving protease activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99** : 11902-11907, 2002
- 11) Banno F, Kaminaka K, Soejima K, et al : Identification of strain-specific variants of mouse Adamts 13 gene encoding von Willebrand factor-cleaving protease. *J Biol Chem* **279** : 30896-30903, 2004
- 12) Banno F, Kokame K, Okuda T, et al : Complete deficiency in ADAMTS 13 is prothrombotic, but it alone is not sufficient to cause thrombotic thrombocytopenic purpura. *Blood* **107** : 3161-3166, 2006
- 13) Motto DG, Chauhan AK, Zhu G, et al : Shigatoxin triggers thrombotic thrombocytopenic purpura in genetically susceptible ADAMTS 13-deficient mice. *J Clin Invest* **115** : 2752-2761, 2005
- 14) Chauhan AK, Motto DG, Lamb CB, et al : Systemic antithrombotic effects of ADAMTS 13. *J Exp Med* **203** : 767-776, 2006
- 15) Matsumoto M, Matsuyama T, Ishizashi H, et al : Upshaw-Schulman syndrome : A masqueraded thrombocytopenia during pregnancy. *Jpn J Obstet Gynecol Neonatal Hematol* **15** : 30-40, 2006
- 16) Furlan M, Lämmle B : Aetiology and pathogenesis of thrombotic thrombocytopenic purpura and haemolytic uraemic syndrome : the role of von Willebrand factor-cleaving protease. *Best Pract Res Clin Haematol* **14** : 437-454, 2001
- 17) Veyradier A, Lavergne JM, Ribba AS, et al : Ten candidate ADAMTS 13 mutations in six French families with congenital thrombotic thrombocytopenic purpura (Upshaw-Schulman syndrome). *J Thromb Haemost* **2** : 424-429, 2004

アルコール性肝炎における血漿 ADAMTS13 活性低下の機序 - サイトカインならびにインヒビターの面からの検討 -

奈良県立医科大学第三内科

松山 友美 植村 正人 石川 昌利 森岡 千恵 藤本 正男
櫻井 伸也 小嶋 秀之 吉治 仁志 福井 博

奈良県立医科大学輸血部

松本 雅則 石指 宏道 加藤 誠司 藤村 吉博

飛鳥病院精神科

瀧村 力

1. はじめに

アルコール性肝炎,特に重症アルコール性肝炎は,劇症肝炎に類似し,肝性脳症,急性腎不全,消化管出血などの多臓器不全を合併し,多くは1ヶ月以内に死亡する予後不良な疾患である^{1)~3)}が,その成因については,未だ十分解明されていない^{3)~6)}.

近年,止血因子である von Willebrand 因子 (VWF) を特異的に切断する酵素 ADAMTS13 (A Disintegrin-like And Metalloproteinase domain, with Thrombospondin type-1 motif 13) が,血栓性血小板減少性紫斑病 (TTP) の発症との関連で注目されている^{7)~10)}. ADAMTS13 は,血管内皮細胞で産生され血中に放出された超高分子量 VWF マルチマー (UL-VWFM) を分解する^{7)~10)}. 本酵素は主に肝臓で産生されるメタロプロテアーゼであるが,最近我々はこの酵素が肝星細胞で産生されることを明らかにした¹¹⁾. 本酵素が低下

した病態では,UL-VWFM が切断されず血小板 GPIb 受容体と反応し,血小板微小凝集塊を形成する結果,血小板減少とともに諸臓器の微小循環障害が惹起される^{7)~10)}.

現在まで,肝疾患において本酵素活性を検討した報告は少ない.血漿 ADAMTS13 活性は進行した肝硬変において低値を示す^{12),13)}が,我々は先天性胆道閉鎖症において,肝移植前低下していた ADAMTS13 活性が移植後には正常レベルにまで回復すること¹⁴⁾,造血幹細胞移植後の veno-occlusive disease (VOD) 合併例では移植前 ADAMTS13 活性が低下しており,本酵素活性が VOD 発症の予測因子となり得ること¹⁵⁾,生体肝移植後の虚血再還流障害や早期拒絶反応に ADAMTS13 活性の著明な低下が関与している可能性を報告した¹⁶⁾.

さらに,アルコール性肝炎,特に重症アルコール性肝炎において,ADAMTS13 活性が著減する

The mechanism of decreased activity of plasma ADAMTS13 in patients with alcoholic hepatitis- with special reference to inflammatory cytokines and inhibitor against ADAMTS13.

Tomomi Mstsuayama*¹, Masahito Uemura*¹, Masatoshi Ishikawa*¹, Masanori Matsumoto*², Hiromichi Ishizashi*², Seiji Kato*², Chie Morioka*¹, Masao Fujimoto*¹, Shinya Sakurai*¹, Hideyuki Kojima*¹, Hitoshi Yoshiji*¹, Chikara Takimura*³, Yoshihiro Fujimura*², Hiroshi Fukui*¹. *¹Third Department of Internal Medicine, and *²Department of Blood Transfusion Medicine, Nara Medical University, Kashihara, Nara, 634-8522, Japan. *³Asuka Hospital, Department of Psychiatry.

こと¹⁷⁾, その際, 本酵素の基質である VWF 抗原の著増と UL-VWFM の出現を確認し, 本酵素と基質の不均衡が, AH の進展ならびに SAH に伴う多臓器不全の発症に関与する可能性を指摘した^{17), 18)}. しかし, アルコール性肝炎において, 本酵素活性が低下する機序は未だ不明である.

今回, 血漿サイトカインならびに本酵素に対するインヒビターを測定し, アルコール性肝炎における ADAMTS13 活性低下の機序を検討した.

2. 対象と方法

(1) 対 象

対象はアルコール性肝炎 (alcoholic hepatitis ; AH) 28 例, 重症アルコール性肝炎 (severe alcoholic hepatitis; SAH) 5 例である. 両群共, 男性が大半を占め, SAH は AH に比して発症時年齢が低かった (表 1). AH の 11 例, SAH の全例が肝硬変を合併しており, SAH 5 例中 3 例が死亡した. SAH は AH に比し, 血清総ビリルビン, LDH, 白血球数, 好中球数, BUN および血清クレアチニンが高く, ヘモグロビン, 血小板数, 血清アルブミンおよびプロトロンビン活性が低値で

あった (表 1).

(2) ADAMTS13 活性, インヒビターおよび VWF 抗原の測定

全例入院時 (AH, SAH 極期) に ADAMTS13 活性, VWF 抗原を測定し, うち AH の 11 例, SAH の 3 例で経過を追って測定した. この際, 生存例は, 血清ビリルビンが正常値に復した時点あるいはトランスアミナーゼが正常値の 2 倍以内に低下した時点を回復期とした.

ADAMTS13 活性およびインヒビターの測定は, 既報⁸⁾の如く Furlan らの方法を一部改変し測定した. 健常人 60 例 (男性 30 例, 女性 30 例, 年齢 20-39 才) の本酵素活性は, $102 \pm 23\%$ (mean \pm SD) (n=60) であり, 健常者の平均値 - 2 SD に満たない 50% 以下を低値と評価した¹⁹⁾. インヒビター活性は非動化した患者血漿と基質血漿を等量に混和し, 37°C で 2 時間反応後, その残存酵素活性を測定した¹⁵⁾. インヒビター 1 Bethesda 単位 (BU/ml) とは ADAMTS13 活性を 50% に低下させる値と定義した²⁰⁾. VWF 抗原の測定は, 抗ヒト VWF 抗体 (Dako) を用いた ELISA にて行い, 健常人 54 例 (男性 30 例, 女性 24 例, 年齢

表 1 入院時検査所見

	アルコール性肝炎 (AH)	重症アルコール性肝炎 (SAH)	正常値
年齢	55.1 (23~67)	41.2 ^b (30~61)	
性別 (男/女)	26/2	4/1	
T.Bil (mg/dl)	4.4 (0.3~22.1)	13.5 ^c (8.0~24.3)	0.3~1.1
AST (IU/L)	180 (40~673)	320 (119~709)	12~32
ALT (IU/L)	116 (25~407)	87 (63~165)	5~36
LDH (IU/L)	278 (132~450)	538 ^c (283~836)	116~230
γ -GTP (IU/L)	670 (37~2388)	472 (145~1000)	11~69
WBC (/ μ l)	7474 (3000~17100)	12620 ^a (3500~26600)	3900~9800
Neutrophil (/ μ l)	5260 (1462~14877)	11345 ^c (3220~25004)	2000~7500
Hb (g/dl)	13.3 (9.1~17.0)	9.0 ^c (7.3~11.1)	13.5~17.6
Plat. ($\times 10^4$ / μ l)	16.8 (6.9~27.9)	8.8 ^a (2.8~16.4)	13.1~36.2
CRP (mg/dl)	1.2 (0.1~13.8)	4.0 (0.5~12.2)	0~0.6
Alb. (g/dl)	4.0 (2.3~4.9)	3.0 ^c (1.8~3.1)	3.8~5.0
PT (%)	83 (58~100)	36 ^c (27~39)	70~100
BUN (mg/dl)	17 (4~60)	33 ^a (11~89)	8~20
Cr. (mg/dl)	1.0 (0.6~1.8)	2.8 ^c (0.4~4.7)	0.3~0.9
肝硬変合併例	11	5	
死亡例	0	3	

^ap<0.05, ^bp<0.01, and ^cp<0.005 vs. AH

20-39 才) の測定値は $100 \pm 53\%$ (mean \pm SD) であった¹⁸⁾。なお、データは全て平均 \pm SD で表した。

(3) 血漿サイトカインの測定

血漿インターロイキン 6 (IL-6)、インターロイキン 8 (IL-8) および Tumor necrosis factor α (TNF α) 濃度は ELISA (BioSource International, USA) にて測定した。各サイトカインの正常値は、健常人 15 例で測定したが、全例 IL-6 は 7.8 pg/ml 以下、IL-8 は 15.6 pg/ml 以下および TNF α は 15.6 pg/ml 以下であった。

3. 結 果

(1) 血漿 ADAMTS13 活性, VWF および UL-VWFM

入院時、血漿 ADAMTS13 活性は健常人 $102 \pm 23\%$ に比し、AH $61 \pm 34\%$ ($p < 0.001$)、SAH $24 \pm 22\%$ ($p < 0.001$) と低値を示し、SAH は AH より有意 ($p < 0.02$) に低値であった¹⁷⁾。一方、VWF 抗原は健常人 $100 \pm 53\%$ に比し、AH $381 \pm 207\%$ ($p < 0.001$)、SAH $806 \pm 326\%$ ($p < 0.001$) と高値を示し、SAH は AH に比しさらに高値 ($p < 0.005$) を示した¹⁸⁾。結果として、VWF 抗原/ADAMTS13 活性比は、健常人 1.0 ± 0.6 に比し、AH 10.6 ± 11.6 、SAH 102.2 ± 112.6 ($p < 0.001$) と高値であり、特に SAH で著しく高値 ($p < 0.005$) を示した¹⁸⁾。さらに、UL-VWFM は、SAH 5 例中

4 例 (80%)、AH 28 例中 5 例 (17.9%) に認められた¹⁸⁾。

(2) 血漿サイトカイン

入院時、血漿 IL-6 濃度は健常人 (7.8 pg/ml 以下) に比し、AH 25 ± 32 pg/ml ($p < 0.05$)、SAH 504 ± 681 pg/ml ($p < 0.01$) と高値であり、SAH は AH より有意 ($p < 0.001$) に高値を示した (図 1)。血漿 IL-8 濃度は健常人 (15.6 pg/ml 以下) に比し、AH 37 ± 77 pg/ml と高値の傾向 ($p > 0.05$) にあり、SAH では 216 ± 304 pg/ml とさらに高値 ($p < 0.01$) を示し、SAH は AH より有意 ($p < 0.05$) に高値であった。血漿 TNF α 濃度は健常人 (15.6 pg/ml 以下) と AH 17 ± 6 pg/ml との間には差はみられなかったが、SAH では 29 ± 18 pg/ml と高値 ($p < 0.01$) を示し、SAH は AH に比し高値 ($p < 0.005$) であった (図 1)。回復期には、血漿サイトカインは AH の全例および SAH 生存例で低下した (IL-6 21 ± 14 pg/ml \rightarrow 12 ± 7 pg/ml, $p < 0.05$, IL-8 28 ± 18 pg/ml \rightarrow 15 ± 3 pg/ml, $p < 0.02$, TNF α 16 ± 2 pg/ml \rightarrow 15 ± 1 pg/ml) が、多臓器不全を合併して死亡した SAH 3 例中、経過を観察し得た 1 例ではさらに著増した (IL-6 563 pg/ml \rightarrow 1756 pg/ml, IL-8 211 pg/ml \rightarrow 322 pg/ml, TNF α 42 pg/ml \rightarrow 138 pg/ml)。

(3) 血漿サイトカイン濃度と ADAMTS13 活性との関係

入院時、血漿 ADAMTS13 活性は、血漿 IL-6

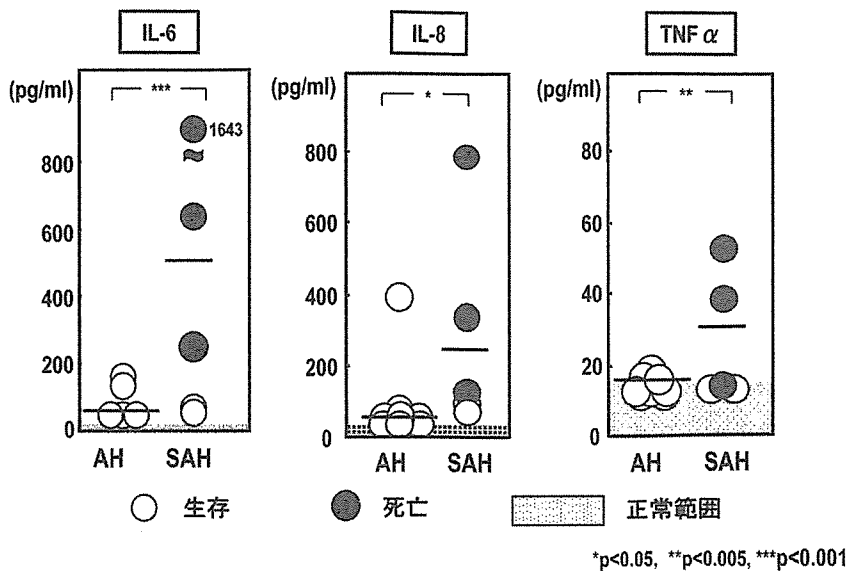


図 1 アルコール性肝炎における血漿サイトカイン (入院時)

濃度が正常範囲にある群では $68 \pm 31\%$ 、正常～100 pg/ml の群では $37 \pm 14\%$ ($p < 0.02$)、100 pg/ml 以上を示す群では $13 \pm 10\%$ ($p < 0.02$) と、IL-6 が上昇するにつれて ADAMTS13 活性は有意に低下した (図 2)。また、血漿 IL-8 濃度が正常範囲にある群の血漿 ADAMTS13 活性は $70 \pm 32\%$ 、正常～100 pg/ml の群では $37 \pm 14\%$ ($p < 0.02$)、100 pg/ml 以上を示す群では $9 \pm 7\%$ ($p < 0.005$) と、IL-8 が上昇するにつれて本酵素活性は低下した。さらに、TNF α 濃度が正常値以上を示す群の ADAMTS13 活性は $22 \pm 18\%$ と正常範囲にある群の $57 \pm 31\%$ に比して低値 ($p < 0.02$) であった (図 2)。

(4) 血漿サイトカイン濃度と VWF 抗原との関係

入院時、血漿 VWF 抗原は、血漿 IL-6 濃度が正常範囲にある群では $298 \pm 107\%$ 、正常～100 pg/ml の群では $509 \pm 232\%$ ($p < 0.005$)、100 pg/ml 以上を示す群では $624 \pm 394\%$ ($p < 0.001$) と、IL-6 が上昇するにつれて有意に増加した (図 3)。また、血漿 IL-8 濃度が正常範囲にある群の血漿 VWF 抗原は $309 \pm 107\%$ 、正常～100 pg/ml の群では $425 \pm 190\%$ ($p < 0.05$)、100 pg/ml 以上を示す群では $880 \pm 354\%$ ($p < 0.02$) と、IL-8 が上昇するにつれて増加した。さらに、TNF α 濃度が正常値以上を示す群の VWF

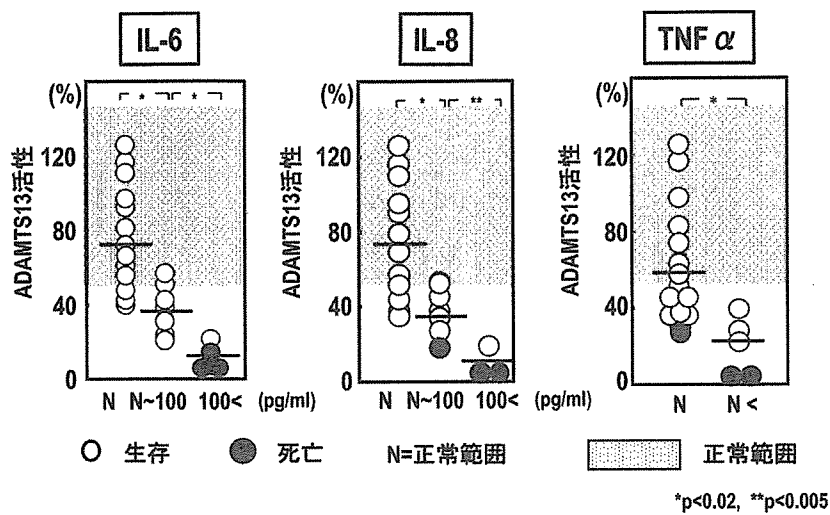


図 2 血漿サイトカインと ADAMTS13 活性 (入院時)

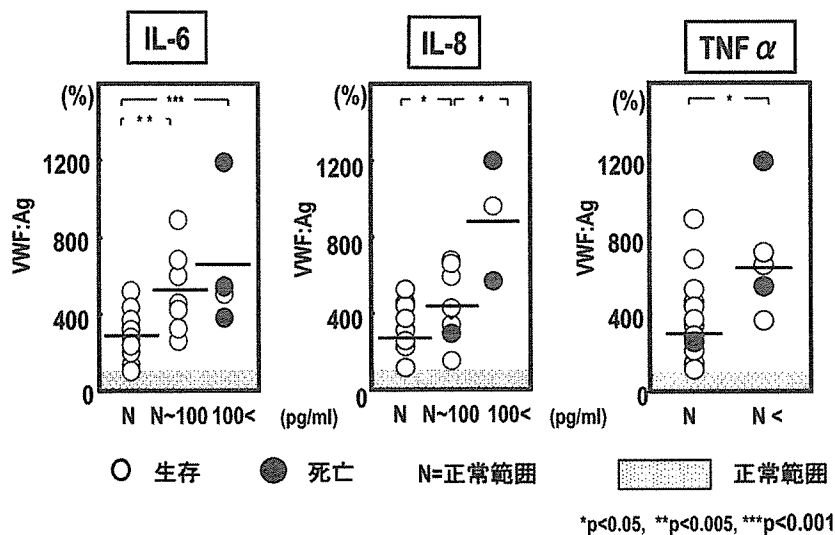


図 3 血漿サイトカインと VWF 抗原 (入院時)

抗原は $609 \pm 328\%$ と正常範囲にある群の $352 \pm 178\%$ に比して高値 ($p < 0.02$) であった (図 3).

(5) 血漿サイトカイン濃度と UL-VWFM との関係

入院時、血漿 ADAMTS13 活性が正常の 50% 以下を示す群において血漿 UL-VWFM の出現率と各種サイトカイン濃度との関係を検討したところ、血漿 IL-6 濃度が正常範囲にある群、正常～100 pg/ml の群の UL-VWFM の出現率は、いずれも 50% であるのに対し、IL-6 が 100 pg/ml 以上を示す群では 100% に達した (図 4). また、血漿 IL-8 濃度が正常範囲にある群、正常～100 pg/ml の群、100 pg/ml 以上を示す群の UL-VWFM の出現率は、それぞれ 30%, 70%, 100% と IL-8 濃度が上昇するにつれてより高率となった。さらに、TNF α 濃度が正常値以上を示す群は正常範囲にある群に比して UL-VWFM の出現率は高い傾向にあった (図 4).

(6) ADAMTS13 に対するインヒビター

入院時、ADAMTS13 に対するインヒビターは、SAH の 4 例 (80%) と AH の 6 例 (21.4%) に検出され、その際の力価は、SAH では平均 1.5 BU/ml (範囲; 0.9～2.1 BU/ml), AH では 1.0 BU/ml (0.5～1.6 BU/ml) であった (表 2). インヒビター陽性群は陰性群に比し血漿 ADAMTS13 活性は低値で、VWF 抗原および VWF 抗原/ADAMTS13 活性比は高値であった (ADAMTS13 活性; 26 ± 15 vs. $68 \pm 32\%$, $p < 0.001$, VWF 抗原; $609 \pm 316\%$ vs. $374 \pm 199\%$, $p < 0.01$, VWF 抗原

/ADAMTS13 活性比; 58.4 ± 88.2 vs. 7.3 ± 7.9 , $p < 0.02$) (図 5). さらに、AH インヒビター陰性群に比して、AH インヒビター陽性群および SAH インヒビター陽性群は、総ビリルビン (2.5 ± 4.0 mg/dl, 11.1 ± 10.0 mg/dl, $p < 0.005$, 10.0 ± 2.7 mg/dl, $p < 0.002$), 好中球数 (4063 ± 1750 μ l/mm³, 9093 ± 3367 μ l/mm³, $p < 0.001$, 7931 ± 4316 μ l/mm³, $p < 0.01$) および CRP (1.1 ± 2.1 mg/dl, 4.6 ± 4.9 mg/dl, $p < 0.02$, 4.3 ± 5.4 mg/dl, $p < 0.05$) は高値で、血清アルブミン (4.2 ± 1.1 mg/dl, 3.3 ± 1.2 mg/dl, $p < 0.02$, 3.1 ± 1.2 mg/dl, $p < 0.01$) は低値であった.

4. 考 察

我々は、AH、特に SAH において、ADAMTS13 活性の著しい低下と¹⁷⁾、本酵素の基質である VWF 抗原の著増が AH の進展ならびに SAH に伴う多臓器不全の発症に關与する可能性を指摘した^{17), 18)} が、本酵素活性低下の機序は未だ不明である。AH、特に SAH では、肝網内系機能不全と腸管の

表 2 ADAMTS13 に対する血漿インヒビター

	SAH	AH
陽性例	4/5 (80%*)	6/28 (21.4%)
力価(BU/ml)	1.5 (0.9～2.1)	1.0 (0.5～1.6)

* $p < 0.05$ vs. AH

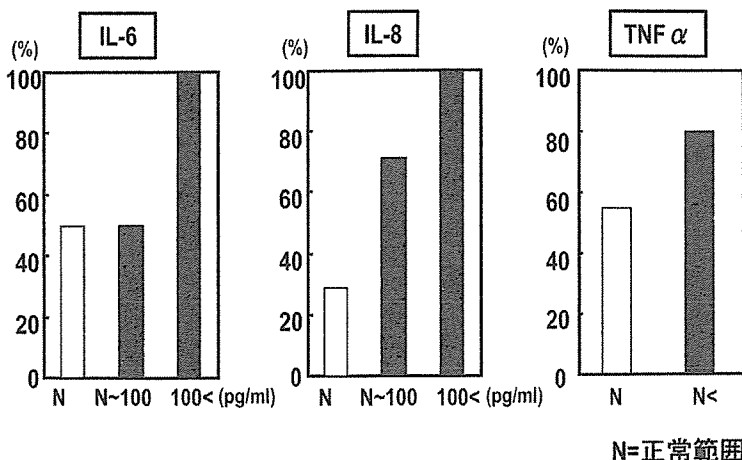


図 4 血漿サイトカインと UL-VWFM 出現率

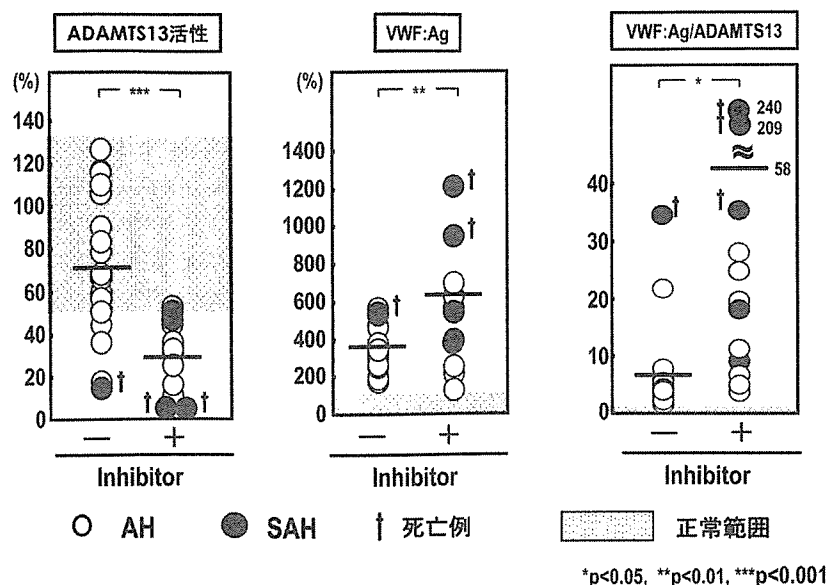


図5 インヒビターの有無と ADAMTS13 活性および VWF 抗原

透過性亢進に基づくエンドトキシン血症が、各種サイトカイン血症の引き金となり、全身炎症性反応 (systemic inflammatory response syndrome; SIRS)、微小循環障害を惹起させ、肝不全や多臓器不全に至らしめると考えられている^{3)~6)}。

そこで、まず炎症性サイトカインに注目し検討したところ、入院時 AH 特に SAH において、IL-6, IL-8, TNF α は著明に上昇し、回復期には AH の全例, SAH 生存例ではこれらサイトカインは低下したが、多臓器不全を合併して死亡した SAH 例ではさらに著増した。これらの結果は、炎症性サイトカインが AH および SAH の進展ならびに重症度と密に関連するという報告^{3)~5), 21), 22)} と一致する。これら炎症性サイトカインと ADAMTS13 活性との関係を検討すると、血漿 IL-6 および IL-8 濃度が、正常、正常~100 pg/ml, 100 pg/ml 以上と上昇するにつれて ADAMTS13 活性は有意に低下し、TNF α 濃度高値群は正常群に比して本酵素活性は低値であった (図 2)。一方、ADAMTS13 の基質である VWF 抗原は、血漿 IL-6, IL-8 濃度が正常、正常~100 pg/ml, 100 pg/ml 以上と上昇するにつれて増加し、TNF α 濃度高値群は正常群に比して高値であった (図 3)。さらに、血漿 UL-VWFM の出現率は、IL-6, IL-8, TNF α 濃度が増すにつれて上昇し、IL-6, IL-8 濃度が 100 pg/ml 以上群で

は全例に UL-VWFM が検出された (図 4)。以上の結果は、AH および SAH において、これら炎症性サイトカインの上昇が、血漿 ADAMTS13 活性の低下ならびに VWF 抗原の増加と密に関係することを示唆している。最近、Bernardo ら²³⁾ は、ヒト臍帯静脈由来の内皮細胞を用いて IL-6 が ADAMTS13 の作用を抑制し、IL-8, TNF α が内皮細胞からの UL-VWFM の放出を増強させることを報告し、炎症性サイトカインと ADAMTS13, VWF との関連が注目されている。アルコール性肝炎において、著明に上昇した炎症性サイトカイン、特に IL-8, TNF α は肝炎の重症度と相関し、死亡例では著増すること^{3), 21), 22)} から、これら増加した炎症性サイトカインが ADAMTS13 活性の低下と共に VWF 抗原, UL-VWFM の増加をもたらし、微小循環障害に伴う多臓器不全をもたらしている可能性が考えられる。

一方、ADAMTS13 活性を低下させる因子として、本酵素に対するインヒビターの存在が TTP の発症との関係で注目されている^{7)~10), 24)}。今回、ADAMTS13 に対するインヒビターは、SAH の 8 割, AH の 2 割に検出され、その際の力価は、SAH では平均 1.5 BU/ml, AH では 1.0 BU/ml であった (表 2)。この際、インヒビター陽性群は陰性群に比し血漿 ADAMTS13 活性は低値で、VWF 抗原および VWF 抗原 / ADAMTS13 活性

比は高値であった(図5)。さらに, AH インヒビター陽性群および SAH インヒビター陽性群は, AH インヒビター陰性群に比して, 総ビリルビン, 好中球数および CRP は高値で, 血清アルブミンは低値であった。これらの結果は, AH, 特に SAH における ADAMTS13 活性の低下は本酵素のインヒビターにより招来される可能性があり, インヒビターの出現が, AH の重症度と炎症反応の程度と密に関連していることを示唆している。我々は TTP を合併した肝硬変²⁵⁾ ならびにインターフェロン療法終了後に TTP を発症した C 型慢性肝炎²⁶⁾ において, ADAMTS13 活性の著明な低下とインヒビターの出現を確認しており, その際のインヒビター活性は, それぞれ 2.0 BU/ml, 1.6 BU/ml であった。また, 当大学輸血部に全国から測定依頼が寄せられた特発性 TTP108 例のうち, インヒビターの有無が検討された 68 例中 54 例 (79.4%) にインヒビターの存在が確認され, その際のインヒビター活性は 33 例 (61.1%) が 0.5 ~ 2.0 BU/ml, 残り 21 例 (38.9%) が 2.0 BU/ml 以上であった²⁴⁾。今回, AH ならびに SAH で検出されたインヒビター活性は 0.5 ~ 2.1 BU/ml であったが, この力価は血漿 ADAMTS13 活性を低下させるに十分なインヒビター活性と考えられる。

以上, AH, 特に SAH における ADAMTS13 活性低下は, 炎症性サイトカインの上昇ならびに本酵素に対するインヒビターの出現によりもたらされる可能性が示唆されたが, 今後, このインヒビターがどのようなタイプなのか, 血漿サイトカインとの関連のもとにさらに検討していく必要がある。

文 献

- 1) 高田 昭, 奥平雅彦, 大田康幸, 他. アルコール性肝障害に対する新しい診断基準案の提案. 肝臓 34:888-896, 1993.
- 2) 堀江義則, 石井裕正. 重症型アルコール性肝炎の全国調査. 日消誌. 99:1326-1333, 2002.
- 3) Ishii K, Furudera S, Kumashiro R, et al. Clinical and pathological features, and the mechanism of development in severe alcoholic hepatitis, especially in comparison with acute type fulminant hepatitis. Alcohol Alcohol 1B:97-103, 1993.
- 4) Menon KV, Gores GJ, Shah VH. Pathogenesis, diagnosis, and treatment of alcoholic liver disease. Mayo Clin Proc 76:1021-92, 2001.
- 5) 池島健一, 佐藤信敏. アルコール性肝障害の発生機序. 肝胆膵. 40:35-42, 2000.
- 6) Fukui H, Brauner B, Bode JC, et al. Plasma endotoxin concentrations in patients with alcoholic and non-alcoholic liver disease: reevaluation with an improved chromogenic assay. J Hepatol 12:162-169, 1991.
- 7) Tsai H-M, Lian ECY. Antibody to von Willebrand factor-cleaving protease in acute thrombotic thrombocytopenic purpura. New Engl J Med 339: 1585-1594, 1998.
- 8) Furlan M, Robles R, Solenthaler M, et al. Deficient activity of von Willebrand factor-cleaving protease in chronic relapsing thrombotic thrombocytopenic purpura. Blood 89:3097-3103, 1997.
- 9) Fujimura Y, Matsumoto M, Yagi H, et al. von Willebrand factor-cleaving protease and Upshaw-Schulman syndrome. Progress in Hematology. Int J Hematol 75:25-34, 2002.
- 10) 藤村吉博. VWF 切断酵素 (ADAMTS13) の動態解析による TTP/HUS 診断法の進歩. 日本内科学雑誌 93:451-459, 2004.
- 11) Uemura M, Tatsumi K, Matsumoto M, et al. Localization of ADAMTS13 to the stellate cells of human liver. Blood, 106:922-924, 2005.
- 12) Mannucci PM, Canciani MT, Forza I, et al. Changes in health and disease of the metalloproteinase that cleaves von Willebrand factor. Blood 98:2730-2735, 2001.
- 13) 植村正人, 福井 博, 松本雅則. 肝疾患と VWF-CPase. 血小板血栓形成の分子機構, 藤村吉博編, 医学書院, 東京, 2002, p160~163.
- 14) Matsumoto M, Chisuwa H, Nakazawa Y, et al. Living-related liver transplantation rescues reduced vWF-cleaving protease activity in patients with cirrhotic biliary atresia. Blood 96:636a (abstr.), 2000.
- 15) Park Y-D, Yoshioka A, Kawa K, et al. Impaired activity of plasma von Willebrand factor-cleaving protease may predict the occurrence of hepatic veno-occlusive disease after stem cell transplantation. Bone Marrow Transplant 29:789-794, 2002.
- 16) Ko S, Okano E, Kanehiro H, et al. Plasma ADAMTS13 activity may predict early adverse events in living donor liver transplantation: observations in 3 cases. Liver Transpl 12: 859-869, 2006.

- 17) Uemura M, Matsuyama T, Ishikawa M, et al. Decreased activity of plasma ADAMTS13 may contribute to the development of liver disturbance and multiorgan failure in patients with alcoholic hepatitis. *Alcohol Clin Exp Res*, 29:264S-271S, 2005.
- 18) Matsuyama T, Uemura M, Ishikawa M, et al. Increased von Willebrand Factor over decreased ADAMTS13 activity may contribute to the development of liver disturbance and multiorgan failure in patients with alcoholic hepatitis. *Alcohol Clin Exp Res* (in press).
- 19) Mori Y, Wada H, Gabazza EC, et al. Predicting response to plasma exchange in patients with thrombotic thrombocytopenic purpura with measurement of vWF- cleaving protease activity. *Transfusion* 42:572-80, 2002.
- 20) Kasper CK, Aledort L, Aronson D, Counts R, Edson JR, van Eys J, et al. A more uniform measurement of factor VIII inhibitors. *Thromb Diath Haemorrh* 34:869-872, 1975.
- 21) Mookerjee RP, Sen S, Davies NA, et al. Tumor necrosis factor alpha is an important mediator of portal and systemic haemodynamic derangements in alcoholic hepatitis. *Gut* 52:1182-1187, 2003.
- 22) Fujimoto M, Uemura M, Nakatani Y, et al. Plasma endotoxin and serum cytokine levels in patients with alcoholic hepatitis: Relation to severity of liver diseases. *Alcohol Clin Exp Res* 23:33S-38S, 2000.
- 23) Bernardo A, Ball C, Nolasco L, et al. Effects of inflammatory cytokines on the release and cleavage of the endothelial cell-derived ultralarge von Willebrand factor multimers under flow. *Blood* 104:100-106, 2004.
- 24) Matsumoto M, Yagi H, Wada H, et al. The Japanese experience with thrombotic thrombocytopenic purpura-hemolytic uremic syndrome. *Semin Hematol* 41:68-74, 2004.
- 25) Yagita M, Uemura M, Yamahara H, et al. Development of ADAMTS13 inhibitor in a patient with hepatitis C virus-related liver cirrhosis causes thrombotic thrombocytopenic purpura. *J Hepatol* 42:420-421, 2005.
- 26) Kitano K, Gibo Y, Kamiyo A, et al. Thrombotic thrombocytopenic purpura associated with pegylated-interferon alpha-2a by an ADAMTS13 inhibitor in a patient with chronic hepatitis C. *Haematologica*, 2006 (in press).

〈第 154 回日本臨床血液学会例会：三浦 修例会長 推薦演題〉

Rituximab 投与が奏効し，長期寛解を維持している 血漿交換抵抗性重症血栓性血小板減少性紫斑病

洪 鉉寿^{1(現2)}, 青山泰孝¹, 山村亮介^{1(現3)}, 太田忠信¹,
 麥谷安津子¹, 山根孝久², 日野雅之², 松本雅則⁴,
 藤村吉博⁴

症例は 57 歳の男性。一過性意識消失に伴う交通事故により搬送されたが，血小板減少，貧血，黄疸を認め入院となった。入院後に進行性精神神経症状，溶血性貧血，血小板減少，腎機能障害，発熱を認め TTP と診断された。治療前の ADAMTS13 活性は測定限界以下であり，そのインヒビターも検出された。度重なる血漿交換およびステロイドパルス療法を施行するも改善を認めなかったため，rituximab の投与を行ったところ，精神神経症状の消失，血小板増加，貧血の改善を認めた。以降，無治療で経過観察しているが 1 年以上再発を認めず，ADAMTS13 活性は正常化しインヒビターも陰性化している。TTP に対して血漿交換が標準的治療になっているが，血漿交換に不応性あるいは再燃を繰り返す難治性 TTP において rituximab は有効な治療法であるものと考えられる。(臨床血液 47 (12) : 1528~1532, 2006)

Key words : Rituximab, Thrombotic thrombocytopenic purpura, Plasmapheresis, ADAMTS13

緒言

血栓性血小板減少性紫斑病 (thrombotic thrombocytopenic purpura, TTP) は微小血管性溶血性貧血，血小板減少，精神神経症状，腎不全，発熱の 5 徴候を示す疾患であり，先天性と後天性に大別される。かつては急速に進行するため，予後不良の疾患として認識されていたが，血漿交換療法 (plasmapheresis, PP) が導入されたことによって救命率はそれ以前の 20% 台より 80% 台までに飛躍的な改善が得られた¹⁾。しかし PP に不応例や長期間寛解が得られず再燃を繰り返す難治性 TTP に対しては未だ治療法が確立されていない²⁾。近年，von Willebrand 因子 (vWF) 重合体の切断酵素である a disintegrin-like and metalloprotease with thrombospondin type1 motif 13 (ADAMTS13) の活性低下およびそれに対するインヒビターの存在が後天性 TTP の発症原因であることが明らかとなった。この ADAMTS13 インヒビター産生を抑制す

る目的で rituximab が難治性 TTP に用いられ，その有効性が報告されている。今回，難治性 TTP に対し rituximab を投与し，長期寛解が得られた症例を経験したので報告する。

症例

患者は 57 歳，男性。主訴は運転中の一過性意識消失発作，黄疸，下肢点状出血。既往歴・家族歴に特記すべき事はない。

現病歴：平成 16 年 8 月 10 日，軽トラックを運転中に一過性意識消失発作による接触事故を起こし，当院救急部に搬送された。搬送直後は意識清明，頭部 CT では異常所見を認めず，明らかな外傷も認めなかった。両下肢点状出血が著明であり，全身黄染が見られた。血小板減少および貧血が認められたため，血液疾患が疑われ当科入院となった。

入院時現症：身長 165 cm，体重 62 kg，血圧 130/82 mmHg，心拍数 72/min・整。眼球結膜は貧血状，眼瞼結膜に黄染を認めた。両下肢に広範囲な点状皮下出血斑あり。入院時，意識レベルは清明で精神，神経学的異常は認められなかった。

入院時検査所見 (Table 1)：血算では血小板減少および正球性貧血を認め，目視では破碎赤血球が観察された。

受付：2006 年 6 月 26 日

受理：2006 年 9 月 7 日

¹ 生長会府中病院血液内科

² 大阪市立大学大学院医学研究科血液病態診断学

³ 大阪府済生会中津病院血液内科

⁴ 奈良県立医科大学輸血部

Table 1 Laboratory findings

RBC	226×10 ⁴ /μl	TP	6.5 g/dl
Hb	7.3 g/dl	Alb	4 g/dl
Ht	20.9%	AST	46 IU/l
PLT	0.8×10 ⁴ /μl	ALT	20 IU/l
WBC	8800/μl	ALP	174 IU/l
Bas	1.0%	γ-GTP	27 IU/l
Eos	1.5%	Na	139 mEq/l
St	1.0%	K	4.1 mEq/l
Seg	68.0%	Cl	103 mEq/l
Lym	23.5%	Ca	8.9 mg/dl
Mon	4.5%	BUN	23.4 mg/dl
Others	0.5%	Cre	1.3 mg/dl
PT INR	1.4	UA	9.7 mg/dl
APTT	33.3 sec	LDH	1492 IU/l
FBG	414.0 mg/dl	Amy	97 IU/l
FDP	7.1 μg/ml	T-Bil	2.54 mg/dl
		D-Bil	0.5 mg/dl
		Haptoglobin	<10 mg/dl

生化学検査ではLDH、ビリルビンの上昇および軽度の腎障害が認められた。ハプトグロビンの著明な減少を認めた。凝固系に異常は認められなかった。

臨床経過 (Fig. 1): 入院直後に突然の意識混濁、暴言、異常行動、全身性痙攣などの精神神経症状を認めた。頭部CT、MRIでは脳梗塞、脳出血などの器質的異常は認められなかった。破碎赤血球、溶血性貧血に一致する血液・生化学所見、原因不明の精神神経症状および発熱、軽度の腎機能障害を認め、TTPと診断した。PP(新鮮凍結血漿 35単位を使用)開始、メチルプレドニゾロンパルス療法を併用した。入院後第9病日まで連日施行したところ、一時的に血小板上昇、臨床症状改善傾向を示したが、次第にPPに不応性となり、精神神経症状の増悪、血小板減少および溶血性貧血の遷延を認めた。奈良県立医科大学輸血部でADAMTS13活性を測定したところ、入院時のADAMTS13活性は3%以下と著減、またADAMTS13インヒビターが検出された(Fig. 2)。家人の承諾を得た後、第13病日よりADAMTS 13インヒビター抑制を目的としてrituximab (375 mg/m²)の投与を開始(4コース目までは週1回投与)、PPは3~5日間隔で第35病日まで併用した。3コース後の第31病日より血小板増加、LDH、ビリルビン低下を認め、4コース後には臨床的寛解に達した。精神神経症状は2コース後より改善傾向を認め、3コース後にほぼ消失した。ADAMTS13活性はrituximab投与開始前、頻回のPPに関わらず3%以下であった。しかし3コース後、ADAMTS13活性は上昇(8%)およびインヒビター消失が認められた。第60病

日に退院となったがADAMTS13活性低値が持続していたため、維持投与を行った(計7コース投与)。最終投与時(第80病日)のADAMTS13活性は32%であった(Fig. 3)。以降は無治療で再発を認めず、第420病日のADAMTS13活性は70%と正常域に達していた。

考 察

TTP患者の血漿中には分子量の大きい異常構造のvWF高分子重合体が形成され、この異常重合体の存在が血管内微小循環下で異常血小板凝集と関係し、血小板消費と赤血球破碎および破壊につながる³⁾。1996年、異常vWF高分子重合体を切断することによって血小板血栓の形成を防ぐvWF切断酵素の存在が明らかとなった。また後天性TTP患者の血清中に高率にこのvWF切断酵素に対するインヒビターが存在し、このインヒビターによる切断酵素活性低下が後天性TTPの病態の本質であることが報告された^{4,5)}。この酵素はADAMTS族に属するメタロプロテアーゼであることが判明しADAMTS13と命名された⁶⁾。MoriらはTTP74例中68例(92%)でADAMTS13活性低下(25%以下、正常値50%以上)、インヒビターは66例(89%)で認められたと報告⁷⁾、現在ではADAMTS13活性およびインヒビター測定がTTP病勢および治療効果判定の有力な指標とされている⁸⁾。Amanoらは重症TTP患者に対して血清濾過療法を利用したADAMTS13インヒビター選択的除去による有効例を報告したが⁹⁾、臨床的にはPPによるADAMTS13活性上昇、インヒビター消失、病状の改善が報告されており¹⁰⁾、

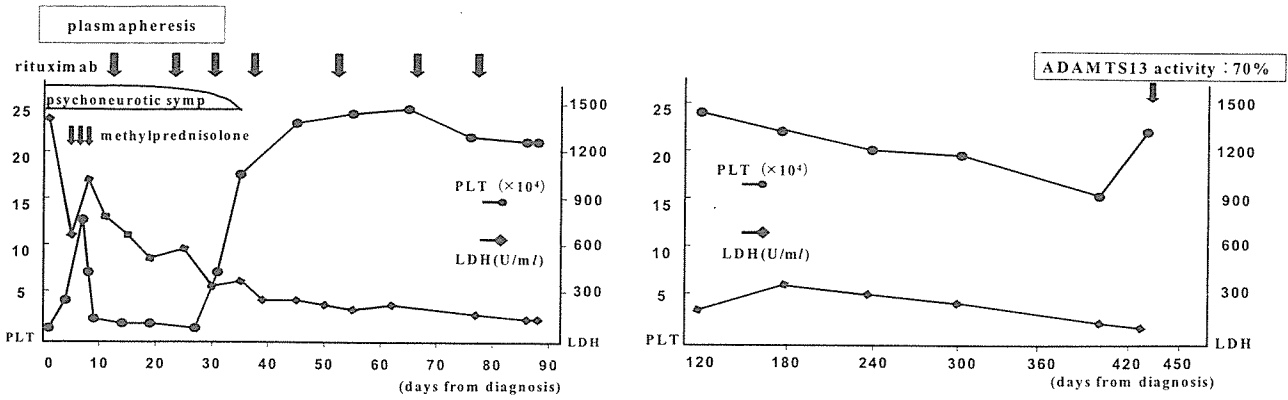


Fig. 1 Clinical course

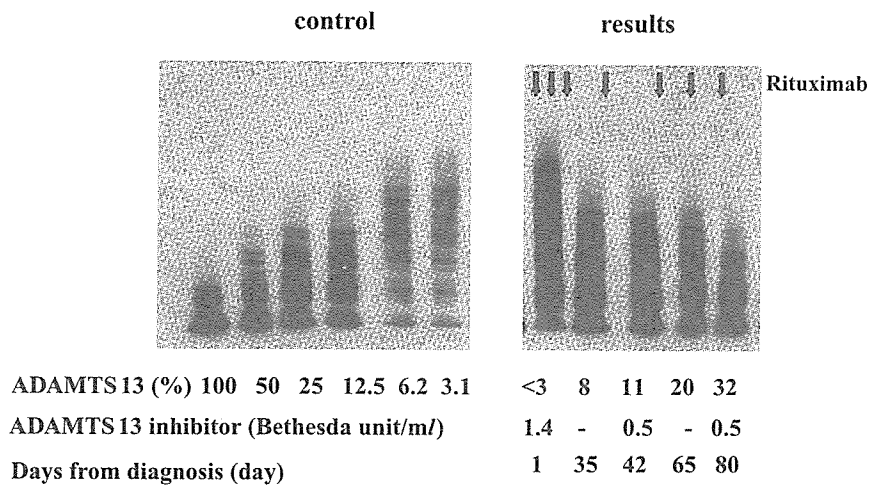


Fig. 2 Quantitative assay of ADAMTS 13 activity and its inhibitor from control and patient plasma.

ADAMTS 13 activity is expressed in percentage relative to that of normal plasma.

Plasma inhibitor of ADAMTS13 activity is expressed in terms of Bethesda Unit/ml

第一選択治療として推奨される。しかし本例のように ADAMTS13 活性低下、インヒビターが認められ、PP の効果が期待できたにもかかわらず不応例も見られる。このような難治性 TTP に対しては免疫抑制剤、脾摘あるいはγ-グロブリン療法などの治療が試みられているが、その治療成績に関しては一定の見解が得られていない。rituximab は B リンパ球表面抗原 CD20 に対するモノクローナル抗体であり B 細胞性リンパ増殖性疾患に使用されている。近年、自己免疫疾患および特発性血小板減少性紫斑病および自己免疫性溶血性貧血においてその有効性が報告されている¹¹⁾。自己免疫疾患に対する作用機序は rituximab が CD20 抗原に結合することで免疫学的な B 細胞傷害機序が亢進し、自己抗体産生が抑制されるためと考えられている。TTP が ADAMTS13 インヒビター産生による自己免疫疾患と考え、難治性 TTP に対して ritux-

imab 用いた報告が見られる¹²⁾。本例は PP およびステロイドパルス施行後、一時的に血小板増加、LDH 減少を認めるなど、病態改善が得られたが短期間内に再び悪化したことより、これらの治療に対して抵抗性を持っていると判断し、rituximab 投与を行った。投与後、ADAMTS13 活性上昇、インヒビター消失とともに臨床症状改善が見られたが、これらの効果が rituximab の単独効果によるものか、PP、ステロイドとの併用効果であったのかを厳密に区別することは困難であった。実際、rituximab 投与開始時期は定まっていなかった。Darabi らは頻回の PP、vincristine、ステロイド投与によっても一過性の効果しか認めず、第 11 病日および第 42 病日に rituximab を投与、その後も連日の PP およびステロイドを併用して寛解が得られた症例を報告した¹³⁾。彼らは rituximab 単独での治療効果を認めたとは断定できないものの rituximab

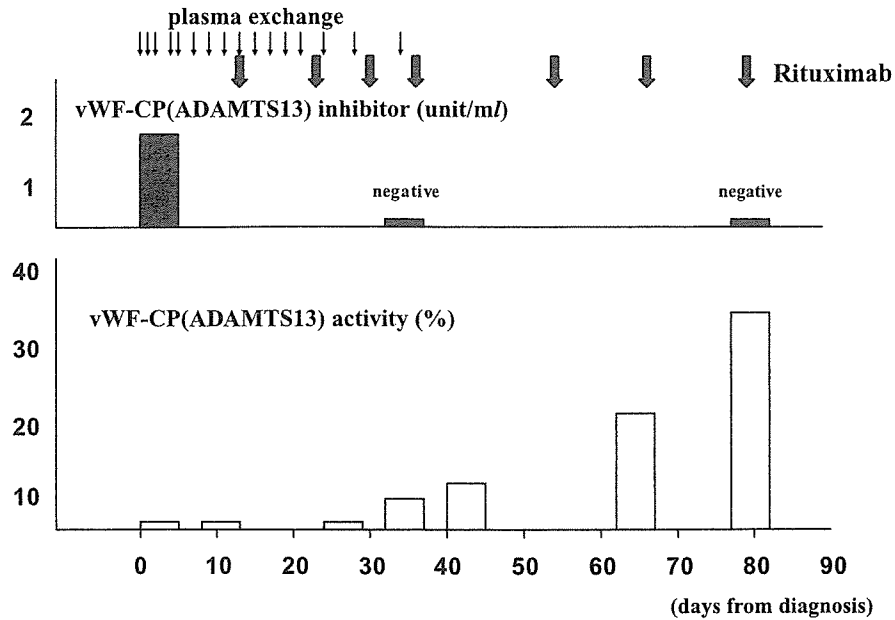


Fig. 3 Response of ADAMTS13 activity and its inhibitor in correlation with plasma exchange and rituximab therapy.

併用による治療効果はあったと考察している。本例では rituximab 投与開始後は PP 施行回数を減らし、またステロイド維持投与も行っておらず、治療効果に rituximab が大きく関与したものと考えられた。Niewold らは連日の血漿交換が一時的に効果的であったが短期間で再悪化したため 5 日後に rituximab 投与し効果を認めた TTP 2 症例を報告している¹⁴⁾。Ahamed らは ADAMTS13 インヒビター陽性であり 2 週間程度の血漿交換およびステロイド治療に効果が乏しい難治例に関しては早期に rituximab 投与を開始することを提唱している⁸⁾。

rituximab 投与後の効果発現時期については一定の傾向はない^{12, 15)}。本例は 3 回目の rituximab 投与後に臨床的寛解に至ったが ADAMTS13 活性は 8% と小幅な上昇に留まった。Bianchi らは ADAMTS13 活性 5% でも血管内血小板凝集は予防できると報告しており¹⁶⁾、本例もこの知見に合致するものと考えられた。また本例は臨床的寛解を得た後も rituximab 投与を続け計 7 コース行い、ADAMTS13 活性は第 420 病日に 70% と増加が得られた。Fakhouri らは難治性 TTP 11 例に rituximab 4 コース投与、6 ヶ月後には全例 ADAMTS13 活性上昇を認めたと、9 ヶ月後では 9 例中 6 例に ADAMTS13 活性の再低下が認められたことを報告している¹²⁾。従って本例で施行した rituximab 維持療法が長期寛解に有用である可能性は否定できない。

現在までの報告では TTP 患者への rituximab 投与による重大な副作用は報告されておらず、rituximab は難治性 TTP に有望な治療法の一つと考えられる。我々が検索

した範囲内では rituximab 単独で TTP 治療を行った臨床研究はなく、今後、他治療との併用のみならず rituximab 単独投与の有用性を検討する必要がある。

文 献

- 1) Rock GA, Shumak KH, Buskard NA, et al. Comparison of plasma exchange with plasma infusion in the treatment of thrombotic thrombocytopenic purpura. Canadian Apheresis Study Group. *N Eng J Med.* 1991; **325**: 393-397.
- 2) Rock G. The management of thrombotic thrombocytopenic purpura in 2005. *Semin Thromb Hemost.* 2005; **31**: 709-716.
- 3) Moake JL, Rudy CT, Troll JH, et al. Unusually large plasma factor VIII: von Willebrand factor multimers in chronic relapsing thrombotic thrombocytopenic purpura. *N Eng J Med.* 1982; **307**: 1432-1435.
- 4) Tsai HM, Lian EC. Antibodies to Von Willebrand factor-cleaving protease in acute thrombotic thrombocytopenic purpura. *N Eng J Med.* 1998; **339**: 1585-1594.
- 5) Furlan M, Robles R, Galbusera M, et al. von Willebrand factor-cleaving protease in thrombotic thrombocytopenic purpura and the hemolytic-uremic syndrome. *N Eng J Med.* 1998; **339**: 1578-1584.
- 6) Zheng X, Chung D, Takayama TK, et al. Structure of von Willebrand factor-cleaving protease (ADAMTS13), a metalloprotease involved in thrombotic thrombocytopenic purpura. *J Biol Chem.* 2001; **276**: 41059-41063.
- 7) Mori Y, Wada H, Gabazza EC, et al. Predicting response to plasma exchange in patient with thrombotic thrombocytopenic purpura with measurement of vWF-cleaving protease

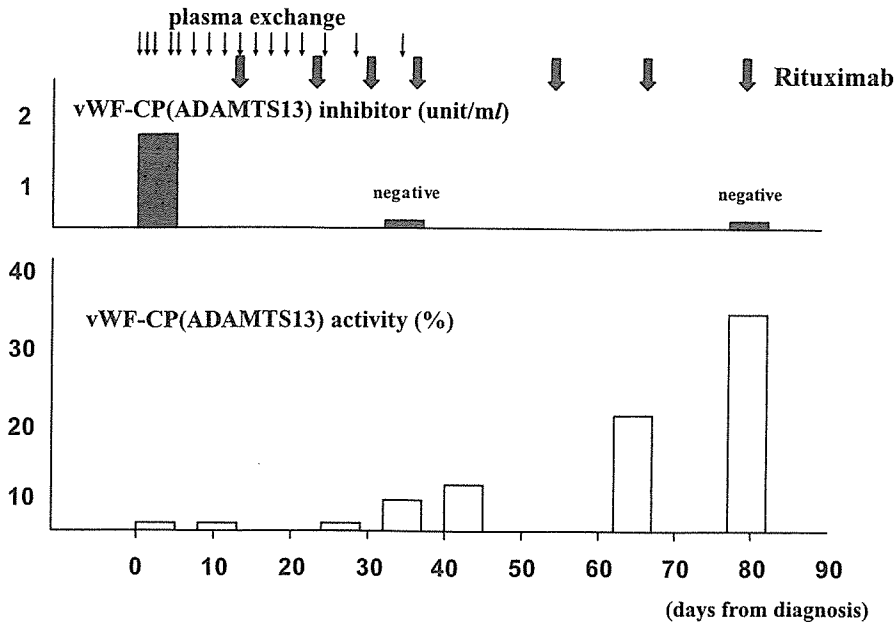


Fig. 3 Response of ADAMTS13 activity and its inhibitor in correlation with plasma exchange and rituximab therapy.

併用による治療効果はあったと考察している。本例では rituximab 投与開始後は PP 施行回数を減らし、またステロイド維持投与も行っておらず、治療効果に rituximab が大きく関与したものと考えられた。Niewold らは連日の血漿交換が一時的に効果的であったが短期間で再悪化したため 5 日後に rituximab 投与し効果を認めた TTP 2 症例を報告している¹⁴⁾。Ahamed らは ADAMTS13 インヒビター陽性であり 2 週間程度の血漿交換およびステロイド治療に効果が乏しい難治例に関しては早期に rituximab 投与を開始することを提唱している⁸⁾。

rituximab 投与後の効果発現時期については一定の傾向はない^{12, 15)}。本例は 3 回目の rituximab 投与後に臨床的寛解に至ったが ADAMTS13 活性は 8% と小幅な上昇に留まった。Bianchi らは ADAMTS13 活性 5% でも血管内血小板凝集は予防できると報告しており¹⁶⁾、本例もこの知見に合致するものと考えられた。また本例は臨床的寛解を得た後も rituximab 投与を続け計 7 コース行い、ADAMTS13 活性は第 420 病日に 70% と増加が得られた。Fakhouri らは難治性 TTP 11 例に rituximab 4 コース投与、6 ヶ月後には全例 ADAMTS13 活性上昇を認めたが、9 ヶ月後では 9 例中 6 例に ADAMTS13 活性の再低下が認められたことを報告している¹²⁾。従って本例で施行した rituximab 維持療法が長期寛解に有用である可能性は否定できない。

現在までの報告では TTP 患者への rituximab 投与による重大な副作用は報告されておらず、rituximab は難治性 TTP に有望な治療法の一つと考えられる。我々が検索

した範囲内では rituximab 単独で TTP 治療を行った臨床研究はなく、今後、他治療との併用のみならず rituximab 単独投与の有用性を検討する必要がある。

文 献

- 1) Rock GA, Shumak KH, Buskard NA, et al. Comparison of plasma exchange with plasma infusion in the treatment of thrombotic thrombocytopenic purpura. Canadian Apheresis Study Group. *N Eng J Med.* 1991; **325**: 393-397.
- 2) Rock G. The management of thrombotic thrombocytopenic purpura in 2005. *Semin Thromb Hemost.* 2005; **31**: 709-716.
- 3) Moake JL, Rudy CT, Troll JH, et al. Unusually large plasma factor VIII: von Willebrand factor multimers in chronic relapsing thrombotic thrombocytopenic purpura. *N Eng J Med.* 1982; **307**: 1432-1435.
- 4) Tsai HM, Lian EC. Antibodies to Von Willebrand factor-cleaving protease in acute thrombotic thrombocytopenic purpura. *N Eng J Med.* 1998; **339**: 1585-1594.
- 5) Furlan M, Robles R, Galbusera M, et al. von Willebrand factor-cleaving protease in thrombotic thrombocytopenic purpura and the hemolytic-uremic syndrome. *N Eng J Med.* 1998; **339**: 1578-1584.
- 6) Zheng X, Chung D, Takayama TK, et al. Structure of von Willebrand factor-cleaving protease (ADAMTS13), a metalloprotease involved in thrombotic thrombocytopenic purpura. *J Biol Chem.* 2001; **276**: 41059-41063.
- 7) Mori Y, Wada H, Gabazza EC, et al. Predicting response to plasma exchange in patient with thrombotic thrombocytopenic purpura with measurement of vWF-cleaving protease

- activity. *Transfusion*. 2002; **42**: 572-580.
- 8) Ahmad A, Aggarwal A, Sharma D, et al. Rituximab for the treatment of refractory/relapsing thrombotic thrombocytopenic purpura. *Am J Hematol*. 2004; **77**: 171-176.
 - 9) Amano SY, Inoue M, Yoshida Y, et al. Intensive plasma IgG removal therapy for severe thrombotic thrombocytopenic purpura. *Int J Hematol*. 2002; **76**: 474-476.
 - 10) Zheng XL, Kaufman RM, Goodnough LT, Sadler JE. Effect of plasma exchange on plasma ADAMTS13 metalloprotease activity, inhibitor level, and clinical outcome in patients with idiopathic and nonidiopathic thrombotic thrombocytopenic purpura. *Blood*. 2004; **103**: 4043-4048.
 - 11) Stasi R, Pagano A, Stipa E, Amadori S. Rituximab chimeric anti-CD20 monoclonal antibody treatment for adults with chronic idiopathic thrombocytopenic purpura. *Blood*. 2001; **98**: 952-957.
 - 12) Fakhouri F, Vernant JP, Veyradier A, et al. Efficiency of curative and prophylactic treatment with rituximab in ADAMTS13-deficient thrombotic thrombocytopenic purpura; a study of 11 cases. *Blood*. 2005; **106**: 1932-1937.
 - 13) Darabi K, Berg AH. Rituximab can be combined with daily plasma exchange to achieve effective B-cell depletion and clinical improvement in acute autoimmune TTP. *Am J Clin Pathol*. 2006; **125**: 592-597.
 - 14) Niewold TB, Alpert D, Scanzello CR, Paget SA. Rituximab treatment of thrombotic thrombocytopenic purpura in the setting of connective tissue disease. *J Rheumatology*. 2006; **33**: 1194-1196.
 - 15) Reddy PS, Deauna-Limayo D, Cook JD, et al. Rituximab in the treatment of relapsed thrombotic thrombocytopenic purpura. *Ann Hematol*. 2005; **84**: 232-235.
 - 16) Bianchi V, Robles R, Alberio L, Furlan M, Lammle B. Von Willebrand factor-cleaving protease (ADAMTS13) in thrombocytopenic disorders: a severely deficient is specific for thrombocytopenic purpura. *Blood*. 2002; **100**: 710-713.

Rituximab provided long-term remission in a patient with severe thrombotic thrombocytopenic purpura refractory to plasma exchange

Hyunsoo HONG^{1,2}, Yasutaka AOYAMA¹, Ryoussuke YAMAMURA^{1,3}, Tadanobu OHTA¹,
Atsuko MUGITANI¹, Takahisa YAMANE², Masayuki HINO², Masanori MATSUMOTO⁴,
Yoshihiro FUJIMURA⁴

¹Department of Hematology, Seichokai Fuchu Hospital

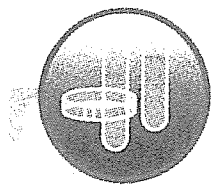
²Clinical Hematology and Clinical Diagnostics, Graduate School of Medicine, Osaka City University

³Department of Hematology, Osaka Saiseikai Nakatsu Hospital

⁴Department of Blood Transfusion Medicine, Nara Medical University

Key words : Rituximab, Thrombotic thrombocytopenic purpura, Plasmapheresis, ADAMTS13

We report a patient with severe thrombotic thrombocytopenic purpura (TTP) refractory to plasmapheresis who was successfully treated with rituximab. A 57-year-old male patient was referred to our department for further differential diagnosis and treatment of anemia and severe thrombocytopenia. Progressive psychoneurotic symptoms, hemolytic anemia, thrombocytopenia, renal function insufficiency and fever led us to the diagnosis of TTP. ADAMTS13 activity was below 3% and an inhibitor for ADAMTS13 was detected. Treatment with plasmapheresis and high-dose steroid was initiated but without clinical benefit. Two weeks following the initiation of plasmapheresis, we decided to treat the patient with 7 cycles of rituximab. No severe rituximab-related adverse effects were observed. After treatment with rituximab, the disease remitted, and the ADAMTS13 activity level increased. The patient has remained in complete remission for more than 1 year. Our data suggest that rituximab may be the optimal immunosuppressive therapy for refractory thrombotic thrombocytopenic purpura caused by an anti-ADAMTS 13 inhibitor.



VWF 測定

Analysis of von Willebrand factor

奈良県立医科大学講師 輸血部

松本雅則

MATSUMOTO, Masanori : Department of Blood Transfusion Medicine, Nara Medical University

von Willebrand 因子 (VWF) は、Ⅷ因子、コラーゲン、血小板膜蛋白 GPIb や $\alpha_{IIb}\beta_3$ など多くのリガンドと結合するため、その機能測定にはさまざまな方法が考案されている。VWF 検査は、von Willebrand 病の診断時にのみ必要と考えられてきたが、最近、VWF を切断する酵素 (ADAMTS 13) が血栓性血小板減少性紫斑病との関連で報告されるなど、さまざまな血栓性疾患で VWF は注目され、その検査の重要性が高まっている。

はじめに

von Willebrand 因子 (VWF) は、von Willebrand 病 (VWD) の発見者であるフィンランド人医師 Erik Adolf von Willebrand (1870~1949) にちなんで名付けられた止血因子である。最近までは、VWF に関連した検査は VWD という限られた疾患でのみ必要であったが、最近、血栓性血小板減少性紫斑病 (thrombotic thrombocytopenic purpura, TTP) との関連で注目を集めるようになった。また、心筋梗塞などの血栓症においても VWF が重要な働きをしていることが報告され、今後 VWF 検査はますます重要になってくると思われる。

本稿では、まず VWF の構造と機能について概説し、重要と思われる検査法を紹介する。なお、以前は vWF と略されていたが、本稿では 2001 年の国際血栓止血学会の標準化委員会の勧告に従っ

て、VWF とすべて大文字で表記する。

VWF

VWF は、全身の血管内皮細胞や骨髄巨核球で産生され、そのほとんどが細胞外に分泌される。一部は貯蔵部位である血管内皮細胞の Weibel-Palade 小体や血小板中の α 顆粒に移行して、交感神経刺激、トロンビン形成、そして DDAVP (1-desamino-8-D-arginine vasopressin) などの刺激によって血漿中へ放出される。

図 1 に示すように、2,813 アミノ酸残基からなる遺伝子翻訳産物 (プレプロ VWF) から、シグナルペプチド 22 アミノ酸が切断されてプロ VWF となり、741 アミノ酸のプロペプチドがはずれて、2,050 アミノ酸の VWF サブユニットとなる。VWF のマルチマー形成は、まず粗面小胞体でプロ VWF の C 末端領域での S-S 結合によって二量体化される。その後、ゴルジ小体に運ばれ、N 末端での S-S 結合によりマルチマー形成が行われ、血漿中に分泌される。その後、血漿中で分解されることで分子量 50 万~2,000 万 Da に、さまざまな大きさに重合したマルチマー型として存在している。最近、この VWF を分解する酵素が、VWF A2 ドメインのチロシン 1605 メチオニン 1606 を特異的に切断するメタロプロテアーゼであることが明らかとなり、この酵素は VWF 切断酵素 (VWF-cleaving protease, VWF-CP) (別名: ADAMTS 13) とよばれている。

VWF は、2 つの重要な止血機能をもつ血漿糖蛋

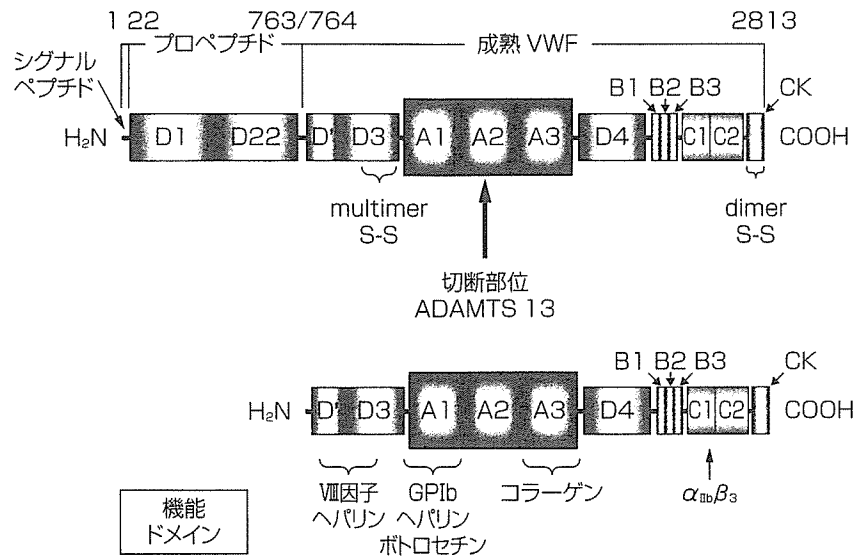


図 1 VWF の構造と機能ドメイン

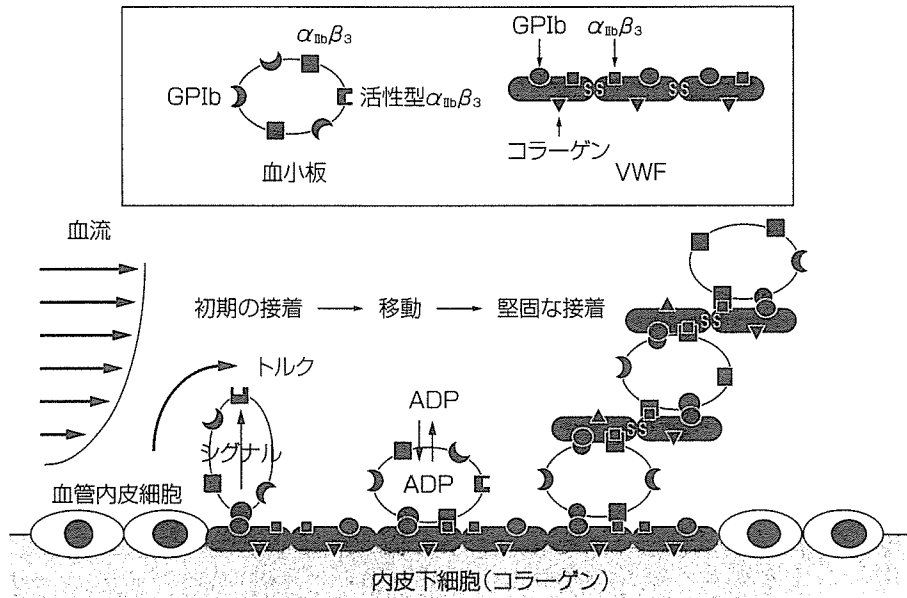


図 2 高ずり応力下での血小板粘着のメカニズム

白質である。1つは、障害血管壁において血小板を粘着させ、血小板血栓形成を促す分子糊としての1次止血の機能である。もう1つは、キャリア蛋白質として、血液凝固第Ⅷ因子と循環血漿中で結合してⅧ/VWF複合体を形成し、Ⅷ因子を保護するという2次止血の役割も担っている。これらの機能を発揮するために、サブユニット内のドメイン構造で、それぞれに対応するリガンド（結合

相手)をもっている。VWFのこれらのドメインは、VWF遺伝子内の塩基配列相同性からA~Dに分類され、図1に示すようにN末端のD1からC末端のCKと表現される。VWFの1つのサブユニットは分子量25万Daで、2,050アミノ酸と22個の糖鎖で構成されている。この糖鎖には、各個人特有のABO血液型糖鎖が存在するが、血小板 α 顆粒に存在するVWFは、ABO血液型糖鎖をもたな

表 1 VWD の病型

病型	病因	VWF 検査				第VIII因子活性
		VWF : Ag	RIPA	Rcof	L-VWFM	
1	VWF の量的減少	低下	低下-正常	低下	有	低下
2A	VWF の質的異常症	低下-正常	低下	低下	欠如	低下-正常
2B	VWF の質的異常症	低下-正常	亢進	低下	欠如	低下-正常
2M	VWF の質的異常症	低下-正常	低下	低下-正常	有	低下-正常
2N	VWF の質的異常症	低下-正常	正常	低下-正常	有	低下
3	VWF の完全欠損	欠如	欠如	欠如	欠如	著減

L-VWFM：高分子量 VWF マルチマー。

いことが報告されており、興味深い。これらの ABO 型糖鎖と VWF の産生、分泌、機能との関連は今のところ明らかになっていないが、O 型の血液型を有する個人の血漿 VWF 抗原量やリストセチンコファクターは、他の血液型の個人と比べて低下していることが明らかとなっている。

また、最近の研究で、生体内での VWF の機能は、ずり応力によって調節されていることが明らかとなった。血管内での血流速度は、血管中央で最大で、血管壁では遅くなるため、速度勾配が生じる。この速度勾配のため、物体を歪ませようとする力＝ずり応力 (shear stress) が働く。ずり応力は流速に比例するため、流れの遅い静脈では低いずり応力が、流れの速い動脈では高いずり応力が働くことになる。心筋梗塞などの重篤な血栓症は動脈血栓であるので、高ずり応力下の血小板凝集のメカニズムが重要であることが予想される。

図 2 に示すように、高ずり応力下の血小板凝集では、まず VWF が血管内皮細胞下組織のコラーゲンと結合して固相化され、活性型となる。そして、活性型 VWF は、A1 ドメインを介して血小板膜蛋白 (GP) I b と結合する。血小板は、血流のトルクにより VWF 上を回転し、結合と解離を繰り返す。これによって GP I b からのシグナル伝達が起こり、血小板 $\alpha_{IIb}\beta_3$ が活性化され、これに VWFC1 ドメインが結合し、血小板血栓が形成されると考えられている。

VWF 測定の意義

臨床的に VWF の測定を行う意義として、①出

血性疾患の検索として VWD の診断、②TTP などの血栓性疾患の病態解析、③血管内皮細胞傷害のマーカーとしての検査などが考えられる。

1) VWD

von Willebrand は、1925 年にスウェーデンとフィンランドに挟まれたボスニア湾に浮かぶ Åland 島で、血族結婚家系に出現する新たな遺伝性出血性疾患を発見した。この疾患の特徴として、血友病とは異なり①常染色体優性遺伝で男女ともに発症すること、②出血は鼻出血や性器出血などの粘膜や皮下出血が主で、関節・筋肉などの深部出血はまれであること、③出血時間が著明に延長することを報告した。その後、VWD には数多くの病型が存在することが報告され、現在では表 1 のように分類されている。これ以外に、VWF に対する自己抗体が生じるために発症する後天性 VWD があり、自己免疫疾患や多発性骨髄腫などの基礎疾患を伴うことが多い。

2) TTP

TTP は、血小板減少、溶血性貧血、精神神経症状、腎機能障害、発熱の 5 徴候を特徴とする疾患で、血小板減少、溶血性貧血、急性腎不全を 3 徴候とする溶血性尿毒症症候群 (hemolytic uremic syndrome, HUS) と類似した病態であると理解されてきた。TTP と HUS は臨床的には鑑別が困難で、血栓性微小血管障害症 (thrombotic microangiopathy, TMA) と総称されることもある。

最近、TTP の病因として、ADAMTS 13 活性の低下であることが示された。先天性 TTP では遺伝的に本酵素が欠損しており、後天性 TTP では本酵

素に対する IgG 型の自己抗体（インヒビター）が存在することが明らかとなった。一方、HUS では ADAMTS 13 活性はほぼ正常で、TTP と HUS が異なる病態であることが示された。

VWF は、一般に高分子量のものほど比活性が高いことが知られている。ADAMTS 13 は VWF を切断し、分子量を減少させることで VWF の機能を調節している。ADAMTS 13 活性が著減した状態では、血管内皮細胞で産生されて、血漿中に放出されて間もない超高分子量 VWF マルチマー（unusually large VWF multimers, UL-VWFM）が切断されずに、末梢細小動脈や毛細血管などに移行する。そこでは高ずり応力が生じているため、UL-VWFM が活性型の進展構造に変化し、血小板と結合することにより血小板血栓を形成すると考えられている。

VWF 測定法

VWF の測定法として、抗原量の測定と活性（または機能）の測定とがある。VWF は、血小板 GP I b や $\alpha_{IIb}\beta_3$ 、コラーゲン、VIII 因子などのさまざまなリガンドと結合するため、VWF 機能を評価するにはさまざまな方法が報告されている。このなかで、とくに重要と思われるものについては我々の方法を以下に紹介する。ルーチン検査として実施することが困難な方法は、簡単な紹介にとどめる。

1) VWF 抗原 (VWF:Ag) 定量

我々の研究室で行っている ELISA を用いた方法を紹介します。試薬はすべて市販されている。

(1) 試薬

①1 次抗体：抗ヒト VWF ウサギポリクローナル抗体 (Dako cytomatic)

②2 次抗体：ペルオキシダーゼ標識抗ヒト VWF ウサギポリクローナル抗体 (Dako cytomatic)

③o-フェニレンジアミン (OPD) (和光純薬工業)

④発色用緩衝液： H_2O_2 加 0.1 M クエン酸緩衝液 (pH4.9)

⑤固相化用緩衝液：0.1 M $NaHCO_3$ - Na_2CO_3 (pH9.6)

⑥3%ウシ血清アルブミン (BSA) 加リン酸緩衝液 (PBS) (pH7.3)

⑦0.05% Tween 加リン酸緩衝液 (T-PBS, pH7.3)

(2) 方法

①1 次抗体を固相化用緩衝液で 1,000 倍に希釈し、96 穴 ELISA 用プレートの各ウエルに $200\mu l$ ずつ分注し、 $4^\circ C$ で 1 昼夜静置する。

②翌日、T-PBS で各ウエルを 3 回洗浄し、3% BSA 加 PBS を各ウエルに $200\mu l$ ずつ加え、 $37^\circ C$ 、2 時間静置してブロッキングする。

③T-PBS で 3 回洗浄後、3%BSA 加 PBS で連続希釈した標準プール血漿、もしくは希釈被検血漿を $100\mu l$ ずつ添加し、 $37^\circ C$ 、3 時間、固相化抗体と反応させる。

④T-PBS で 3 回洗浄後、3%BSA 加 PBS で 1,000 倍希釈した 2 次抗体をそれぞれ $100\mu l$ ずつ加え、 $37^\circ C$ 、3 時間反応させる。

⑤T-PBS で洗浄後、発色用緩衝液で 0.4 mg/ml に溶解した OPD を各ウエルに $100\mu l$ ずつ加え、5 分程度で黄褐色に変色するのを待って、2 M H_2SO_4 をそれぞれ $100\mu l$ ずつ添加して反応を停止し、吸光光度計で OD492 nm にて測定する。

⑥標準曲線は、希釈した標準血漿の希釈列の吸光値を片対数グラフにプロットして作成する。

被検血漿の VWF:Ag は、標準曲線より % に換算して表記する。

(3) 正常値

基本的には 100% であるが、ABO 血液型によって異なる。O 型がもっとも低く、検査値の解釈には注意が必要である。1,101 人の正常人の検討で O 型 74.8%、A 型 105.9%、B 型 116.9%、AB 型 123.3% との報告がある¹⁾。

2) リストセチン惹起血小板凝集 (ristocetin-induced platelet aggregation, RIPA) とリストセチンコファクター (RCo)

VWF の活性を測定する代表的な方法であるが、VWF 全般の機能を表現するものではない。リスト