

図 3 リストセチンコファクター (RCo)

セチンは、1950年代に抗生物質として開発され、正常人の多血小板血漿 (platelet-rich plasma, PRP) を凝集させるが、多くの VWD 患者ではこの凝集が認められないことより、RIPA が VWD 診断のスクリーニングとして用いられるようになった。リストセチンは、VWF と血小板 GPIIb との結合を惹起することで血小板凝集を引き起こすとされている。

<RIPA>

(1) 試薬

リストセチン (Ristocetin A SO₄, abp, New Jersey, USA) : 1 バイアル 100 mg を生理食塩水 4 ml で溶解し、25 mg/ml 溶液として分注後、-30°C で凍結保存する。

(2) 方法

被検クエン酸加 PRP に種々の濃度のリストセチンを添加し、血小板凝集計でその凝集能を観察する。

(3) 判定

正常人 PRP ではリストセチン終濃度 1 mg/ml 以上で凝集が惹起されるが、VWD 患者の PRP では、1.5 mg/ml の濃度でも凝集が著しく減少ないし欠如する。

<RCo (図 3)>

我々の研究室では、血小板凝集計を用いる方法で検査している。正常ヒト洗浄血小板を用いる方法と、ホルマリン、またはパラホルムアルデヒド固定血小板を用いる方法がある。ホルマリン固定血小板を用いる方法は、長期間保存が可能で便利である。

(1) 試薬

ホルマリン固定血小板 : EDTA 加正常ヒト PRP より洗浄血小板を作製し、終濃度 1% のホルマリンで固定後、終濃度 0.002% NaN₃ を含む PBS に、固定した血小板を 100 万~200 万/ μ l となるように浮遊させる。4°C で保管すれば、数カ月間有効である。

(2) 方法

①血小板凝集計の凝集能測定用のガラスキュベットに、2% BSA 加 PBS で 1~32 倍に連続希釈した標準プール血漿を 100 μ l 入れて、ホルマリン固定血小板を終濃度 15 万/ μ l で全量 240 μ l になるように PBS を加える。これをマグネチックスターラーで攪拌しながら凝集率 100% としてセットする。

②同様に、ホルマリン固定血小板を終濃度 30

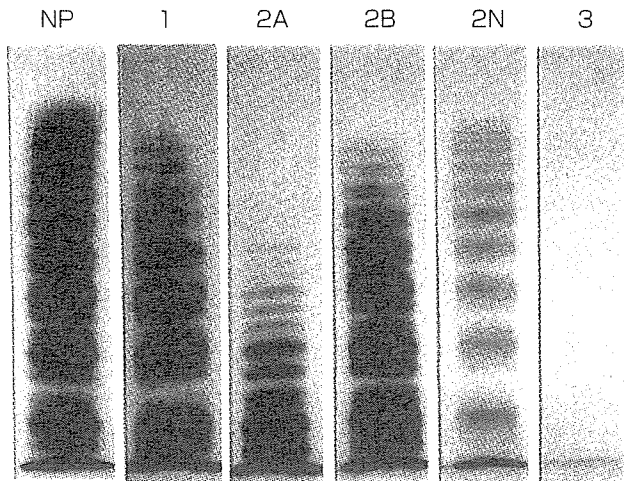


図 4 VWD のマルチマー解析

正常人血漿 (NP) と VWD 1 型, 2A 型, 2B 型, 2N 型, 3 型患者血漿のマルチマー解析.

万/ μ l に調整したキュベットの凝集率を 0% とし てセットする. これにリストセチン溶液を 10 μ l (終濃度 1 mg/ml) 加え, 記録する.

③初期凝集のスロープ ($\tan\theta$) を測定し, 片対 数グラフで検量線を作成し, 同様に処理した被検 血漿から RCo を計測する.

(3) 正常値

VWF : Ag と同様に基本的には 100% であるが, VWF : Ag と同様に ABO 血液型によって相違が ある.

(4) 意義

VWD では, RCo は低下ないしは著減するが, 運動負荷, 妊娠末期では著増する. とくに, DDAVP (合成バゾプレッシン) の投与によって血管内皮細 胞から VWF が放出されるので, 投与後の RCo は 2~3 倍に上昇する.

3) VWF マルチマー解析 (SDS-アガロースゲ ル電気泳動法)

原法では¹²⁵I 標識抗 VWF 抗体を用いるが, 我々 の研究室ではペルオキシダーゼで標識した抗 VWF 抗体を用い, ルミノール化学発光反応を利用 したウエスタンブロット法を導入している²⁾. 本 法は, VWD の病型分類や, 最近では ADAMTS 13 活性測定法などに利用され, VWF 検査としては必 須と考えられる. しかし, 鮮明なマルチマー像を

得るにはかなり熟練を要するため, 本稿では詳細 な方法は省略する.

正常血漿では, 分子量 50 万 Da から 1,000 万 Da 以上に及ぶ VWF マルチマー構造が認められ る. 各バンドは, 主バンドとその前後のサテライト バンドを有する 3 重構造からなっている. VWD 患者では, バンドが薄くなったり消失した りするが, TTP 患者では, 通常では認められない 非常に大きな超高分子量の VWF マルチマー (UL-VWFM) が認められることもある. 図 4 に, 代表的な VWD 病型におけるマルチマー像を示 す.

4) VIII-VWF 結合能検査

血液凝固第 VIII 因子は, VWF と結合し生体内で安 定化しているが, VIII 因子と VWF の結合異常症 (VWD 2N 病型) が発見された. これによって, VIII 因子が不安定となり血友病 A と同様の症状を 呈する. VIII-VWF 結合能検査は, VWD 2N を診断 するための VWF の機能検査である.

5) ずり応力惹起血小板凝集 (shear-induced platelet aggregation, SIPA)

最近, 血管内に生じるずり応力の血小板機能に 及ぼす影響を観察する実験系が確立され, 汎用さ れるようになった. コーンプレート型ずり応力負 荷実験装置とフローチャンバーシステムがよく使 用されているが, 我々の研究室で使用している コーンプレート型装置について解説する.

この装置は, コーンを回転させることによりず り応力を発生させるが, PRP に 6~12dyne/cm² の 低ずり応力を加えると血小板凝集を認める. さら にずり応力を上昇させると凝集はいったん解離す るが, ずり応力を上昇し続けると, 80dyne/cm² 以 上の高ずり応力下でも, 再度凝集を認めるようにな る. 低ずり応力下での血小板凝集は, フィブリ ノゲンが血小板 $\alpha_{IIb}\beta_3$ と結合し, 血小板を架橋し ていると考えられている. 高ずり応力下の血小板 凝集のメカニズムとして, 図 2 と同様に, 高ずり 応力により VWF と GP I b との結合反応が生じ, これをきっかけとして瞬時に血小板が活性化さ れ, $\alpha_{IIb}\beta_3$ の立体構造の変化が起こる. これに

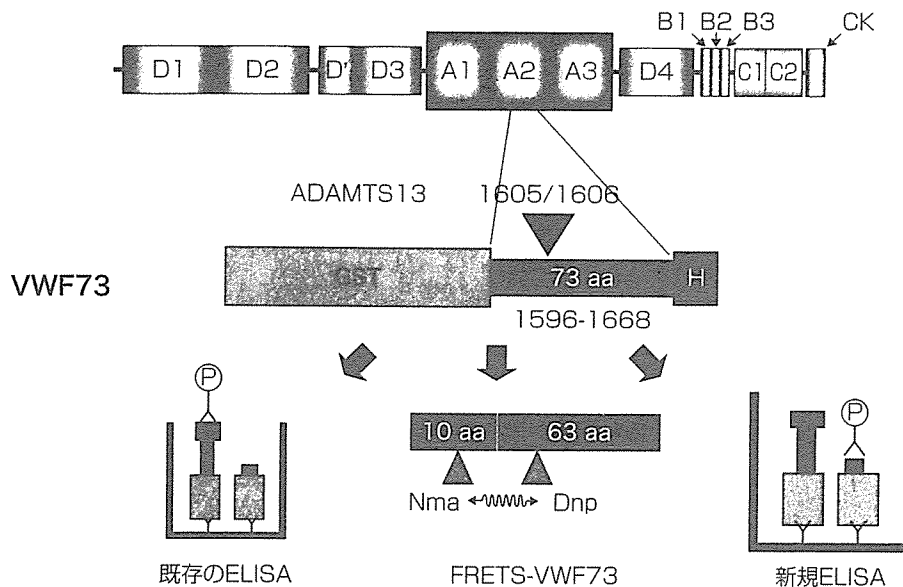


図 5 ADAMTS 13 活性測定法

VWF73 は, ADAMTS 13 の切断部位を含む VWF-A2 ドメイン内の 73 アミノ酸に, GST タグとヒスチジン (H) タグを付加したペプチドである. 既存の ELISA は, この基質の未切断ペプチドを検出するため感度が悪かった. 新規 ELISA は, ADAMTS 13 切断断片を特異的に認識するモノクローナル抗体の作製により, 切断産物が直接測定できるようになった.

よって, VWF と $\alpha_{IIb}\beta_3$ が結合し, 血小板凝集が引き起こされると理解されている. このように, 高ずり応力惹起血小板凝集 (H-SIPA) には, VWF が非常に重要な働きをしていることが明らかとなった.

6) VWF 切断酵素 (ADAMTS 13) 活性測定

ADAMTS 13 の活性測定は, 血栓性血小板減少性紫斑病 (TTP) の診断ならびに血小板輸血の適否を決定するのに必須であり, VWF に関連した重要な検査である. Furlan らの原法は, 精製 VWF を基質とし, 尿素などの蛋白変性剤存在下において 24 時間酵素反応を行い, その反応生成物を電気泳動法で解析するという煩雑なものであった.

近年, 小亀らにより, 非変性条件下に短時間で切断できる基質として, VWF-A2 ドメインの 73 アミノ酸残基が報告された (VWF73). これを利用した ELISA が開発されたが, 図 5 に示すように未切断のペプチドを検出する方法であるため, 検出感度が悪いことが問題であった. その後,

VWF73 に蛍光基を導入した化学合成基質を利用する測定法 (FRETS-VWF73) が開発されたが, ペプチドが高価で蛍光比色計が必要であるなど, 実際に臨床現場で使用するには困難であった.

我々の研究室では, 切断生成物を特異的に検出する ELISA の確立のために, ADAMTS 13 により切断される Tyr1605 を含む N 末端側 10 アミノ酸残基の合成ペプチドをマウスに免疫し, モノクローナル抗体を作製した³⁾. この抗体は未切断 VWF とは反応せず, Tyr842 を含む N 末端側 VWF 切断断片を特異的に認識した. VWF73 ペプチドを基質として, プレート上で切断とその生成物の検出をこの抗体で行う ELISA を確立した. この ELISA は約 3 時間で測定可能であり, 測定限界は 0.5% と鋭敏であった. また, 健常人ならびに TTP 患者血漿において, 従来法の SDS-アガロース法と良好な相関がみられた. さらに, 後天性 TTP 患者での ADAMTS 13 インヒビター活性値も従来法とよい相関を示した. 本法を用いること

で、TTP 患者における血漿交換療法や血小板減少患者における血小板輸血の適応決定が、市中病院においても ADAMTS 13 活性というエビデンスをもとに行うことが可能となった。

おわりに

VWF は血小板血栓形成にもっとも重要な役割を果たしている血漿蛋白の 1 つであり、そのユニークな構造と機能が明らかになってきた。今後、VWF 検査は、VWD や TTP 以外でも、動脈血栓と関連する脳梗塞や心筋梗塞などのさまざまな分

野でも、重要な検査となると予想される。

文献

- 1) Gill, J. C., et al. : The effect of ABO blood group on the diagnosis of von Willebrand factor. *Blood*, **69**, 1691~1695, 1987.
- 2) 藤村吉博, 他 : von Willebrand 因子測定法. 検査と技術, **27** : 981~990, 1999.
- 3) Kato, S., et al. : Monoclonal antibodies to a VWF-A2 decapeptide with the C-terminal residue Tyr1605, generated by ADAMTS13 cleavage, develop a highly sensitive ELISA for its activity and characterize Upshaw-Schulman syndrome. *ASH abstract*. 2005.

総 説

ADAMTS13 解析による TTP/HUS 診断

奈良県立医科大学輸血部

松本雅則, 石指宏通, 八木秀男, 藤村吉博

ANALYSIS OF ADAMTS13 IN PATIENTS WITH TTP/HUS

MASANORI MASTUMOTO, HIROMICHI ISHIZASHI,

HIDEO YAGI and YOSHIHIRO FUJIMURA

Department of Blood Transfusion Medicine

Nara Medical University

Received December 28, 2005

抄録：ADAMTS13 は von Willebrand 因子 (VWF) を特異的に切断する酵素で、血栓性血小板減少性紫斑病 (TTP) や溶血性尿毒症症候群 (HUS) との関連で注目されている。本学輸血部では、同酵素活性が測定可能な本邦の代表的施設として、日本全国の医療機関からの依頼によって、過去7年間に TTP/HUS 症例を 582 例集積した。それらの症例で、ADAMTS13 活性と同インヒビター活性測定および同遺伝子解析を行ってきたので、その概要を報告する。また、ADAMTS13 活性が著減する症例において、血小板減少のメカニズムを解説し、血小板輸血が禁忌であるエビデンスを概説する。

Key words : ADAMTS13, VWF, TTP, HUS, platelet transfusion

はじめに

日常臨床において、血小板数が減少している症例を診察することは、比較的稀なことではない。それにも関わらず、多くの臨床医は、その病態を明らかにする十分な検査を施行せず、特発性血小板減少性紫斑病 (idiopathic thrombocytopenic purpura : ITP)、もしくは播種性血管内凝固 (disseminated intravascular coagulation : DIC) などと診断し、安易に血小板輸血を施行している場合が見受けられる。しかし、血小板減少症の中には、血小板輸血が無効であるばかりか、病態を悪化させる疾患がある。血小板輸血禁忌の疾患として、血栓性血小板減少性紫斑病 (thrombotic thrombocytopenic purpura : TTP)、ヘパリン起因性血小板減少症 (heparin-induced thrombocytopenia : HIT) などが知られている。これらの疾患は、どの臨床科においても初期治療を行う可能性

があり、また鑑別診断にこれらの疾患が思い浮かばないと病初期における診断は困難である。本学輸血部では、学内だけでなく全国の医療施設からの依頼によって TTP/溶血性尿毒症症候群 (hemolytic uremic syndrome : HUS) の病態解析を行っており、TTP と HUS を包括する血栓性微小血管障害症 (thrombomicroangiopathy : TMA) の包括的診断法の確立を目指している。本稿では、ADAMTS13 (a disintegrin-like and metalloproteinase with thrombospondine type 1 motifs 13) による TTP/HUS の病態解析の結果について概説する。

血栓の形成機序と VWF

血液の凝固反応は、極めて精巧に制御されており、健全状態においては血管内で凝固することなく流動性を維持しているが、一旦血管が障害されると血栓を形成し止

血する。血管損傷が起こると、von Willebrand 因子 (VWF) を介して障害部位へ血小板が粘着し、血小板が活性化することで血小板顆粒から ADP 等の凝固惹起物質が放出される。これによってさらに血小板が凝集塊を形成することで、血小板血栓を形成する。これは一次血栓と呼ばれている。血小板血栓は、血流に対して物理的に壊れやすいために、止血を安定にするためにフィブリン塊からなるフィブリン血栓が形成される。これを二次血栓と呼んでいる。フィブリン血栓の形成は、多くの凝固因子が連続的に、増幅的に活性化されることによって起こり、最終的にはフィブリノゲンからフィブリンが産生されることで完成する。

VWF は、前述のごとく、一次血栓である血小板血栓の形成に重要な働きをしているとともに、二次血栓にも関連する 2 つの機能を持った血漿糖蛋白質である¹⁾。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一次血栓の機能である。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二次血栓の役割も担っている。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²⁾。血管内での血流速度は、血管中央で最大で、血管壁では摩擦により遅くなるため、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、すなわち“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、流れの早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。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)Ib 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 GPIb からのシグナル伝達が起こり、血小板 α IIb β 3 が活性化され、これに VWF C 1 ドメインが結合する。これによって、血小板血栓が形成されると考えられている。

VWF は血管内皮細胞や骨髄巨核球で産生されるが、血管内皮細胞由来の VWF は分子内の Asn 結合型糖鎖に ABO 血液型物質を持つのに対し、巨核球由来の VWF はこれを欠くという違いがある³⁾。血管内皮細胞で産生された VWF は内皮細胞内の Weibel-Palade 体にいったん蓄積され、刺激によって血液中に放出される。VWF は、

2050 アミノ酸残基からなる 1 つのサブユニットが、head-to-head, tail-to-tail でジスルフィド (SS) 結合することによって、多重体 (マルチマー) という特徴的な構造をとっている。血漿 VWF は分子量 500kDa から 15,000kDa に至る幅広い範囲の様々なマルチマー構造を持っている。サブユニットが幾重にも重合した超巨大分子構造を持った VWF は、UL-VWFM (unusually large-VWF multimer) と呼ばれている。培養した血管内皮細胞の上清や健常者に酢酸デスマプレシン (DDAVP) を投与すると血漿中に一過性に UL-VWFM が検出されることから、UL-VWFM は血管内皮細胞から放出されて間もない VWF と考えられている。マルチマー構造が大きいほど生物学的比活性も高いことが知られており⁴⁾、UL-VWFM が血漿中に存在することは、血栓症のリスクとなる。また、UL-VWFM はずり応力によって形態が変化し、大動脈などの比較的低ずり応力の生じている部位では、分子が非伸展構造 (球場) をとり非活性型である。細小動脈や毛細血管などの高ずり応力の発生する部位では UL-VWFM 分子の立体構造が変化し、活性型の伸展構造に転ずると考えられている。よって、UL-VWFM は高ずり応力にさらされる部位では、血小板凝集を起こし病的血栓の原因となると考えられる。

ADAMTS13

UL-VWFM 依存性の血小板血栓形成を防止するために、VWF マルチマーサイズを減少させる働きをするのが、VWF 切断酵素 (VWF-cleaving protease: VWF-CP) であり、最近では ADAMTS13 と呼ばれている。ADAMTS13 は亜鉛型のメタロプロテアーゼで、その作用の発現には、Ba²⁺ や Ca²⁺ などの二価の陽イオンが必要である⁵⁾。本酵素をコードする遺伝子は染色体の 9q34 に存在し、cDNA は 29exon より構成されている。ヌクレオチドの全長は 4281bp で、1427 アミノ酸残基よりなる 1 本鎖糖蛋白質である。Northern blot で ADAMTS13 の mRNA を探索すると、その約 4.7kb のメッセージは肝臓で最も強く発現していたが、肝臓のどの細胞で産生されているかについては長い間不明であった。2005 年に共同研究者の Uemura ら⁶⁾ は、抗 ADAMTS13 マウスモノクローナル抗体による免疫染色と in situ hybridization にて肝星細胞 (旧名 伊東細胞) が ADAMTS13 の主たる産生細胞である事を明らかにした。また、ADAMTS13 は、図 1 に示すように様々なドメインをもつマルチドメイン構造から成り立っている。そこで、共同研究者の Soejima ら⁷⁾ は、このドメイン構造の機能を検討するため、C 末端からドメインを順に欠損させた変異体を 11 種類作成し、

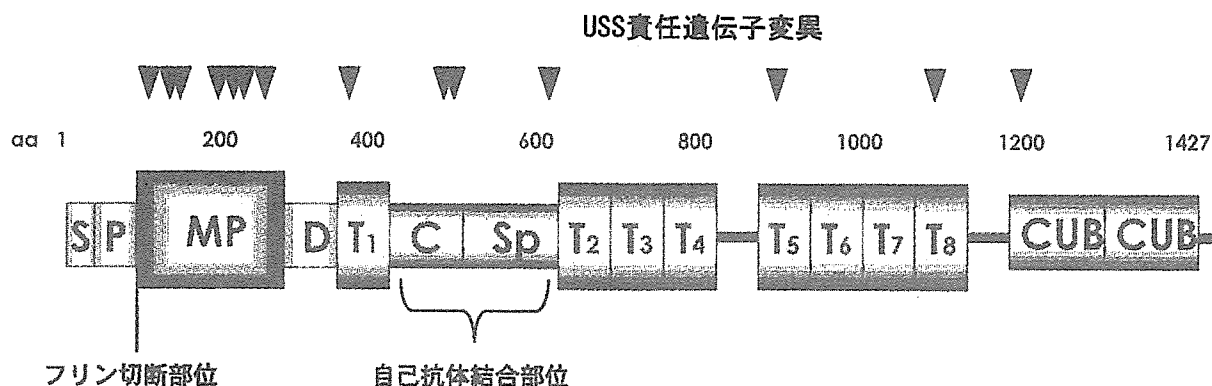


図1. ADAMTS13 のドメイン構造

ADAMTS13 は、1427 アミノ酸からなり、マルチドメイン構造を取っている。

S: シグナルペプチド P: プロペプチド MP: メタロプロテアーゼドメイン

D: ディスインテグリン様ドメイン C: システインリッチドメイン

Sp: スペーサードメイン T: TSP1 モチーフ

本邦 USS 9 例の遺伝子解析によって明らかになった責任遺伝子変異は 14 個で(▼で示す), MP に 7 個, C/Sp に 3 個, T に 3 個, CUB の 1 個存在した。

後天性 TTP 患者のインヒビター(自己抗体)の認識部位は C/Sp ドメインである。

これらを HeLa 細胞で発現させ、上清の ADAMTS13 活性を測定した。その結果、C 末端から T2 までの欠損体では ADAMTS13 活性は維持されたが、C/Sp ドメインが欠損すると、酵素活性を全く欠くことを確認した。さらに、後述するように後天性 TTP 患者では IgG 型の自己抗体が出現するが、このエピトープを検討したところ、すべて C/Sp ドメインに存在することを確認した。よって、ADAMTS13 の活性発現のためには、触媒ドメインである MP 以外に C/Sp ドメインが重要であることが確認された。以上のことより、本酵素が効果的に働くためには T2~T8 ドメインが血管内皮細胞膜蛋白 CD36 に結合して酵素が内皮細胞に固相化され、C/Sp ドメインを介して基質 UL-VWFM を捕捉し、そして MP ドメインが基質サブユニットの Tyr842-Met843 結合を切断するという役割が予想されている(図2)。

TTP/HUS と ADAMTS13

1924 年に米国の Moschowitz⁹⁾によって初めて報告された TTP は、①血小板減少、②細血管障害性溶血性貧血(microangiopathic hemolytic anemia: MAHA)、③腎機能障害、④発熱、⑤動揺性精神神経障害のいわゆる古典的 5 徴候からなる重篤な疾患である。一方、これによく似た症状を示す HUS は、前記の①~③の 3 徴候からなる疾患で 1955 年にドイツの Gasser ら¹⁰⁾により報告された。TTP は極めて稀な成人に発生する疾患、HUS は

小児に多く、特に近年は腸管出血性大腸菌 O157:H7 株による感染性腸炎に続発するものが殆どである、と一般に認識されてきた。しかし、O157-HUS を除いて、TTP と HUS は臨床所見のみでは鑑別困難な症例がしばしば経験されることより、TTP、HUS およびその類縁疾患は、TMA という 1 つの病態に属する疾患と考えられている¹⁰⁾。即ち、TMA は MAHA、破壊性血小板減少、細血管内血小板血栓を 3 主徴とする疾患群と定義され、破碎赤血球、血小板減少、血栓による臓器機能障害を特徴とする。

過去の病理所見を総括すると、TTP の血栓は VWF/血小板血栓、O157-HUS 血栓は fibrinogen-fibrin/血小板血栓であり、フィブリン血栓が特徴である DIC と血小板血栓が主体である TTP とは大きく異なっていることが明らかとなっている¹¹⁾。

TTP は、血漿交換療法が治療に導入される以前の致死率は 90%以上であったが、導入後 1990 年代の生存率は 80%以上と予後は著しく改善された。しかし、なぜ血漿交換が治療効果を有するのかという EBM は確立されていなかった。一方、O157-HUS に対する血漿交換の効果は一定の評価は無いが、ネガティブな結論が導き出されている。このような状況の中で、近年 TTP と HUS の鑑別診断の指標として、大きく注目されているのが ADAMTS13 である。

1996 年から 1998 年にかけてスイスの Furlan ら¹²⁾、そ

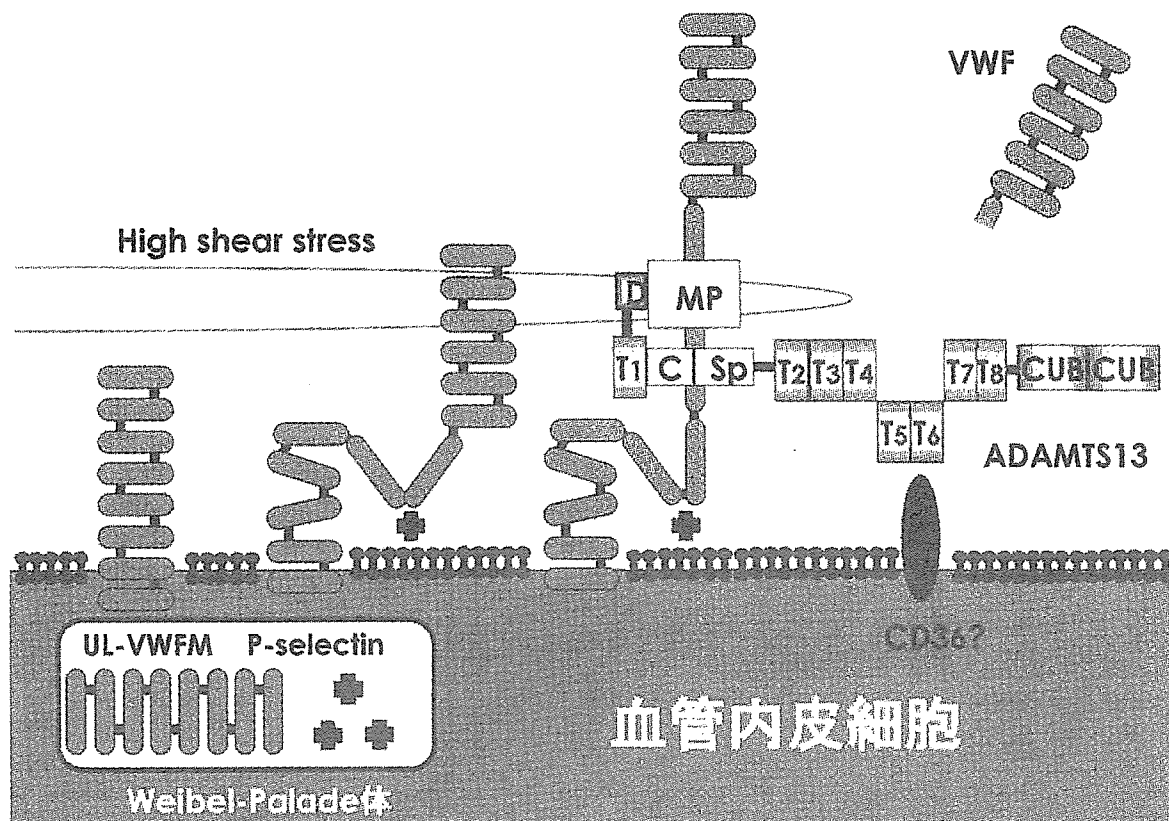


図2. ADAMTS13によるUL-VWFの切断

本酵素が効果的にVWFを切断するために、T2~T8ドメインが血管内皮細胞膜蛋白CD36に結合し、ADAMTS13が内皮細胞に固相化され、C/Spドメインを介して基質UL-VWFを捕捉し、そしてMPドメインで基質サブユニットのTyr842-Met843結合を切断するという役割が予想されている。

して米国のTsaiら¹³⁾により、ADAMTS13活性とそのIgG型インヒビターの測定法が確立され、TTPとHUSの鑑別に画期的な報告がなされた。この結果は、後天性TTPはADAMTS13に対するIgG型自己抗体(インヒビター)ができ、酵素活性が著減する事が原因であること、またHUSではADAMTS13活性は著減しない、というものである。しかし、この後米国¹⁴⁾やイタリア¹⁵⁾から、臨床的にはTTPとHUSの鑑別が不可能なものが多く、実際、両疾患グループをまず臨床診断でふり分けした後にADAMTS13を測定すると、両群間では差が見られないとの報告がなされている。

血漿ADAMTS13活性を欠く場合のTTPの発症機序を図3に示す。ADAMTS13活性が著減している患者では、UL-VWFは分解されるはず血中に放出され、細小動脈内腔で絶えず生じている高ずり応力により進展構造へと変化を受ける。進展したUL-VWFはまず血小板のGPIb受容体と反応し、細胞内シグナル伝達機構を通じて血小板 α IIB β 3受容体の活性化を引き起こす。血小板

活性化は同時に様々な細胞内物質の放出と Ca^{2+} の細胞内流入などを引き起こすが、とりわけこの時に放出される血小板の内的ADPは微小環境下で自らの血小板のADP受容体に結合し、さらなる血小板活性化を促し、活性化 α IIB β 3受容体にもVWFが結合し血小板の微小凝集塊が形成される。その結果、末梢血中の血小板数は著減する。このような機序で血小板減少が起きている病態に、血小板を輸血することは「火に油を注ぐ」ことであることが理解できると思われる。

以上のことから、後天性TTPにおける血漿交換療法の作用機序について、1)血漿中からUL-VWFの除去、2)血漿中からADAMTS13インヒビターを除去、3)ADAMTS13酵素の補充、4)正常サイズのVWFの補充が想定される。また、ADAMTS13活性が著減していないTMA患者でも血漿交換療法は一定の効果が認められるが、上記以外の機序として5)過剰な血漿サイトカインの除去が予想される¹⁶⁾。

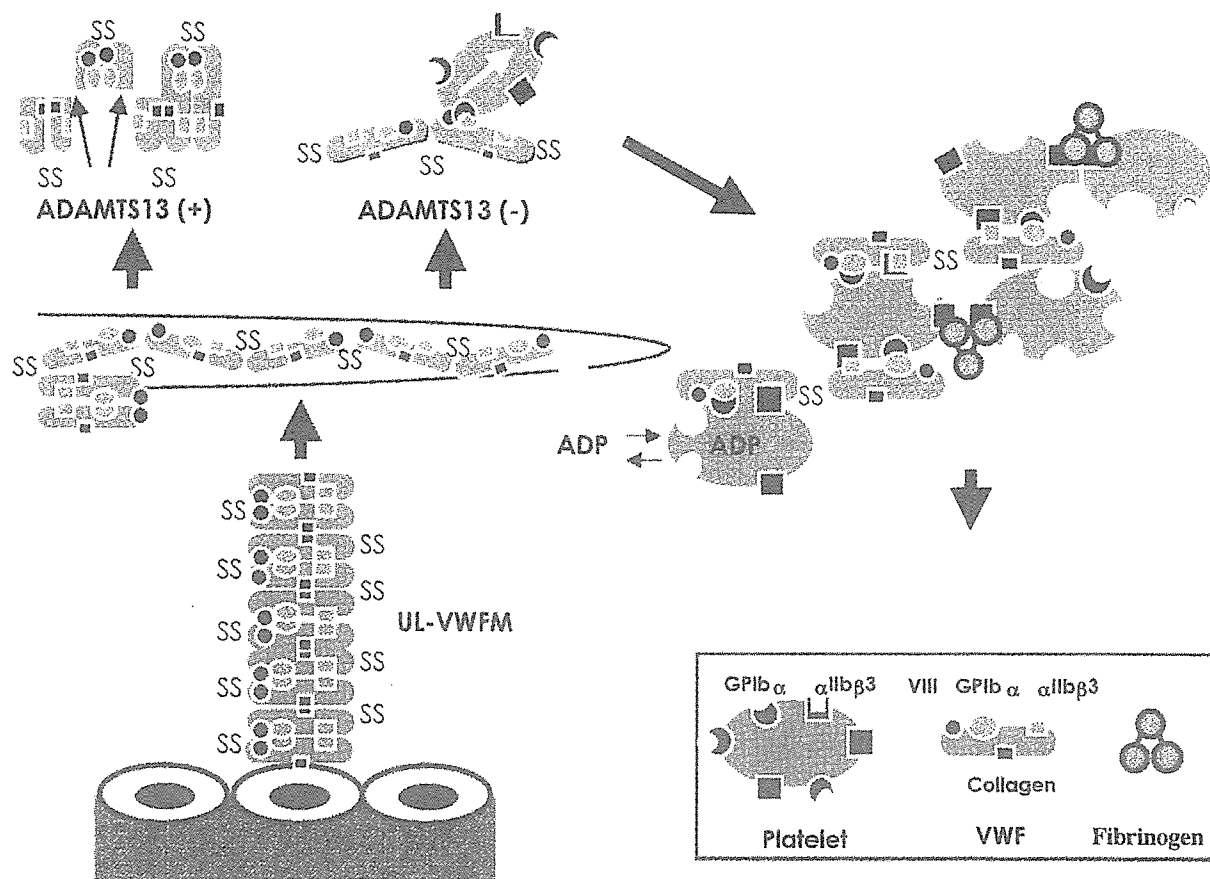


図 3. ADAMTS13 活性欠損時における血小板血栓形成機構

血管内皮細胞で産生され、血中に放出された UL-VWF は、細小動脈などの高いずり応力で進展構造となり、血小板と結合しやすい状態となる。正常人では、ADAMTS13 によって UL-VWF は切断されるが、ADAMTS13 活性が欠損した状態では、UL-VWF は血小板と反応し、微小血小板凝集を引き起こす。先天性 TTP では、遺伝的に ADAMTS13 活性が著減し、また後天性 TTP では ADAMTS13 に対する IgG 型自己抗体(インヒビター)が産生され、同酵素活性が著減する。

TMA の臨床

TTP と HUS は共に家族性・先天性に発症するものと、後天性に起こるものがあり、後者は、さらに原因不詳の特発性(一次性)と、妊娠、薬剤、膠原病、悪性腫瘍、造血幹細胞移植、そして HIV 感染症などに合併して起こる二次性(続発性)とに大別される¹⁶⁾(表 1)。我々は、過去 7 年間にわたり、Furlan らの VWF マルチマー法で、ADAMTS13 活性とそのインヒビター活性を本邦の TMA 患者で測定してきた。平成 17 年 7 月末現在で、ADAMTS13 活性測定を終了した TMA 患者は 582 例となったので、その概要について報告する(表 1)。

先天性 TTP

本症は別名 Upshaw-Schulman 症候群(USS)と呼称され、ADAMTS13 遺伝子異常によって同酵素活性が著減

している^{5, 17)}。我々が集積した本邦 USS の 22 家系 27 症例は全例 ADAMTS13 活性 <3% と著減し、インヒビターも陰性であった。これらの患者の ADAMTS13 遺伝子解析を倫理委員会の承認を得て、施行している。現在までに、15 家系 20 症例について終了したが、そのうち論文報告されている 9 家系 9 症例の家系図および ADAMTS13 遺伝子を図 4 に示す^{18, 19, 20, 21)}。20 症例のうち Family B と C の 2 症例のみが同遺伝子のホモ接合体変異で、うち 1 家系は両親がいとこ結婚であった。一方、残りの全例はいずれも各々のアレルに異なった変異が見られる複合型ヘテロ接合体変異で、両親も全て非血縁結婚であった。さらに、これらの家系解析から P475S という特異変異が発見された¹⁹⁾。この変異遺伝子を HeLa 細胞で発現実験をすると、正常(wild type, WT)に比べて約 5% 程度の ADAMTS13 活性しか認められず、しかもこ

表 1. 過去 7 年間に奈良医大輸血部で集積した本邦 TTP/HUS 患者 582 例：
ADAMTS13 とそのインヒビター活性(平成 17 年 7 月末)

	先天性 TTP/HUS (n=45)		後天性 TTP (n=452)							後天性 HUS (n=85)		
	Upshaw-原因不詳 Schulman (n=18) 症候群 (n=27)		特発性 (n=188)	膠原病 (n=141)	悪性腫瘍 (n=41)	造血幹 細胞移植 (n=32)	妊娠 (n=12)	薬物 (n=15)	その他 (n=23)	特発性 (n=56)	0157 (n=22)	Mitomycin (n=7)
ADAMTS13 活性(%)												
< 3	27	0	112	28	3	0	4	14	3	0	0	0
3-<25	0	5	67	47	14	15	5	1	8	6	2	1
25-<50	0	7	8	35	16	10	2	0	4	29	11	3
≥50	0	6	1	31	8	7	1	0	8	21	9	3
インヒビター (Bethesda U/ml)	(n=27*) (n=18*)		(n=160*)(n=70*)(n=18*)(n=12*)(n=7*) (n=15*)(n=6*)							(n=33*) (n=15*) (n=7*)		
< 0.5	27	18	21	30	10	10	2	0	2	33	15	7
0.5-<2	0	0	80	29	6	2	2	7	4	0	0	0
≥2	0	0	59	11	2	0	3	8	0	0	0	0

* TTP/HUS 患者 564 名中、インヒビター活性の測定が終了しているのは 388 名である。

* ADAMTS13 活性著減例は全体の約 1/3 : 191/582 (32.8%)

の変異をヘテロ (P475S/WT) で有する頻度は本邦人口の約 1 割にも達する事が判明していることから、血栓症のリスクファクター候補の一つと考えられている。現在までに ADAMTS13 遺伝子変異部位は世界で約 70 種以上発見されているが、これらの変異が一定の部位にとどまる事なく、全ドメインに散らばって見られるのも USS の特徴である。我々の報告した本邦 9 症例の ADAMTS13 遺伝子解析の結果を図 4 に示すが、同様に責任遺伝子変異は特定の部位に集中はしていない。

USS 患者の多くは新生児期に Coombs 試験陰性の重症黄疸で発症し、交換輸血で救命されているが、症例によっては小児期に様々な感染症に伴い TTP を発症、あるいは女性患者においては妊娠 5~6 ヶ月で突然 TTP を発症する例も見受けられる。しかし、我々が診断した本邦 USS 27 例の既往歴を詳細に検討すると、ほとんどの症例で小児期に血小板減少の既往があり「ITP または Evans 症候群」と過って診断されている例が多く、ITP/Evans の除外診断に ADAMTS13 活性測定は必須であると考えている。

後天性 TTP

依頼病院の主治医の診断を参考に、基礎疾患の有無を確認した上で、以下のように細分類した¹⁶⁾。

1) 特発性：188 例中 112 例(60%)が ADAMTS13 活性 <3% と著減し、これらの症例では同酵素に対する IgG 型の自己抗体(インヒビター)が陽性であった。特発性 TTP の半数以上が ADAMTS13 に対する自己抗体陽性である事から、「特発性 TTP の多くは自己免疫疾患」である事が判明した。文献的には稀にインヒビター活性を持たない IgM 型の自己抗体陽性例も報告されているが、我々の症例では未発見である。また、ADAMTS13 活性と予後との関連を調べたところ、同酵素活性が著減している症例の方が、軽度から中等度の低下を認める症例よりも、血漿交換やステロイドによる治療に反応し予後が良いことが判明した²⁰⁾。

2) 膠原病：141 例中 28 例(20%)が ADAMTS13 活性著減、同インヒビター陽性を示した。これらの患者はそれぞれの疾患特異的な自己抗体を産生しているが、同時に ADAMTS13 インヒビターを産生していると考えられる。しかし、残りの 80% は ADAMTS13 活性の非著減例にもかかわらず TTP を発症しており、その原因追求が今後の課題として残っている。膠原病の中で、最も症例数が多いのが、全身性エリテマトーデス (SLE) で 60 例、続いて全身性硬化症 (SSc) の 30 例である。SLE では著減例を 14 例(23%)認めるにも関わらず、SSc では 1 例(3%)

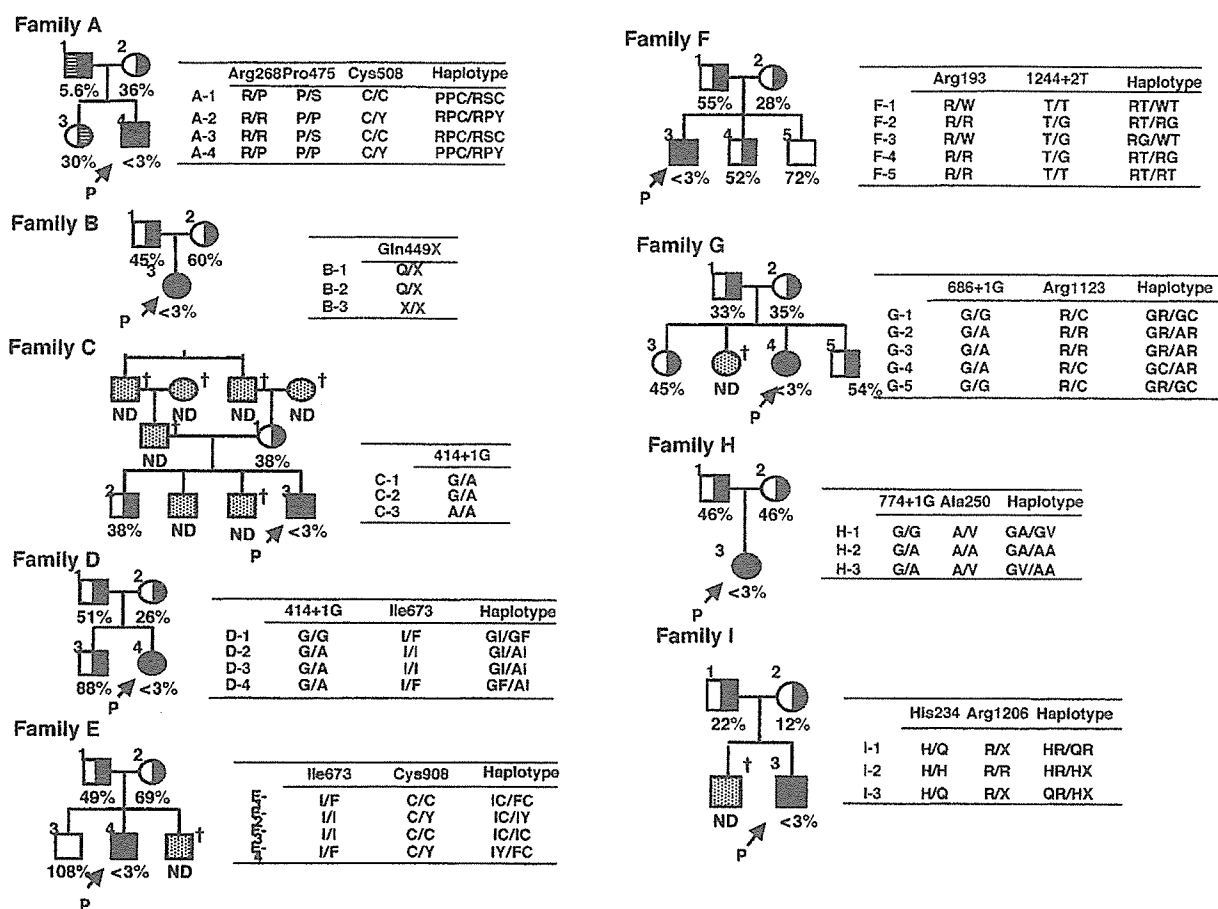


図4. 本邦 USS9 家系 9 症例の家系図と ADAMTS13 遺伝子解析(文献 18-21)

家系図内の数値は ADAMTS13 活性を示す。患者(P)は全例 3%未満で、両親は約 50%であった。Family A の父は、P475S 変異を持つため、5.6%と低値である。ADAMTS13 遺伝子解析の結果は、9 症例のうち 2 例がホモ接合体変異(Family B と C)、残りの 7 症例が複合ヘテロ接合体変異であった。

しか認められなかった。SSc で TTP を発症した症例は、予後が不良で、ADAMTS13 の低下とは全く違った発症機序が予想された。

3) 悪性腫瘍: 41 例中 3 例(7%)が同活性著減で同インヒビター陽性であった。この 3 例中 2 例は経過中に血管内リンパ腫 (intravascular lymphoma, IVL) であると病理学的に確定診断された²³⁾。一般に IVL 症例は高頻度(30~70%)で血小板減少を合併し、これは従来血管内の腫瘍表面での血小板消費のためと説明されてきたが、今回、原因の一つとして TTP 病態の関与が証明された。経験した IVL 2 例は血漿交換単独では TTP 症状の改善が殆どなく、CHOP などの化学療法にて著しく改善し、その後は抗 CD20 キメラ抗体製剤であるリツキサン投与で寛解を維持できているので、腫瘍細胞がこのインヒビターを産生している可能性が高いと考えている。

4) 造血幹細胞移植: 32 例において ADAMTS13 活性著減例は皆無(0%)であった。この成績は 2000 年にオラン

ダのグループが報告した成績²⁴⁾を追認するものである。前記の膠原病及び悪性腫瘍合併 TTP も含めて ADAMTS13 以外の多因子要因の解析が必要である。

5) 妊娠: 12 例中 5 例(42%)が ADAMTS13 活性著減で、これら全例に同インヒビターを認めた。妊娠時にこのようなインヒビターが発生する機序は明らかでは無い。一方、正常妊娠においては妊娠末期には血中 VWF 抗原量は ~600% に上昇し UL-VWFM も出現する。しかし、多くの正常妊娠においては UL-VWFM 依存性血小板凝集・血栓を生じず、妊娠が維持されるので、この時期には何らかの血栓形成防御機構が働いているものと推定している。

6) 薬物: 15 例中 14 例(93%)で ADAMTS13 活性著減と同インヒビターの出現を認めた。うち 1 例はバイアグラ服用中に生じたものであるが、残り 14 例は抗血小板薬であるチクロピジンに関連したものである^{25,26)}。海外では、チクロピジンに替わって同じチエノピリジン誘導体であ

るクロビドグレルが使用されており、こちらの方がTTPの発症頻度は著しく低いデータが示されている。しかし、この系統の薬剤により同インヒビターが発生する機構は殆ど解明されておらず、早期の解明が待たれる。

7)その他:23例中3例(13%)でADAMTS13活性著減と同インヒビターの出現を認めた。3例のうち2例は慢性肝疾患例であった²⁷⁾。ADAMTS13は、前術のように肝臓で産生されていることが明らかとなり、肝疾患患者での本酵素の動態が注目される。残りの1例は、HIVに関連したものであり、本邦でADAMTS13活性の著減が証明された最初の症例である。海外では、TTP患者ではHIV検査が必須であると言われるほど、TTP患者に占める割合は高いが、本邦でも今後注意すべき疾患であると思われる。

先天性HUS

ADAMTS13非依存性に先天性TMAを起こす原因として、最近factor Hなどの補体調節因子、さらに血管内皮細胞膜蛋白であるCD46などが注目されている。即ち、補体C3は転換酵素によりC3aとC3bとなるが、C3bは血管内皮細胞膜蛋白CD46に結合し、補体調節因子factor H/factor Iによって不活性化される。従って、factor HそしてCD46の分子異常ではこの反応が阻害され、結果としてHUSを起こす症例が欧米で報告されているが、本邦ではこのような症例は報告されていない。我々の集計でもADAMTS13活性の非著減例で、幼小児期発症、反復性、家族性を示す症例が9家系18症例存在した。これらの症例の原因は未だ同定できておらず、補体調節因子を中心に検索を進める予定である。

後天性HUS

・特発性:臨床所見からHUSと診断された中で明らかな基礎疾患のない特発性は56例で、ADAMTS13著減例は全く存在せず(0%)、特発性TTPとは明らかな違いが認められた。

・O157:H7株感染:22例中ADAMTS13著減例は皆無(0%)であった。HUS発症の原因としては、ADAMTS13以外の機序、特に同株が分泌する外毒素(志賀毒素、別名ベロトキシン)の関与が重要と考えられている。この毒素の受容体(globotriarosylceramide, Gb3)は全身の様々な組織にあり、患者に見られる複雑な臨床症状は同毒素の直接作用と、このGb3を持つ血球細胞からのサイトカイン放出を介する二次的作用の双方の関与が想定される²⁸⁾。

・Mitomycin:7例中ADAMTS13著減例は認めなかった(0%)。薬物誘導性TMAでありながらmitomycinではADAMTS13インヒビター陰性である事から、前記チ

エノピリジン誘導体とは全く異なった機序での発症と考えられ、大変興味深い。

今後のADAMTS13研究の課題

以上のように、ADAMTS13の活性測定は、TTPの診断並びに血小板輸血の適否を決定するのに必須であるが、市中病院で使用できる簡便なADAMTS13活性測定法がなかった。Furlanらの原法は、精製VWFを基質とし尿素などの蛋白変性剤存在下において24時間酵素反応を行い、その反応生成物を電気泳動法で解析するという煩雑なものであった。近年、小亀らにより非変性条件下に、短時間で切断できる基質としてVWF-A2ドメインの73アミノ酸残基が報告された(VWF73)²⁹⁾。これを利用したELISAが開発された³⁰⁾が、未切断のペプチドを検出する方法であるため、検出感度が悪いことが問題であった。その後、VWF73に蛍光基を導入した化学合基質を利用する測定法(FRETs-VWF73)が開発された³¹⁾が、ペプチドが高価で蛍光比色計が必要であるなど、実際に臨床現場で使用するには困難であった。我々は、切断生成物を特異的に検出するELISAの確立のために、ADAMTS13により切断されるTyr1605を含むN末端側10アミノ酸残基の合成ペプチドをマウスに免疫し、モノクローナル抗体を作成した。この抗体は未切断VWFとは反応せず、Tyr842を含むN末端側VWF切断断片を特異的に認識した。VWF73ペプチドを基質として、プレート上で切断とその生成物の検出をこの抗体で行うELISAを確立した³²⁾。このELISAは、約3時間で測定可能で、測定限界は0.5%と鋭敏であり、本法を用いることで、TTP患者における血漿交換療法や血小板減少患者における血小板輸血の適応決定が、市中病院においてもADAMTS13活性というエビデンスをもとに行うことが可能となった。

もう一つの課題は、TTP治療にFFPの輸注やFFPを用いた血漿交換が行われているが、FFPによる輸血感染症の問題である。特に、USS患者の多くは、2週間に一度FFPの予防的定期輸注を受けており、長期にわたる輸血のため、C型肝炎などに罹患していることがある。この問題を解決するためには、遺伝子組み換え製剤や血漿から精製したADAMTS13製剤の開発が必要である。我々は、ADAMTS13に対するモノクローナル抗体(A10)⁶⁾を使った蛋白精製方法を最近開発し、血漿から効率良く簡便に同酵素を精製できるようになった。これらの方法をもとに、一刻も早くADAMTS13製剤が発売されることを、多くの関係者が期待している。

最 後 に

本学輸血部では、ADAMTS13 解析を通じて、本邦の TMA582 例という世界でも類を見ない症例数を集積することができた。しかし、その病因を明らかにできたのは ADAMTS13 活性が著減している 191 例 (33%) にしか過ぎず、残りの 2/3 は原因不明のままである。今後、補体調節因子の factor H などの活性測定方法を新たに開発し、TMA の系統的診断を可能にしたいと考えている。

また、ADAMTS13 活性著減例における血小板輸血禁忌のエビデンスを明らかにすることができ、輸血部医師としては大変幸運であった。本稿によって、血小板減少時に血小板輸血禁忌である TTP や本稿では触れなかった HIT を鑑別診断として思い浮かべていただき、病状を悪化させる血小板輸血を回避する助けになれば幸いである。

文 献

- 1) Fujimura, Y., Titani, K. : Structure and function of von Willebrand factor. In: Haemostasis and Thrombosis (Bloom, A.L., Forbes, C.D., Thomas, D.P., Tuddenham, E.G.D., eds). 3rd ed., Churchill Livingstone, London, pp379-395, 1994.
- 2) Ruggeri, Z. M. : Perspective series: cell adhesion in vascular biology, von Willebrand factor. J. Clin. Invest. **99** : 559-564, 1997.
- 3) Matsui, T., Shimoyama, T., Matsumoto, M., et al. : ABO blood group antigens on human von Willebrand factor after ABO-mismatched bone marrow transplantation. Blood **94** : 2895-2900, 1999.
- 4) Matsumoto, M., Kawaguchi, S., Ishizashi, H., et al. : Platelets treated with ticlopidine are less reactive to unusually large VWF multimers than are those treated with aspirin under high shear stress. Pathophys Haemost Thromb **35** : 35-40, 2005.
- 5) Fujimura, Y., Matsumoto, M., Yoshioka, A., et al. : von Willebrand factor-cleaving protease and Upshaw-Schulman syndrome. In : Progress in Hematology. Int. J. Hematol. **75** : 25-34, 2002.
- 6) Uemura, M., Tatsumi, K., Matsumoto, M., et al. : Localization of ADAMTS13 to the stellate cells of human liver. Blood **106** : 922-924, 2005.
- 7) Soejima, K., Matsumoto, M., Kokame, K., et al. : ADAMTS-13 cysteine-rich/spacer domains are functionally essential for von Willebrand factor cleavage. Blood **102** : 3232-3237, 2003.
- 8) Moschcowitz, E. : Hyaline thrombosis of the terminal arterioles and capillaries: a hitherto undescribed disease. Proc. NY Pathol. Soc. : 21-24, 1924.
- 9) Gasser, C., Gautier, E., Steck, A., et al. : Hämolytisch-urämische Syndrome: bilaterale Nierenrindennekrosen bei akuten erworbenen hämolytischen Anämien. Schweiz Med. Wochenschr, **85** : 905-909, 1955.
- 10) Walkentin, T.E., Kelton, J.G. : Acquired platelet disorders. In: Haemostasis and Thrombosis (Bloom, A.L., Forbes, C.D., Thomas, D.P., Tuddenham, E.G.D., eds). 3rd ed., Churchill Livingstone, London, pp767-815, 1994.
- 11) Asada, Y., Sumiyoshi, A., Hayashi, T., et al. : Immunohistochemistry of vascular lesion in thrombotic thrombocytopenic purpura, with special reference to Factor VIII related antigen. Thromb. Res. **38** : 469-479, 1985.
- 12) 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** : 578-1584, 1998
- 13) Tsai, H.M., and Lian, E.C.Y. : Antibodies to von Willebrand factor-cleaving protease in acute thrombotic thrombocytopenic purpura. N. Engl. J. Med. **339** : 1585-1594, 1998.
- 14) Vesely, S.K., George, J.N., Lammle, B., et al. : ADAMTS13 activity in thrombotic thrombocytopenic purpura-hemolytic uremic syndrome: relation to presenting features and clinical outcomes in a prospective cohort of 142 patients. Blood **102** : 60-68, 2003.
- 15) Remuzzi, G., Galbusera, M., Noris, M., et al. : von Willebrand factor cleaving protease (ADAMTS13) is deficient in recurrent and familial thrombotic thrombocytopenic purpura and hemolytic uremic syndrome. Blood **100** : 778-785, 2002.
- 16) Matsumoto, M., Yagi, H., Ishizashi, H., et al. : The Japanese experience with TTP/HUS. Semin

- Hematol. **41** : 68-74, 2004.
- 17) **Kinoshita, S., Yoshioka, A., Park, Y.D., et al.** : Upshaw-Schulman syndrome revisited : A concept of congenital thrombotic thrombocytopenic purpura. *Int. J. Hematol.* **74** : 101-108, 2001.
- 18) **Kokame, K., Matsumoto, M., Soejima, K., et al.** : Mutations and common polymorphisms in ADAMTS13 gene responsible for von Willebrand factor-cleaving protease activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99** : 11902-11907, 2002.
- 19) **Matsumoto, M., Kokame, K., Soejima, K., et al.** : Molecular characterization of ADAMTS13 gene mutations in Japanese patients with Upshaw-Schulman syndrome. *Blood* **103** : 1305-1310, 2004.
- 20) **Uchida, T., Wada, H., Mizutani, M., et al.** : Identification of novel mutations in ADAMTS13 in an adult patient with congenital thrombotic thrombocytopenic purpura. *Blood* **104** : 2081-2083, 2004.
- 21) **Shibagaki, Y., Matsumoto, M., Kokame, K., et al.** : Novel compound heterozygote mutations (H234Q/R1206X) of the *ADAMTS13* gene in an adult patient with Upshaw-Schulman syndrome showing predominant episodes of repeated acute renal failure. *Nephrol Dial Transpl* (in press).
- 22) **Mori, Y., Wada, H., Gabazza, E.C., et al.** : Predicting response to plasma exchange in patients with thrombotic thrombocytopenic purpura with measurement of vWF-cleaving protease activity. *Transfusion* **42** : 572-580, 2002.
- 23) **Kawahara, M., Kanno, M., Matsumoto, M., et al.** : Diffuse neurodeficits in intravascular lymphomatosis with ADAMTS13 inhibitor. *Neurology* **63** : 1731-1733, 2004.
- 24) **van der Plas R.M., Schiphorst, M. E., Huizinga E.G., et al.** : von Willebrand factor proteolysis is deficient in classic, but not in bone marrow transplantation-associated, thrombotic thrombocytopenia purpura. *Blood* **93** : 3798-3802, 1999.
- 25) **Bennett, C.L., Weinberg, P. D., Rozenberg-Bendror, K., et al.** : Thrombotic thrombocytopenic purpura associate with ticlopidine. *Ann. Intern. Med.* **128** : 541-544, 1998.
- 26) **Sugio, Y., Okamura, T., Shimoda K, et al.** : Ticlopidine-associated thrombotic thrombocytopenic purpura with an IgG-type inhibitor to von Willebrand factor -cleaving protease. *Int. J. Hemat.* **74** : 347-351, 2001.
- 27) **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. Hepatology* **42** : 420-421, 2005.
- 28) **Yagi, H., Narita, N., Matsumoto, M., et al.** : Enhanced low shear stress-induced platelet aggregation by Shiga-like toxin 1 purified from *Escherichia coli* O157. *Am. J. Hematol.* **66** : 105-115, 2001.
- 29) **Kokame, K., Matsumoto, M., Fujimura, Y. et al.** : VWF73, a region from D1596 to R1668 of von Willebrand factor, provides a minimal substrate for ADAMTS-13. *Blood*. **103** : 607-612. 2004.
- 30) **Zhou, W., Tsai, H. M.** : An enzyme immunoassay of ADAMTS13 distinguishes patients with thrombotic thrombocytopenic purpura from normal individuals and carriers of ADAMTS13 mutations. *Thromb. Haemost.* **91** : 806-811.2004.
- 31) **Kokame, K., Nobe, Y., Kokubo, Y., et al.** : FRET-VWF73, a first fluorogenic substrate for ADAMTS13 assay. *Br. J. Haematol.* **129** : 93-100. 2005.
- 32) **Kato S, Matsumoto M, Matsuyama M, et al.** : Novel monoclonal antibody-based enzyme immunoassay for determining plasma levels of ADAMTS13 activity. *Transfusion* (in press).

Upshaw-Schulman 症候群 : 妊娠時の仮面を被った血小板減少症

Upshaw-Schulman syndrome: A masqueraded thrombocytopenia during pregnancy

松本雅則 ¹⁾ Masanori MATSUMOTO	松山友美 ¹⁾ Tomomi MATSUYAMA	石指宏通 ¹⁾ Hiromichi ISHIZASHI	植村正人 ¹⁾ Masahito UEMURA	秋山 暢 ²⁾ Nobu AKIYAMA
富山順治 ²⁾ Junji TOMIYAMA	名取一彦 ³⁾ Kazuhiko NATORI	倉石安庸 ³⁾ Yasunobu KURAIISHI	今村 豊 ⁴⁾ Yutaka IMAMURA	井上信正 ⁵⁾ Nobumasa INOUE
日笠 聡 ⁶⁾ Satoshi HIGASA	清家雅子 ⁷⁾ Masako SEIKE	小塚輝彦 ⁷⁾ Teruhiko KOZUKA	原 雅道 ⁷⁾ Masamichi HARA	小亀浩市 ⁸⁾ Koichi KOKAME
宮田敏行 ⁸⁾ Toshiyuki MIYATA	藤村吉博 ¹⁾ Yoshihiro FUJIMURA			

要 旨

妊娠時血小板減少症の鑑別すべき疾患として、特発性血小板減少性紫斑病 (ITP)、HELLP (hemolysis, elevated liver enzymes, and low platelet count) 症候群、播種性血管内凝固症候群 (DIC) などが知られている。一方、血栓性血小板減少性紫斑病 (TTP) は、その頻度が少ないことから、妊娠時血小板減少症の原因として認識されることは少ない。しかし、最近、TTP では von Willebrand 因子 (VWF) 切断酵素 (ADAMTS13) 活性が著減することが報告され、その頻度は少なくないことが明らかとなった。

今回、我々は、妊娠 20 週以降に血小板減少を含む症状で、初めて先天性 TTP (Upshaw-Schulman 症候群 : USS) と診断された 5 家系 8 症例を経験した。これらの症例は、小児期に血小板減少の既往があるものが多く、妊娠後も ITP や HELLP 症候群と診断されていた。USS は、習慣流産の原因となるばかりが、妊娠の継続は妊婦を致死危険にさらすことになり、早期の診断が必要である。そのためには、妊娠時の血小板減少症の鑑別診断として USS の存在に留意し、早期に ADAMTS13 活性を測定することが重要である。

ABSTRACT

Upshaw-Schulman syndrome (USS) is a congenital thrombotic thrombocytopenic purpura (TTP) characterized by a deficiency of ADAMTS13 activity due to its gene mutations. More than half of USS patients have an episode of severe jaundice during the newborn period and require exchange blood transfusions. Beyond this period, however, the clinical manifestations of USS vary significantly from patient to patient, and do not usually include Moschowitz's pentad, a hallmark of TTP. However, a consistent clinical sign in these patients is an occasional or chronic thrombocytopenia that is enhanced by precipitating factors such as viral infections and pregnancy. Therefore, USS patients are often incorrectly diagnosed with idiopathic thrombocytopenic purpura (ITP) or Evans syndrome during childhood, and the underlying ADAMTS13 gene defects are overlooked. Here, we report on 8 female USS patients belonging to 5 different families, including 3 pairs of siblings. Their clinical signs of TTP are not prominent at early stage of pregnancy, and often masqueraded as a simple thrombocytopenia until 20-30 weeks of gestation. Thus, pregnant women with thrombocytopenia need to be routinely determined ADAMTS13 activity.

Key words ; thrombocytopenia, pregnancy, Upshaw-Schulman syndrome (USS), congenital thrombotic thrombocytopenic purpura (TTP)

1) 奈良県立医科大学輸血部 : Nara Medical University 2) 都立墨東病院血液内科 : Metropolitan Bokutoh Hospital

3) 東邦大学大森病院血液腫瘍科 : Toho University Omori Medical Center 4) 聖マリア病院血液内科 : St. Mary's Hospital

5) 国立病院機構大阪医療センター総合内科 : National Hospital Organization Osaka National Hospital

6) 兵庫医科大学血液内科 : Hyogo College of Medicine 7) 愛媛県立中央病院血液腫瘍科 : Ehime Prefectural Central Hospital

8) 国立循環器病センター研究所 : National Cardiovascular Center Research Institute

はじめに

妊婦の血小板数は、妊娠経過によって変動を認めないと言われているが、妊娠高血圧症候群などでは減少することが知られている。また、特発性血小板減少性紫斑病 (idiopathic thrombocytopenic purpura: ITP) は、若年女性によく見られることから妊娠時の血小板減少症の鑑別診断としては重要である。その他に、HELLP(hemolysis, elevated liver enzymes, and low platelet count) 症候群、DIC(disseminated intravascular coagulation) などによって妊娠時に血小板が減少することが良く知られている。

血小板減少症の鑑別診断として、血栓性血小板減少性紫斑病 (thrombotic thrombocytopenic purpura : TTP) は重要であるが、一般臨床医にはその頻度は低いと認識されていることより、鑑別診断が十分に行われていないのが現状ではないかと思われる。最近我々は、妊娠中の症状で初めて先天性 TTP(別名 Upshaw-Schulman 症候群 : USS) と診断された 5 家系 8 症例を経験した。これらの症例は、当初 ITP や HELLP 症候群などと診断されており、USS は妊娠中の血小板減少を示す患者において鑑別すべき重要な疾患である。本稿では、まず最近明らかになった TTP および USS の病態について概説し、その後個々の症例について報告する。

TTP と ADAMTS13

TTP は 1924 年に Moschcowitz¹⁾ によって最初に報告され、血小板減少、細血管障害性溶血性貧血 (microangiopathic hemolytic anemia : MAHA)、腎機能障害、発熱、動揺性精神神経障害を古典的 5 徴候とする疾患である。一方、血小板減少、MAHA、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)²⁾ は臨床現場においては TTP と鑑別がしばしば困難であり、成人で精神神経症状を認めれば TTP、小児で腎機能障害が強ければ HUS と診断される傾向があった。近年 von Willebrand 因子 (VWF) 特異的切断酵素 (別名 ADAMTS13 : a disintegrin-like and metalloproteinase with thrombospondin type 1 motifs

13) の活性測定法が確立され^{3) 4)}、TTP 症例の多くではこの酵素活性が低下していることが示された。TTP の多くは後天性であるが、先天性のものも存在し、後者では本酵素の遺伝子異常により、前者では IgG 型インヒビター (自己抗体) の出現により ADAMTS13 活性が著減することが明らかとなった^{3) 4)}。

ADAMTS13 活性が欠損した場合の TTP の発症機序は以下のように説明できる⁵⁾ (Figure 1)。VWF は、主として血管内皮細胞で産生されるが、血管内皮細胞から放出されて間もない VWF は、超高分子量 VWF マルチマー (unusually large VWF-multimers : UL-VWFM) と呼ばれ、通常サイズの VWF より比活性が高く、高ずり応力下で容易に血小板血栓を引き起こす⁶⁾。健常人においては、UL-VWFM は ADAMTS13 の存在によって切断され、循環血液からすみやかに消失する。しかし、TTP 患者においては本酵素活性が低下しているため UL-VWFM が循環血液中に存在し、高ずり応力が生じる細小血管などで血小板血栓が形成され血管を閉塞する。その結果、消耗性の血小板減少と精神神経障害や腎機能障害などの臓器障害を引き起こすと考えられている。

Upshaw-Schulman 症候群

1960 年に米国の Schulman らは、血小板減少と溶血性貧血を繰り返すものの凝固検査では異常を示さない 8 才の女兒を報告した⁷⁾。この女兒は、新生児期に手背の出血斑を認め、その後、血小板減少を繰り返し、ITP の診断を受けたこともあった。この症例の特徴的なことは、種々の先行感染に引き続き出血症状および血小板減少を認めるが、少量の新鮮凍結血漿 (fresh frozen plasma : FFP) 輸注によって劇的に改善することであった。1979 年には Upshaw⁸⁾ が、29 才の女性で生後 6 ヶ月から 12 才の間、血小板減少と溶血性貧血の発作を反復し、FFP 輸注によって症状が改善する症例を報告した。それ以降も小児期の TTP/HUS 症例が報告され、家族性 TTP/HUS や慢性反復性 TTP (chronic relapsing TTP : CR-TTP) などの名前と呼ばれていた。これらの報告から同一家系内で 2 名以上の患者が認められるが、両親は無症状であることから、遺

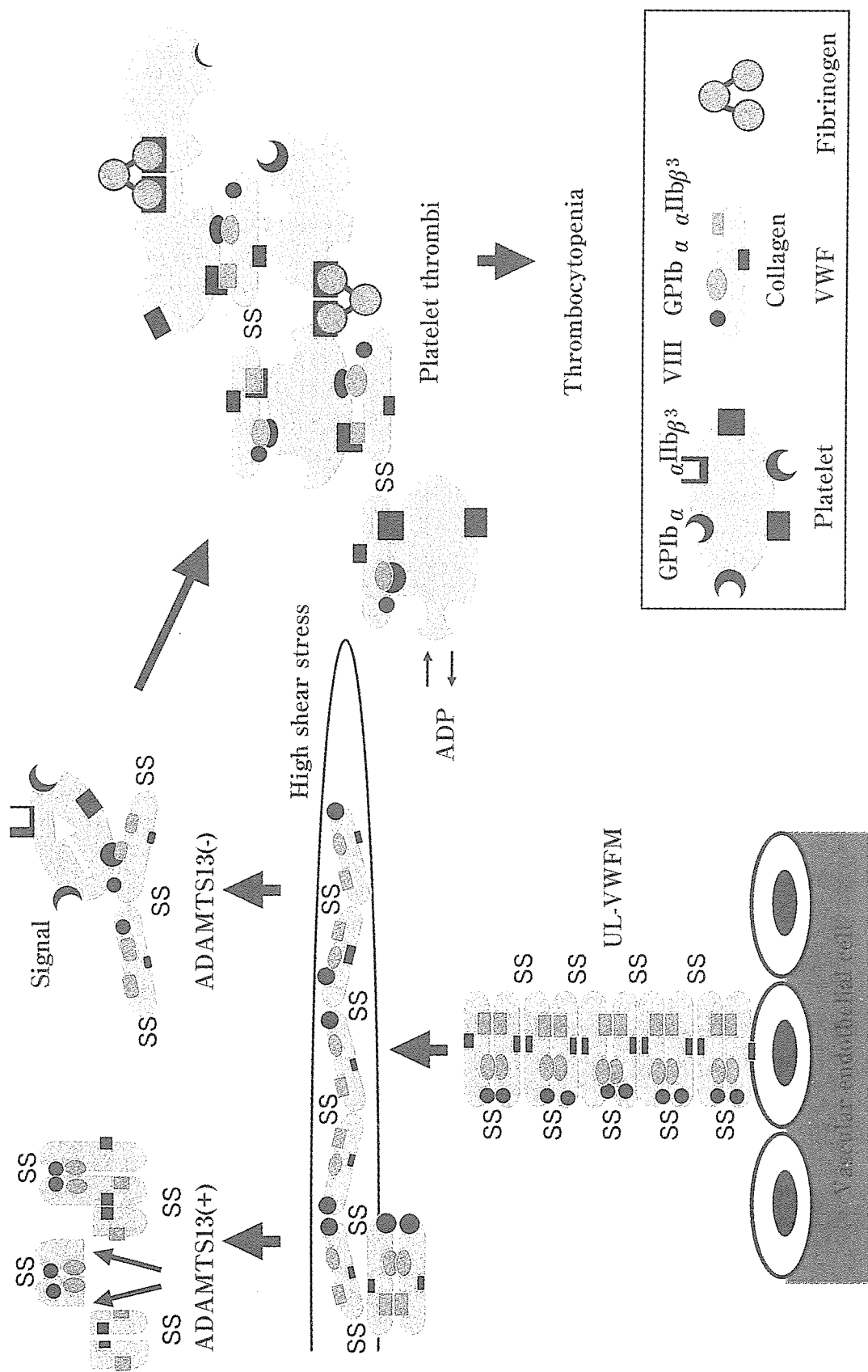


Figure 1. A proposed mechanism of TTP under the deficient plasma ADAMTS13 activity

UL-VWF (unusually large VWF-multimers) are produced exclusively in vascular endothelial cell and released into circulation. In peripheral small arteries where high shear stress is continuously generated, UL-VWF may change their molecular conformation to the activated (extended) form, which is more accessible to ADAMTS13. In TTP (thrombotic thrombocytopenic purpura) patient, however, this enzyme activity is absent and therefore the activated UL-VWF interacts more intensively with platelet. This reaction leads to the formation of platelet microaggregates with VWF (von Willebrand factor) and fibrinogen, resulting in thrombocytopenia.

伝形式は常染色体劣性遺伝であることが予想された。しかし、患者の両親はほとんどが血族結婚でないことから、その遺伝形式には疑問がもたれていた。

1982年にMoakeら⁹⁾は、Schulmanらの最初の報告例を含む4例のCR-TTP患者の血漿中に、寛解期にはUL-VWFMが出現し、急性期には消失すると報告した。彼らはTTPとVWFの関連を初めて報告したが、VWFの動態と病態との関連を全く説明し得なかった。1997年になりFurlanら¹⁰⁾は、CR-TTP4例の患者ではADAMTS13活性が著減していることを報告した。しかし、Furlanらの症例は、2例は同胞例で先天性と考えられるが、残り2例は臨床症状から後天性である可能性があった。そこで、筆者ら¹¹⁾は、本邦USS3家系のADAMTS13活性を測定し、患者はいずれも3%未満に低下しており、患者両親は約50%であることを報告した。その後、USSはADAMTS13遺伝子異常による先天性疾患であることが明らかとなった¹²⁾。我々は、本邦において23家系28症例のUSSを診断し、そのうち17家系22症例のADAMTS13遺伝子解析を終了した。このうち、20例は一方のアレルに1つのADAMTS13遺伝子異常が存在し、他方には全く異なる遺伝子異常が存在する複合ヘテロ接合体であり、残り2例が同じ遺伝子異常を一組持つホモ接合体であった。現在までに我々が報告した本邦USS9例¹³⁻¹⁶⁾のADAMTS13遺伝子異常部位をFigure 2に示す。

USSの特徴的な症状として、新生児期に重症黄疸のため交換輸血を受けていることが多い⁵⁾¹¹⁾。その後、ウイルス感染などに伴って発作的に血小板減少を認めることもある。またTTP発作の予防のため2-3週に一度FFPの定期輸注を受けている症例が多い。このように、ADAMTS13活性が著減している先天性疾患でありながら、常に血小板減少などの症状があるわけではなく、ウイルス感染や妊娠などの誘因が加わって症状が顕正化する。妊娠時にUSSが悪化する理由としては、ADAMTS13の基質であるVWFの増加によることが予想される。妊娠経過にしたがって、血漿中のVWFの生物学的活性および抗原量は共に増加し、妊娠末期にピークに達する¹⁷⁾。このため、非妊娠時には症状がみられなくても、妊娠時にはVWFが増加することによって血小板血栓が産生され、TTPの症状が出現すると考えられる。

症例

奈良医大輸血部では、全国の医療機関からADAMTS13活性測定依頼を受け、平成17年11月末までにTTP/HUS症例643例の解析を終了した¹⁸⁾。それらの症例の中にはUSSが28症例存在し、妊娠時のTTP症状によって発見された症例は5家系8症例であった。これらの症例を以下に提示し、家系図および患者・家族のADAMTS13活性をFigure 3に示す。

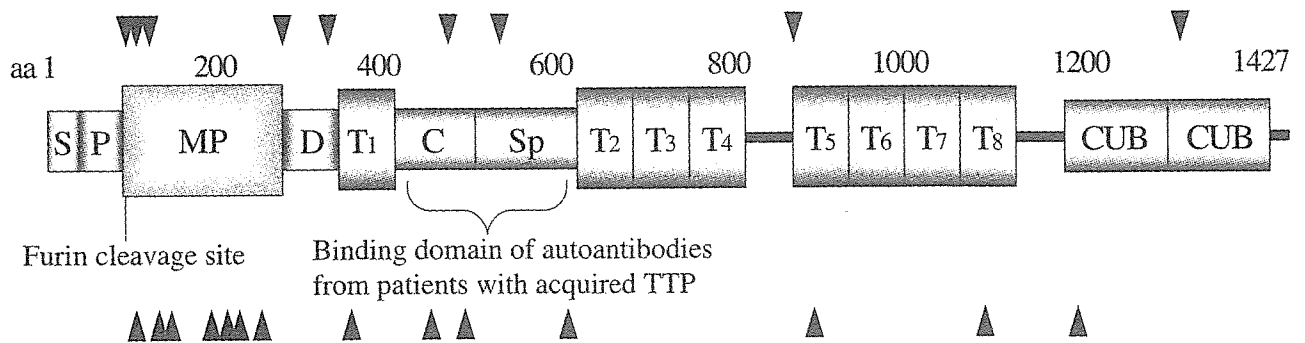


Figure 2. Primary structure of ADAMTS13 and ADAMTS13 gene mutations responsible for USS

ADAMTS13 is a metalloproteinase with multidomain structure and consists of 1427 amino acid residues. (S: signal peptide, P: propeptide, MP: metalloprotease domain, D: disintegrin-like domain, C: cysteine-rich domain, Sp: spacer domain, T: TSP1 motif) Fourteen ADAMTS13 mutations responsible for USS (▲) have been reported in 9 Japanese patients with USS. Nine novel mutations (▼) were found in patients described in this article.

TTP: thrombotic thrombocytopenic purpura; USS: Upshaw-Schulman syndrome

家系 K

両親に出血症状、血栓症の既往はない。

姉(K-3)：1976年生。新生児期の重症黄疸は認めなかった。6才時に発熱に伴い鼻出血があり、血小板減少を認め、ITPとして治療を受けた。その後、同様の発作を数度経験した。2002年2月に発熱に伴い、鼻出血が出現し、ITPと診断され、ステロイド治療など入院加療を受けた。同年6月に第一子の妊娠が判明し、この時の血小板数は180,000/ μl であった。妊娠初期はステロイドを内服していたが、妊娠5ヶ月で中止した。妊娠6ヶ月に血小板減少(29,000/ μl)を認めたため、ステロイドを再開した。しかし、血小板が15,000/ μl まで低下したため、近医へ入院となった。ガンマグロブリン大量療法が行われたが、意識障害が出現し、TTPの古典的5徴候が揃ったため、血漿交換を目的として転院となった。第一病日に血漿交換を一度行ったが、子宮内胎児死亡が確認されたため、帝王切開、子宮全摘術が施行された。手術所見として、子宮の切断血管断端に血栓が認められた。第二病日の血漿交換後、意識レベルが回復し、その翌日はFFP6単位の輸注のみが行われた。その後、血小板数は100,000/ μl 以上に上昇したが、第19病日で49,000/ μl 、21病日で27,000/ μl まで低下した。そのため、FFP4単位を投与したところ、血小板が150,000/ μl に上昇した。この時のADAMTS13活性は著減しており、インヒビターは陰性であったことからUSSと診断された。以後、約3週間に一度、FFP4単位の定期輸注を現在まで継続している。

妹(K-4)：1978年生。新生児期に重症黄疸にて、交換輸血を受けた。また、3才頃に血小板減少を認めたため、父親をドナーとした血小板輸血の既往がある。その後は、明らかな出血症状は認めなかった。2002年8月に第一子妊娠が明らかとなり、その時点での血小板数は200,000/ μl であった。妊娠6ヶ月の時点で、血小板数が59,000/ μl に低下していたが、Hb 9.1g/dlの軽度の貧血を認めるのみで、腎機能障害、発熱、精神神経症状は認めなかった。同時期に姉が、USSであることが判明し、妹もADAMTS13活性が著減し、インヒビターは陰性であったことより、USSと診断された。そこでFFP

を4単位投与したところ、血小板数は300,000/ μl まで上昇した。しかし、約3週後に血小板数が再度100,000/ μl 以下に低下したため、FFPを4単位投与し、血小板数を維持した。妊娠29週で突然胎児心音が弱くなったため、緊急帝王切開が行われ、無事健児を出産した。児の血小板数は正常であった。母は、その後も3週間に一度4単位のFFP輸注を継続している。

家系 L

父は、57才時に交通事故で死亡した。母は現在62才で膀胱癌にて加療中である。両親ともに出血症状、血栓症の既往はない。

姉(L-2)：1967年生。新生児期に重症黄疸なく、小児期に血小板減少の既往はない。1994年に第一子を妊娠し、当初正常であった血小板数が、妊娠27週に38,000/ μl に低下した。急性腎不全も伴い、妊娠28週で胎児が死亡した。その後、自然に血小板数は正常値まで回復し、FFPの定期輸注は必要としなかった。HELLP症候群もしくは抗リン脂質抗体症候群(APS)が疑われた。APSを疑ったため、以降アスピリン少量(81mg)の内服を開始し、1995年に第二子妊娠した。血小板数が21,000/ μl にまで低下し、尿蛋白も高度となったため、妊娠37週で帝王切開となり、無事健児を得た。分娩後、血小板数は、正常に復した。1997年、アスピリンを内服しながら第三子を妊娠した。軽度の血小板減少を認めたのみで、妊娠37週に帝王切開にて健児を得た。2000年に双胎を妊娠した。血小板が53,000/ μl まで低下し、溶血性貧血も認めたため、Evans症候群を疑われ、ステロイドが開始された。全身浮腫、胸水も出現したため、妊娠32週に帝王切開にて2人の健児を出産した。出産後、血小板数は200,000/ μl まで回復したが、2-4週間後に50,000/ μl まで低下した。自然経過で血小板数は正常に復した。2ヶ月後に血小板減少を認めたが、ステロイドの増量のみで回復した。その後、ステロイド、アスピリンとも中止したが、再燃は認めていない。

妹(L-3)：1972年生。新生児重症黄疸認めず。1995年に感冒後に、血小板が70,000/ μl まで低

下したが、自然に軽快した。1998年に第一子を妊娠したが、妊娠24週から尿蛋白、血小板減少(20,000/ μl)を認めた。Evans症候群としてステロイドなどの加療を受けたが、妊娠25週にて胎児死亡が確認された。その後、血小板数は自然に回復し、無治療の状態となった。1999年第二子を妊娠したが、妊娠24週にて肉眼的血尿を認めたため入院となった。血小板減少(14,000/ μl)と腎不全を認め、体液貯留傾向が強いため、TTP/HUSが疑われた。血漿交換と血液透析を受けたが、母体の状態が改善しなかった。そのため、分娩誘発を行い、妊娠24週で経膈的に娩出したが、胎児は死亡した。胎盤に梗塞を認めたが、胎児には肉眼的な異常はみられなかった。その後、母親の検査データは急速に回復し、それ以降、妊娠歴もなく、再発も認めていない。

この姉妹は、2003年にADAMTS13活性著減、インヒビター陰性より、USSと診断された。

家系 M

家族歴として、この姉妹の兄/姉(第一子)が、妊娠8ヶ月で常位胎盤早期剥離にて死産。

姉(M-3): 1969年生。新生児期の重症黄疸はなし。小児期に血小板減少の既往はなし。2002年に第一子を妊娠した。妊娠17週に両下肢に紫斑が出現し、浮腫も認めるようになった。蛋白尿も悪化し、妊娠19週に血小板減少(16,000/ μl)を含むTTPの5徴候が出現し、血漿交換を受けたが、妊娠20週にて流産した。その後、血小板減少などの検査所見は急速に回復した。約1ヶ月後に、血小板が再度24,000/ μl にまで減少したため、FFP4単位を3日間輸注した。それによって血小板数は上昇したが、1ヶ月後に血小板数が低下したため、FFPの投与を行ったところ、血小板は正常に復し、以降血小板減少は認めていない。

妹(M-4): 1971年生。新生児重症黄疸なし。小児期の血小板減少もない。2001年に第一子を妊娠

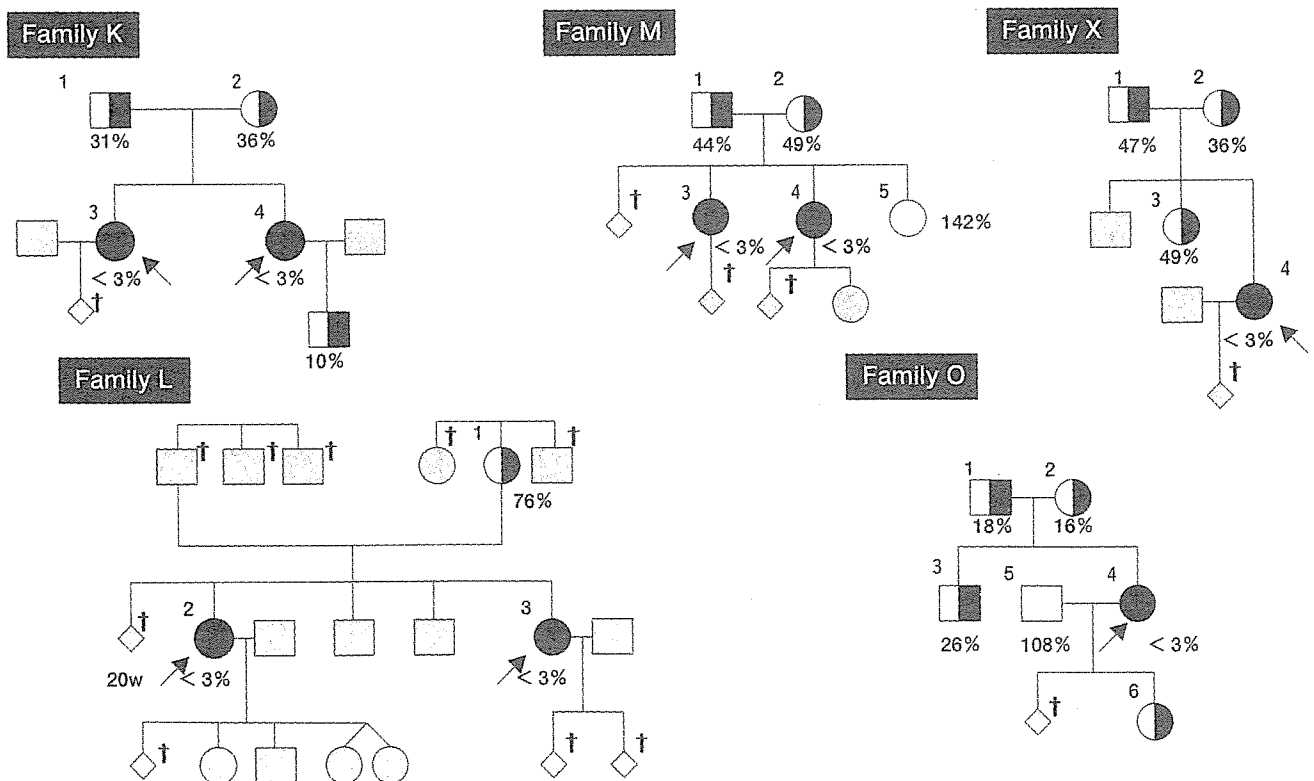


Figure 3. Pedigree of patient families and ADAMTS13 activity

Squares and circles indicate male and female, respectively. Closed circles with arrows indicate patients. The half-filled circles and squares represent asymptomatic carriers. The ADAMTS13 activity is shown as a percentage of the normal control.