

Table 1 Classification of ITP

	Acute ITP	Chronic ITP
Peak age	2-5 y.o.	20-40 y.o., 60-80 y.o.
Gender	Male 1 : Female 1	Young generation; male 1 : female 3 Old generation; not particular
Season	Winter - Spring	Not particular
Onset	Abrupt	Insidious
Antecedent infection	Common Viral infection, Vaccine inoculation	Unusual
Bleeding tendency	Severe	Mild
Duration	2-6 weeks, Less than 6 months	Longer than 6 months

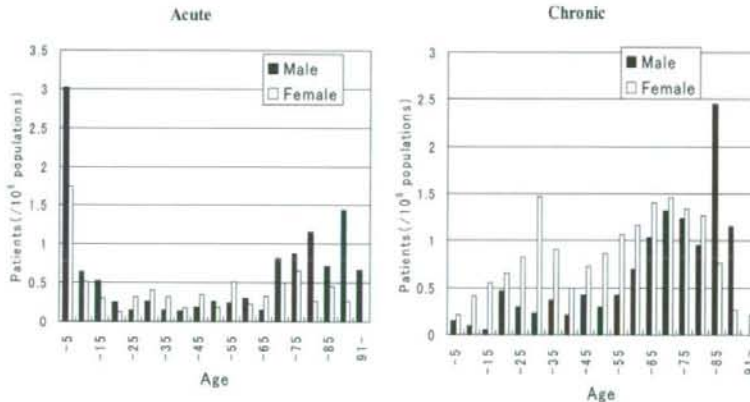


Fig. 1 Age distribution of newly diagnosed ITP

The numbers of newly diagnosed ITP per 10^5 populations in 2005 are indicated. In addition to the well-known peak age of incidence between 20 y.o. and 40 y.o. in female, new peak between 60 and 80 y.o. is noted.

清中には親和性の弱い抗体しか存在していないと考えられる。実際、血清抗体よりも血小板結合抗体のほうが検出率は高く、さらに治療により血小板数が増加すると血小板結合抗体は減少するが、血清中の抗体はほとんど変化しない^{8,14)}。さらに血清中の抗体と血小板結合抗体は必ずしも同一ではなく、血清中には GPIIb-IIIa の細胞内領域を認識する抗体や細胞内蛋白である vinculin に対する抗体が存在しており、これらは血小板破壊により二次的に誘導された可能性が考えられる¹⁴⁻¹⁸⁾。これらの成績より血清抗体よりも血小板結合抗体が密接に ITP の病態と関連しており、血小板破壊に主要な役割を果たしてい

ると考えられる。

ITP における血小板減少の主たる病態は、血小板の破壊亢進である。血小板の寿命は健康人において 8~10 日であるが、ITP 患者では血小板寿命は正常の 1/10 以下に短縮している。ITP においては、基本的には赤血球系や白血球系において、形態異常や数の異常を認めない。慢性 ITP では血小板は抗血小板自己抗体 (主に IgG) により感作されており、自己抗体に感作された血小板は早期に脾臓などの網内系においてマクロファージなどに存在する免疫グロブリンの Fc 部分に対する受容体 (Fc 受容体) を介して捕捉され、破壊され血小板減少をきたす。

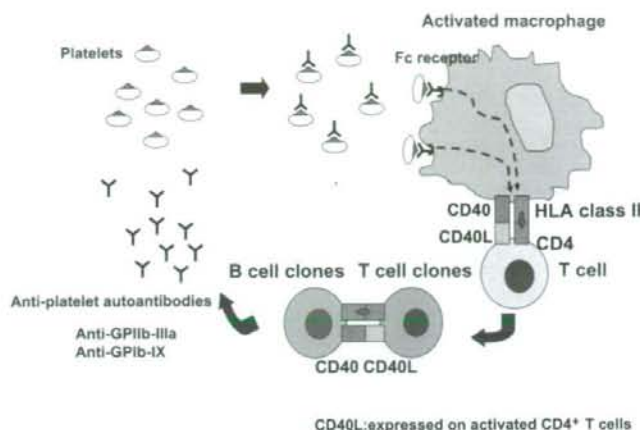


Fig. 2 Pathophysiology of early platelet destruction in ITP

Autoantibodies against platelet membrane GPIIb-IIIa and/or GPIb-IX are mainly produced by spleen, and the autoantibody-bound platelets are rapidly cleared by macrophages in the reticuloendothelial system (mainly spleen). As an antigen-presenting cell, macrophages expressing the processed antigen peptide of GPIIb-IIIa and/or GPIb-IX on their surface further promote autoantibody production.

また、血小板 GPIIb-IIIa や GPIb-IX などの標的抗原は抗原提示細胞であるマクロファージによりプロセッシングを受け、その HLA 上に表出され、抗体産生を誘導する。このように ITP では、脾臓が主な血小板破壊部位であると共に、血小板抗体産生部位でもある (Fig. 2)^{1,2)}。

巨核球はトロンボポエチン (TPO) などの様々なサイトカインにより造血幹細胞から分化・成熟し最終的に血小板を産生・放出する。ITP においては巨核球の成熟障害や細胞障害を生じており、血小板産生が抑制されていることが示されている。血小板抗体は骨髄巨核球にも結合し、これらの障害を引き起こしていると考えられる¹⁹⁾。

臨床症状

皮下出血、歯肉出血、鼻出血、性器出血など皮膚粘膜出血が主症状である。血尿、消化管出血、吐血、網膜出血を認めることもある。高度の粘膜出血を認める場合は、消化管出血や頭蓋内出血をきたす危険があり、早急な対応が必要である。血友病など凝固因子欠損症で見られる関節内出血や筋肉内出血は、ITP では通常認めない。

検査成績

血小板減少以外に特に異常所見を認めないが、出血の持続により貧血を示すことがある。白血球数、白血球分類には特に異常を認めない。出血時間は延長。凝固検査は正常。骨髄検査では、巨核球数は正常あるいは増加し

ており、その他に特に異常を認めない。

診断

ITP の診断に関しては、いまだに他の疾患の除外診断が主体となる。Table 2 に「血液凝固異常症に関する調査研究」班の ITP の新しい診断基準案を提示する²⁰⁾。血小板数は 10 万/ μ l 未満としている。しかしながら、血小板数が 10 万/ μ l 未満になれば出血傾向が認められるわけではなく、出血傾向が明らかになるのは血小板数が約 5 万/ μ l 以下の場合である。

ITP と同様の免疫学的機序で血小板が減少する病態として、全身性エリテマトーデスなどの膠原病やリンパ系腫瘍、HIV 感染などが挙げられるが、これらの疾患に伴う血小板減少は二次的 ITP として分類される。詳しい病歴の聴取や身体所見、時には骨髄穿刺により先天性血小板減少症や薬剤性血小板減少症、さらには血小板産生障害に起因する骨髄異形性症候群や再生不良性貧血などの鑑別を行う (Table 3)。

また、EDTA 依存性偽性血小板減少症を除外することは極めて重要である (特に血小板数が 3~5 万/ μ l 以下の症例で無症状の場合や検査コメントに血小板凝集とある場合は積極的に疑うべき)。末血用のスピッツには抗凝固剤 EDTA-2K が含まれているため、EDTA 依存性の抗体により血小板が凝集し自動血球計数器において白血球と認識され、血小板数低値となる。塗抹標本や抗凝固剤

Table 2 Preliminary Laboratory Based Criteria for the Diagnosis of Immune Thrombocytopenic Purpura (ITP) at Presentation²⁰⁾

1. Thrombocytopenia ($<100 \times 10^9/l$) without morphologic evidence for dysplasia in the peripheral blood film
2. The presence of any three or more, including at least one of (iii), (v), and (vi), of the following laboratory findings:
 - (i) absence of anemia,
 - (ii) normal leukocyte count,
 - (iii) increased anti-GPIIb/IIIa antibody producing B cell frequency,
 - (iv) increased platelet-associated anti-GPIIb/IIIa antibody level,
 - (v) elevated percentage of reticulated platelets, and
 - (vi) normal or slightly increased plasma TPO level ($<300 \text{ pg/ml}$)

For the diagnosis of ITP, both criteria must be met. Idiopathic or primary ITP can be diagnosed in the absence of conditions that potentially cause secondary ITP, for example SLE, antiphospholipid syndrome, lymphoproliferative disorders, infection with HIV, and liver cirrhosis.

Bone marrow examination is recommended in patients over 60 years or with findings that are atypical for ITP.

TPO, thrombopoietin; SLE, systemic lupus erythematosus;

HIV, human immunodeficiency virus.

Table 3 Classification of Thrombocytopenia

[Hereditary thrombocytopenia]	
Congenital amegakaryocytic thrombocytopenia	
Thrombocytopenia with absent radius syndrome (TAR)	
May-Hegglin anomaly	
Bernard-Soulier syndrome	
Wiskott-Aldrich syndrome	
[Acquired thrombocytopenia]	
I. Decreased platelet production	
① Hypoplasia of megakaryocytes	Aplastic anemia
	Suppression of thrombopoiesis due to radiation, chemotherapy, etc
	Involvement of abnormal cells in bone marrow (leukemia, cancer, etc)
② Ineffective thrombopoiesis	Megaloblastic anemia
	Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH)
	Myelodysplastic syndrom (MDS)
II. Increased platelet destruction	
① Immunological mechanism	Autoimmune (idiopathic) thrombocytopenic purpura (ITP)
	Secondary immune thrombocytopenia
	(SLE, HIV, lymphoproliferative disorders, etc)
	Drug-induced immune thrombocytopenia (quinidine, heparin, etc)
	Alloimmune thrombocytopenic purpura
	Neonatal alloimmune thrombocytopenia
	Posttransfusion purpura
② Nonimmunological mechanism	Disseminated intravascular coagulation (DIC)
	Thrombotic thrombocytopenic purpura (TTP)
III. Abnormal platelet distribution	
	Hypersplenism
IV. Others	
	EDTA-dependent pseudothrombocytopenia

なしの採血直後に測定し血小板数が正常であることを確認する。治療は不要である²¹⁾。

PAIgG (Platelet-associated IgG, 血小板関連 IgG) の測定は、2006年に保険収載された。ITP においてはその90%以上の症例において PAIgG が上昇しておりその疾患感受性は高いが、PAIgG は血小板に結合した(あるいは付着した)非特異的な IgG も測定するため再生不良性貧血などの血小板減少時にも PAIgG が高値になることがあり、その特異性は低く27%とも報告されている²²⁾。そのため ITP の診断において PAIgG の診断的意義は少ない。

一方、補助診断として以下のような特異的な検査が開発されている。

1) GPIIb-IIIa もしくは GPIb-IX に対する自己抗体検出

前述のように ITP における自己抗体の主要な標的抗原として GPIIb-IIIa もしくは GPIb-IX が明らかにされている。これらの抗原特異的な抗体検出の ITP の診断特異性は80~90%と高い。しかしながら、モノクローナル抗体を用いて血小板膜蛋白を固相化する modified antigen-captured ELISA や immunobead assay での抗体検出感度は ITP の約40~60%と低く、この点が問題である^{23, 24)}。

2) 網状血小板数および血清トロンボポエチン (TPO) 値の測定

ITP では幼若血小板の指標としての網状血小板数が増加しており、また血小板造血因子である血清 TPO 値は正常ないしは軽度増加しているのみである。一方、再生不良性貧血など造血障害による血小板減少では血清 TPO 値は著増する。筆者らの検討では、血小板産生低下症例(再生不良性貧血および化学療法後の血小板減少症)と

ITP の鑑別において、網状血小板数が増加し且つ TPO が正常である場合を ITP と診断すると、その疾患感受性は69%、特異性は100%であり、ITP の診断に有用であると考えられる²⁵⁾。

上記の検査は ITP の病態に基づいた診断法であり特異性も高いが、残念ながら現在のところ保険適応はなく、日常臨床での使用には至っていない。

治療

Table 4 にアメリカ血液学会の ITP に対する初回治療指針を示している²⁶⁾。ITP では血小板数が3万/ μ l 以上では死亡率は正常コントロールと同じであるが、3万/ μ l 以下だと出血や感染が多くなり死亡率が約4倍に増加すると報告されており²⁷⁾、3万/ μ l 以上であれば比較的予後は良好である。従って治療目標としては、血小板数3万/ μ l 以上、できれば5万/ μ l 以上を維持するように努める。血小板が5万/ μ l 以上あれば出血傾向は認めないため、無治療での経過観察とする²⁶⁾。このように ITP では血小板数を正常に維持する必要はなく、正常を維持するために高用量の副腎皮質ステロイドを長期に使用するべきではない。

A. 標準的治療

1. 副腎皮質ステロイド療法

ITP は血小板に対する自己抗体が産生される自己免疫疾患であるため、その治療には副腎皮質ステロイド(プレドニソロン)が有効である。副腎皮質ステロイドは網内系における血小板の貪食および血小板自己抗体の産生を抑制する。血小板数3万/ μ l 以下の症例、3~5万/ μ l

Table 4 Initial Therapy for Chronic ITP (A Practice Guideline, ASH)²⁶⁾

Platelet count	<20,000/ μ l	20,000-30,000/ μ l	30,000-50,000/ μ l
Asymptomatic	Prednisone	No treatment or Prednisone ¹⁾	No treatment or Prednisone ²⁾
Minor purpura	Prednisone	Prednisone ¹⁾	No treatment or Prednisone ²⁾
Mucous membrane bleeding that may require clinical intervention	Prednisone Hospitalization	Prednisone	Prednisone
Sever, life threatening bleeding	Hospitalization IVIg Prednisone	Hospitalization IVIg Prednisone	Hospitalization Prednisone IVIg

1) Patients age 60 or older or patients who have major risk factors for bleeding. (eg, elevated blood pressure, ulcer disease, vigorous lifestyle).

2) Patients who have major risk factors for bleeding. (eg, elevated blood pressure, ulcer disease, vigorous lifestyle).

で出血症状を伴う症例が対象。特に口腔内や鼻腔内の出血を認める場合は積極的に治療を行う。50~75%において血小板が増加するが、多くは副腎皮質ステロイド減量に伴い血小板が減少する。4~6週間投与後、血小板数増加なくとも徐々に減量。血小板数および出血症状を見ながら5mgの割合でゆっくり減量し10mg/日で維持。経過が良ければさらに減量する。

2. 摘脾

発症後6か月以上経過し、ステロイドの維持量にて血小板数3万/ μ l以上を維持できない症例、ステロイドの副作用が顕著な症例は積極的に摘脾を行う。寛解率は約60%。摘脾の1週間前よりガンマグロブリン大量療法(後述)にて血小板を増加させる。

3. *H. Pylori* 除菌療法 (保険適応外)

最近、本邦におけるITPの治療に関して、*H. Pylori* 除菌療法の有効性が示されている。*H. Pylori* 感染ITPにおいて除菌療法奏功例のうち約60~70%において血小板増加が認められる。保険適応外ではあるが副作用が少なく安価であり有効性が高いため、早急な治療を必要としない患者には、第一選択として試みる価値がある。保険適応を獲得すべく「血液凝固異常症に関する調査研究」班(池田班)にて調査検討中。出血症状を伴う例に対しては、ステロイド療法をまず選択し、血小板数が比較的安定した時点で除菌療法を試みる²⁸⁾。

B. 難治性ITPの治療

本項で述べる薬剤はすべてsecond lineの治療法であり、ステロイド療法無効例で、摘脾が無効あるいは困難な症例に限定すべきである。

薬剤としては、シクロフォスファミド、アザチオプリンなどの免疫抑制剤やダナゾール、ビンカルカロイドなどが挙げられる。しかしながら、これらの薬剤の中でどれが最も有効であるか、またどの順番に用いるべきか、に関しては比較試験が無いため不明である。いずれの薬剤も完全寛解率(血小板数15万/ μ l以上)は50%以下である。ダナゾールでは、肝障害を高率に認めるため定期的な肝機能のチェックが必要。ダナゾール、アザチオプリンは妊婦には禁忌である^{29,30)}。

以下に最近注目されている治療法を述べる。

1. 抗CD20抗体(リツキシマブ) (保険適応外)

ITPでは抗血小板自己抗体がその病態の中核をなしているため、抗CD20抗体の有効性が期待される。抗CD20抗体はB細胞性リンパ腫に対して開発されたが、自己抗体産生B細胞に対しても細胞傷害作用を有することより現在までに種々の自己免疫疾患に対してその有効性が示されている。ITPに対しては、本邦では適用外であるが、欧米における解析では、難治例の30%に完全寛

解(血小板数15万/ μ l以上)、28%に部分寛解(5万~15万/ μ l)を誘導しうるとされている。一方、難治例に限定せず摘脾例以外も含めた解析では、46%に完全寛解、24%に部分寛解を誘導しうるとの成績である^{31,32)}。

2. トロンボポエチン受容体アゴニスト

ITPでは血小板造血が障害されていること、また血清TPO濃度が正常~軽度上昇していることより、治療薬としてTPOが期待されていた。しかしながら、リコンビナントTPO投与により、抗体が産生され内因性TPOが抑制され血小板減少を来たす有害事象が発生し開発が中止となった。この副作用を解消するため低分子化合物としてTPO受容体アゴニスト[Romiplostim (AMG531, 皮下注)やEltrombopag (経口薬)]が開発され、臨床試験が行なわれている。血小板数3万/ μ l以下のITP症例を対象に試験が行なわれた結果、その有効率(血小板数が5万/ μ l以上となった場合を有効と判断)は、両薬剤とも80%と良好であった^{33,34)}。しかしながら、両薬剤とも血小板造血刺激剤であるため、骨髄異常などの誘導の可能性などに関しての長期的な安全性はまだ確立しておらず、今後注意深い検討が必要である。本邦においても一部の医療機関において、これらの薬剤の難治性ITPを対象とした試験が進行中である。

C. 緊急時の治療

診断時消化管出血や頭蓋内出血などの重篤な出血を認める症例や摘脾など外科的処置が必要な症例には、ガンマグロブリン大量療法やメチルプレドニソバルブ療法にて血小板数を速やかに増加させ出血をコントロールする必要がある。血小板輸血は一般には行わないが、急性ITPの重症例では治療抵抗性であることもあり、このような場合には血小板輸血も考慮する。

おわりに

本稿ではITPに関する最近の病態解析および新規治療法に関して解説した。ITPはトロンボポエチン受容体アゴニストの登場により新たな局面を迎えている。本稿によりITPに関して会員各位の理解が少しでも深まり、日常の診療に役立てば幸いである。

文 献

- 1) Cines DB, Blanchette VS. Immune thrombocytopenic purpura. *N Engl J Med*. 2002; **346**: 995-1008.
- 2) Karpatkin S. Autoimmune (idiopathic) thrombocytopenic purpura. *Lancet*. 1997; **349**: 1531-1536.
- 3) Harrington WJ, Minnich V, Hollingsworth JW, Moore CV. Demonstration of a thrombocytopenic factor in the blood of

- patients with thrombocytopenic purpura. *J Lab Clin Med*. 1951; **38**: 1-10.
- 4) Shulman NR, Marder VJ, Weinrach RS. Similarities between known antiplatelet antibodies and the factor responsible for thrombocytopenia in idiopathic purpura. Physiologic, serologic and isotopic studies. *Ann NY Acad Sci*. 1965; **124**: 499-542.
 - 5) van Leeuwen EF, van der Ven JTT, Engelfreit CP, von dem Borne AE. Specificity of autoantibodies in autoimmune thrombocytopenia. *Blood*. 1982; **59**: 23-26.
 - 6) Tomiyama Y, Shiraga M, Shattil SJ. Platelet membrane proteins as adhesion receptors. In: P Greslele, C Page, V Fuster, J Vermynen, eds. *Platelets in thrombotic and non-thrombotic disorders: pathophysiology, pharmacology and therapeutics*. Cambridge, Cambridge University Press; 2002: 80-92.
 - 7) McMillan R, Tani P, Millard F, Berchtold P, Renshow L, Woods VL Jr. Platelet-associated and plasma anti-glycoprotein autoantibodies in chronic ITP. *Blood* 1987; **70**: 1040-1045.
 - 8) Tomiyama Y, Kosugi S. Autoantigenic epitopes on platelet glycoproteins. *Int J Hematol*. 2005; **81**: 100-105.
 - 9) Kiefel V, Santoso S, Kaufmann E, Mueller-Eckhardt C. Autoantibodies against platelet glycoprotein Ib/IX: a frequent finding in autoimmune thrombocytopenic purpura. *Br J Haematol*. 1991; **79**: 256-262.
 - 10) Kiefel V, Santoso S, Mueller-Eckhardt C. Serological, biochemical, and molecular aspects of platelet autoantigens. *Semin Hematol*. 1992; **29**: 26-33.
 - 11) Arthur JF, Dunkley S, Andrews RK. Platelet glycoprotein VI-related clinical defects. *Br J Haematol*. 2007; **139**: 363-372.
 - 12) Sugiyama T, Okuma M, Ushikubi F, Sensaki S, Kanaji K, Uchino H. A novel platelet aggregating factor found in a patient with defective collagen-induced platelet aggregation and autoimmune thrombocytopenia. *Blood*. 1987; **69**: 1712-1720.
 - 13) Moroi M, Jung SM, Okuma M, Shinmyozu K. A patient with platelets deficient in glycoprotein VI that lack both collagen-induced aggregation and adhesion. *J Clin Invest*. 1989; **84**: 1440-1445.
 - 14) Fujisawa K, Tani P, Piro L, McMillan R. The effect of therapy on platelet-associated autoantibody in chronic immune thrombocytopenic purpura. *Blood*. 1993; **81**: 2872-2877.
 - 15) Fujisawa K, Tani P, O'Toole TE, Ginsberg MH, McMillan R. Different specificities of platelet-associated and plasma autoantibodies to platelet GPIIb-IIIa in patients with chronic immune thrombocytopenic purpura. *Blood*. 1992; **79**: 1441-1446.
 - 16) Kosugi S, Tomiyama Y, Shiraga M, et al. Platelet-associated anti-glycoprotein (GP) IIb-IIIa autoantibodies in chronic immune thrombocytopenic purpura mainly recognize cation-dependent conformations: comparison with the epitopes of serum autoantibodies. *Thromb Haemost*. 1996; **75**: 339-345.
 - 17) Tomiyama Y, Kekomäki R, McFarland J, Kunicki TJ. Antivinculin antibodies in sera of patients with immune thrombocytopenia and in sera of normal subjects. *Blood* 1992; **79**: 161-168.
 - 18) 富山佳昭, 小杉 智, 倉田義之. 自己免疫性血小板減少性紫斑病における抗 GPIIb-IIIa 抗体の検出とその臨床的意義. *臨病理*. 1997; **45**: 934-941.
 - 19) McMillan R, Nugent D. The effect of antiplatelet autoantibodies on megakaryocytopoiesis. *Int J Hematol*. 2005; **81**: 94-99.
 - 20) Kuwana M, Kurata Y, Fujimura K, et al. Preliminary laboratory based diagnostic criteria for immune thrombocytopenic purpura: evaluation by multi-center prospective study. *J Thromb Haemost* 2006; **4**: 1936-1943.
 - 21) 富山佳昭, 倉田義之: 血液疾患をどのように診断するか: 血小板減少症. *Modern physician*. 2007; **27**: 511-514.
 - 22) Kelton JG, Powers PJ, Carter CJ. A prospective study of the usefulness of the measurement of platelet-associated IgG for the diagnosis of idiopathic thrombocytopenic purpura. *Blood* 1982; **60**: 1050-1053.
 - 23) Brighton TA, Evans S, Castaldi PA, Chesterman CN, Chong BH. Prospective evaluation of the clinical usefulness of an antigen-specific assay (MAIPA) in idiopathic thrombocytopenic purpura and other immune thrombocytopenias. *Blood*. 1996; **88**: 194-201.
 - 24) McMillan R, Wang L, Tani P. Prospective evaluation of the immunobead assay for the diagnosis of adult chronic immune thrombocytopenic purpura (ITP). *J Thromb Haemost*. 2003; **1**: 485-491.
 - 25) Kurata Y, Hayashi S, Kiyoi T, et al. Diagnostic value of tests for reticulated platelets, plasma glycofibrin, and thrombopoietin levels for discriminating between hyperdestructive and hypoplastic thrombocytopenia. *Am J Clin Pathol*. 2001; **115**: 656-664.
 - 26) George JN, Woolf SH, Raskob GE, et al. Idiopathic thrombocytopenic purpura: a practice guideline developed by explicit methods for the American Society of Hematology. *Blood* 1996; **88**: 3-40.
 - 27) Portielje JE, Westendorp RG, Kluin-Nelemans HC, Brand A. Morbidity and mortality in adults with idiopathic thrombocytopenic purpura. *Blood* 2001; **97**: 2549-2554.
 - 28) Fujimura K, Kuwana M, Kurata Y, et al. Is eradication therapy useful as the first line of treatment in Helicobacter pylori-positive idiopathic thrombocytopenic purpura? Analysis of 207 eradicated chronic ITP cases in Japan. *Int J Hematol* 2005; **81**: 162-168.
 - 29) McMillan R. Therapy for adults with refractory chronic immune thrombocytopenic purpura. *Ann Intern Med* 1997; **126**: 307-314.
 - 30) Vesely SK, Perdue JJ, Rizvi MA, Terrell DR, George JN. Management of adult patients with persistent idiopathic thrombocytopenic purpura following splenectomy: a systematic review. *Ann Intern Med* 2004; **140**: 112-120.
 - 31) Kojouri K, George JN. Recent advances in the treatment of

- chronic refractory immune thrombocytopenic purpura. *Int J Hematol* 2005; **81**: 119-125.
- 32) Arnold DM, Dentali F, Crowther MA, et al. Systematic review: efficacy and safety of rituximab for adults with idiopathic thrombocytopenic purpura. *Ann Intern Med* 2007; **146**: 25-33.
- 33) Bussel JB, Cheng G, Saleh MN, et al. Eltrombopag for the treatment of chronic idiopathic thrombocytopenic purpura. *N Engl J Med* 2007; **357**: 2237-2247.
- 34) Kuter DJ, Bussel JB, Lyons RM, et al. Efficacy of romiplostim in patients with chronic immune thrombocytopenic purpura: a double-blind randomised controlled trial. *Lancet* 2008; **371**: 395-403.

2. 造血障害に対する免疫抑制療法

4) 特発性血小板減少性紫斑病

富山 佳昭

Tomiya Yoshiaki

大阪大学医学部附属病院輸血部 病院教授

Summary 特発性血小板減少性紫斑病(ITP)は、自己抗体により血小板が早期に網内系で破壊される自己免疫疾患である。臨床症状としては、皮下出血や歯肉出血など皮膚粘膜出血が主症状である。ITPの診断は他の疾患の除外診断が主体であるが、血小板膜GPⅡb-ⅢaやGPⅠb-Ⅸに対する自己抗体の証明や、網状血小板数と血清トロンボポエチン(TPO)値の測定は補助診断として有用である。脾臓が主な血小板破壊部位であると共に血小板抗体産生部位であり、ステロイド、摘脾が有効である。難治例に対して新規薬剤としてTPO受容体アゴニストが治験中である。

はじめに

特発性血小板減少性紫斑病(Idiopathic Thrombocytopenic Purpura: ITP)は、他の基礎疾患や薬剤などの原因が明らかでないにもかかわらず、血小板の破壊が亢進し血小板減少をきたす後天性の疾患である。点状出血や紫斑など皮膚粘膜出血が主たる症状である。

ITPの成因はいまだ不明であるが、主体となる血小板減少機序は、血小板に対する自己抗体を介した免疫反応による。特に慢性型(後述)では、血小板に対する自己抗体により早期に網内系で破壊され、血小板減少をきたす自己免疫疾患と考えられている。そのため、最近では特発性(idiopathic)というよりは、免疫性(immune)あるいは

自己免疫性(autoimmune)という表現が用いられることが多い^{1, 2)}。

ITPはその発症様式と経過より急性型と慢性型に分類され、6カ月以内に自然寛解する病型は急性型、それ以後も血小板減少が持続する病型は慢性型と分類される。急性型は小児に多くみられ、ウイルス感染を主とする先行感染を伴うことが多い。一方、慢性型は成人女性に多く、内科においてITPといえば一般的に慢性型をさしている。しかしながら、発症時に急性型か慢性型かを区別することは極めて困難であり、実際には発症後6カ月経過した時点において、6カ月以内に寛解したものを急性型、そうでないものを慢性型として分類することになる。

ITP (Idiopathic Thrombocytopenic Purpura ; 特発性血小板減少性紫斑病)

1. 疫学

本邦における年間発症率は人口10万人あたり1.5～3.3人と推計される。慢性ITPは従来20～40歳代の若年女性に発症することが多いとされていたが、2005年の「血液凝固異常症に関する調査研究」班の調査では従来のピークに加え、60～80歳での発症ピークが認められるようになってきている。高齢者の発症には男女比に差はない。急性ITPは5歳以下の発症が圧倒的である(表1, 図1)。

る調査研究」班の調査では従来のピークに加え、60～80歳での発症ピークが認められるようになってきている。高齢者の発症には男女比に差はない。急性ITPは5歳以下の発症が圧倒的である(表1, 図1)。

表1 特発性血小板減少性紫斑病の分類

	急性ITP	慢性ITP
好発年齢	2～5歳	20～40歳, 60～80歳
性差	男1:女1	若年発症例では男1:女3 高齢者では性差なし
好発時期	冬～春	とくになし
発症様式	急性の発症 発症時期が明確なことが多い	発症時期が不明なことが多い 検診などで見つかることあり
先行事象	ウイルス感染 予防接種	なし
出血症状	強い	症状を欠く場合もあり
経過	6カ月以内に寛解	慢性に経過し6カ月以上

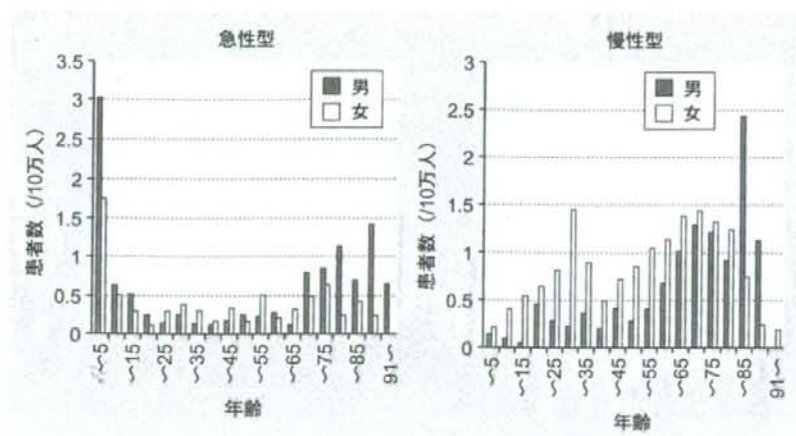


図1 新規ITP患者の年齢別発症分布

2005年度における新規ITP患者の10万人あたりの年齢別発症分布を示している。慢性型における20～40歳の女性における発症ピークに加え、60～80歳での発症ピークが認められるようになってきている。

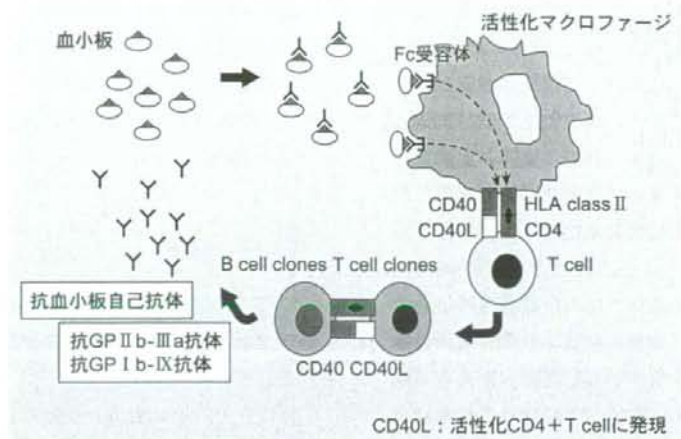


図2 ITPにおける血小板減少機序

主に脾臓で産生された抗血小板自己抗体(主にIgG)は血小板膜GPIIb-IIIaあるいはGPIb-IXに結合し、感作血小板は網内系でマクロファージ上のFc受容体を介して捕捉され、破壊される。一方、抗原提示細胞であるマクロファージはGPIIb-IIIaあるいはGPIb-IXの抗原ペプチドをHLA抗原上に表出し、さらに抗体産生を誘導する。

2. 病態生理

血小板は止血に必要不可欠な細胞であり、直径約 $2\mu\text{m}$ の円盤または碁石状の核をもたない微小な細胞である。末梢血には約 $15\sim 35\text{万}/\mu\text{L}$ の血小板が存在する。血小板は巨核球造血の最終産物として産生される。巨核球はトロンボポエチン(TPO)などの様々なサイトカインにより造血幹細胞から分化・成熟するが、巨核球の分化・成熟過程は極めてユニークであり、成熟とともに核のDNA量は増加するが、細胞質の分裂はおこらず多倍体となり大型化し、最終的に血小板を産生・放出する。産生された血小板の寿命は8~10日である。

血小板数が $10\text{万}/\mu\text{L}$ 以下の場合、血小板減少とされるが、出血傾向が明らかになるのは血小板数が約 $5\text{万}/\mu\text{L}$ 以下の場合である。

ITPにおける血小板減少の主たる病態は、血小板の破壊亢進である。実際、ITP患者において血小板寿命を測定すると、正常の1/10以下に短縮している。ITPにおいては、基本的には赤血球系や白血球系において、形態異常や数の異常を認めない。慢性ITPでは血小板は抗血小板自己抗体(主にIgG)により感作されており、自己抗体に感作された血小板は早期に脾臓などの網内系においてマクロファージなどに存在する免疫グロブリンのFc部分に対する受容体(Fc受容体)を介して捕捉され、破壊され、血小板減少をきたす^{1, 2)}。

血小板抗体の標的抗原としては、血小板膜糖蛋白GPIIb-IIIaおよびGPIb-IXが主要な標的抗原であることが示されており、これらの抗原は抗原提示細胞であるマクロファージによりプロセッシングを受け、そのHLA上に表出され、抗体産生を誘導する。このようにITPでは、脾臓が主な血

TPO (トロンボポエチン)

血小板破壊部位であると共に、血小板抗体産生部位でもある(図2)¹⁾。これらの自己抗体に関しては、特異的な血小板抗体はその殆どが既に患者血小板に結合しており、血清中には親和性の弱い抗体しか存在していないと考えられる。実際、血清抗体よりも血小板結合抗体のほうが検出率は高く、血小板結合抗体は血小板数の変化と逆相関するが血清中の抗体は変化しないことなどが示されている。さらに血清中の抗体と血小板結合抗体は必ずしも同一ではなく、血清中には GPIIb-IIIa の細胞内領域を認識する抗体や細胞内蛋白である vinculin に対する抗体が存在しており、これらは血小板破壊により二次的に誘導された可能性が考えられる。これらの成績より血清抗体よりも血小板結合抗体が密接に ITP の病態と関連しており、主要な役割を果たしていると考えられる³⁻⁵⁾。

一方、ITP においては巨核球の成熟障害や細胞障害を生じており、血小板産生が抑制されていることが示されている。血小板抗体は骨髄巨核球にも結合し、これらの障害を引き起こしていると考えられる⁶⁾。

3. 臨床症状

皮下出血、歯肉出血、鼻出血、性器出血など皮膚粘膜出血が主症状である。血尿、消化管出血、吐血、網膜出血を認めることもある。高度の粘膜出血を認める場合は、消化管出血や頭蓋内出血をきたす危険があり、早急な対応が必要である。血友病など凝固因子欠損症で見られる関節内出血や筋肉内出血は、ITP では通常認めない。

4. 検査成績

血小板減少以外に特に異常所見を認めないが、

出血の持続により貧血を示すことがある。白血球数、白血球分類には特に異常を認めない。出血時間は延長。凝固検査は正常。骨髄検査では巨核球数は正常あるいは増加しており、その他に特に異常を認めない。

5. 診断

ITP の診断に関しては、いまだに他の疾患の除外診断が主体となる。血小板数は 10 万/ μ L 以下としている。

ITP と同様の免疫学的機序で血小板が減少する病態として、全身性エリテマトーデスなどの膠原病やリンパ系腫瘍、HIV 感染などが挙げられるが、これらの疾患に伴う血小板減少は二次的 ITP として分類される。詳しい病歴の聴取や身体所見、時には骨髄穿刺により先天性血小板減少症や薬剤性血小板減少症、さらには血小板産生障害に起因する骨髄異形性症候群や再生不良性貧血などの鑑別を行う(表2)。

また、EDTA 依存性偽性血小板減少症を除外することは極めて重要である(特に血小板数が $3 \sim 5$ 万/ μ L 以下の症例で無症状の場合や検査コメントに血小板凝集とある場合は積極的に疑うべき)。末血用のスピッツには抗凝固剤 EDTA-2K が含まれているため、EDTA 依存性の抗体により血小板が凝集し自動血球計算器において白血球と認識され、血小板数低値となる。塗抹標本や抗凝固剤なしの採血直後に測定し、血小板数が正常であることを確認する。治療は不要である⁷⁾。

PAIgG (Platelet-associated IgG; 血小板関連 IgG) の測定は、2006 年に保険収載された。ITP において 90% 以上が PAIgG が上昇しておりその疾患感受性は高いが、PAIgG は血小板に結合した(あるいは付着した)非特異的な IgG も測定するた

PAIgG (Platelet-associated IgG; 血小板関連 IgG)

表2 血小板減少症の分類

【先天性血小板減少症】	
先天性無巨核球性血小板減少症	
機骨欠損に伴う血小板減少症 (TAR)	
May-Hegglin 異常	
Bernard-Soulier 症候群	
Wiskott-Aldrich 症候群	
【後天性血小板減少症】	
I. 血小板産生低下	
① 巨核球の低形成	再生不良性貧血 骨髄浸潤 (癌, 白血病など) 放射線, 抗がん剤などによる骨髄抑制
② 無効造血	巨赤芽球性貧血 発作性夜間血色素尿症
II. 血小板破壊・消費の亢進	
① 免疫性機序	自己免疫性血小板減少性紫斑病 (ITP) 同種免疫性血小板減少症 新生児同種免疫性紫斑病 輸血後紫斑病 二次性血小板減少症 (SLE, リンパ増殖性疾患など) 薬剤性免疫性血小板減少症 (キニジン, ヘパリンなど)
② 非免疫性機序	播種性血管内凝固症候群 (DIC) 血栓性血小板減少性紫斑病 (TTP)
III. 血小板分布異常	
脾機能亢進	
IV. その他	
EDTA 依存性偽性血小板減少症	

め再生不良性貧血などの血小板減少時にも PAIgG が高値になることがあり, その特異性は低い。そのため ITP の診断的意義は少ない^{2, 8)}。

一方, 補助診断として以下のような特異的な検査が開発されている。

1) 網状血小板数および血清トロンボエチン値の測定

ITP では幼若血小板の指標としての網状血小板数が増加しており, また血清 TPO 値は正常ないしは軽度増加しているのみである。一方, 再生不良性貧血など造血障害による血小板減少では血清 TPO 値は著増する⁹⁾。

2) GP IIb-IIIa もしくは GP I b-IX に対する自己抗体検出

前述のように ITP における自己抗体の主要な標的抗原として, GP IIb-IIIa もしくは GP I b-IX が明らかにされている。これらの抗体検出の ITP の診断的意義は高いが, その検出感度は ITP の約 50% と低い^{3, 5)}。

上記の検査は ITP の病態に基づいた診断法であり特異性も高いが, 残念ながら現在のところ保険適応はなく, 日常臨床での使用には至っていない。

6. 治療

ITP では血小板数が $3万/\mu\text{L}$ 以上では死亡率は正常コントロールと同じであるが, $3万/\mu\text{L}$ 以下だと出血や感染が多くなり死亡率が約 4 倍に増加すると報告されており, $3万/\mu\text{L}$ 以上であれば比較的前後は良好である。

従って治療目標としては, 血小板数 $3万/\mu\text{L}$ 以上, できれば $5万/\mu\text{L}$ 以上を維持するように努める。血小板が $5万/\mu\text{L}$ 以上あれば出血傾向は認めないため, 無治療での経過観察とする^{10, 11)}。

1) 標準的治療

① 副腎皮質ステロイド療法

ITP は血小板に対する自己抗体が産生される自己免疫疾患であるため, その治療には副腎皮質ステロイド (プレドニゾロン) が有効である。副腎皮質ステロイドは網内系における血小板の貪食および血小板自己抗体の産生を抑制する。血小板数 3

万/ μ L以下の症例、3～5万/ μ Lで出血症状を伴う症例が対象。特に口腔内や鼻腔内の出血を認める場合は積極的に治療を行う。50～75%において血小板が増加するが、多くは副腎皮質ステロイド減量に伴い血小板が減少する。4～6週間投与後、血小板数増加なくとも徐々に減量。血小板数および出血症状を見ながら5mgの割合でゆっくり減量し10mg/日で維持。経過が良ければさらに減量する。

② 摘脾

発症後6カ月以上経過し、ステロイドの維持量にて血小板数3万/ μ L以上を維持できない症例、ステロイドの副作用が顕著な症例は積極的に摘脾を行う。寛解率は約60%。摘脾の1週間前よりガンマグロブリン大量療法(後述)にて血小板を増加させる。

③ H. Pylori 除菌療法(保険適応外)

最近、本邦におけるITPの治療に関して、H. Pylori 除菌療法の有効性が示されている。H. Pylori 感染ITPにおいて除菌療法奏効例のうち、約60～70%において血小板増加が認められる。保険適応外ではあるが副作用が少なく安価であり有効性が高いため、早急な治療を必要としない患者には第一選択として試みる価値がある。保険適応を獲得すべく「血液凝固異常症に関する調査研究」班(池田班)にて調査検討中。出血症状を伴う例に対してはステロイド療法をまず選択し、血小板数が比較的安定した時点で除菌療法を試みる¹³⁾。

2) 難治性ITPの治療

本項で述べる薬剤はすべてsecond lineの治療法であり、ステロイド療法無効例で、摘脾が無効あるいは困難な症例に限定すべきである。

薬剤としては、シクロフォスファミド、アザチオプリンなどの免疫抑制剤やダナゾール、ビンカアルカロイドなどが挙げられる。しかしながら、これらの薬剤の中でどれが最も有効であるか、またどの順番に用いるべきかに関しては比較試験が

無いため不明である。いずれの薬剤も完全寛解率(血小板数15万/ μ L以上)は50%以下である。ダナゾールでは、肝障害を高率に認めるため定期的な肝機能のチェックが必要。ダナゾール、アザチオプリンは妊婦には禁忌である^{13, 14)}。

以下に最近注目されている治療法を述べる。

① 抗CD20抗体(リツキシマブ)(保険適応外)

ITPでは抗血小板自己抗体がその病態の中核をなしているため、抗CD20抗体の有効性が期待される。抗CD20抗体はB細胞性リンパ腫に対して開発されたが、自己抗体産生B細胞に対しても細胞傷害作用を有することより、現在までに種々の自己免疫疾患に対してその有効性が示されている。ITPに対しては本邦では適用外であるが、欧米における解析では難治例の30%に完全寛解(血小板数15万/ μ L以上)、28%に部分寛解(5万～15万/ μ L)を誘導しうるとされている。一方、難治例に限定せず摘脾例以外も含めた解析では、46%に完全寛解、24%に部分寛解を誘導しうる^{15, 16)}。

② トロンボポエチン受容体アゴニスト

ITPでは血小板造血が障害されていること、また血清中TPO濃度が正常～軽度上昇していることより、治療薬としてTPOが期待されていた。しかしながらリコンビナントTPO投与により、抗体が産生され内因性TPOが抑制され血小板減少をきたす有害事象が発生し、開発が中止となった。この副作用を解消するため、低分子化合物としてTPO受容体アゴニスト(Romiplostim[AMG 531, 皮下注]やEltrombopag[経口薬])が開発され、臨床試験が行なわれている。血小板数3万/ μ L以下のITP症例を対象に試験が行なわれた結果、その有効率(血小板数が5万/ μ L以上となった場合を有効と判断)は、両薬剤とも80%と良好であった^{17, 18)}。しかしながら、両薬剤とも血小板造血刺激剤であるため、骨髄異常などの誘導の可能性などに関しての長期的な安全性はまだ確立し

ていない。本邦においても一部の医療機関において、これらの薬剤の難治性ITPを対象とした治験が進行中である。

3) 緊急時の治療

診断時消化管出血や頭蓋内出血などの重篤な出血を認める症例や摘脾など外科的処置が必要な症例には、ガンマグロブリン大量療法やメチルプレドニンパルス療法にて血小板数を速やかに増加させ出血をコントロールする必要がある。血小板輸血は一般には行わないが、急性ITPの重症例では治療抵抗性であることもあり、このような場合には血小板輸血も考慮する。

文 献

- 1) Cines DB, Blanchette VS: Immune thrombocytopenic purpura. *N Engl J Med* **346**: 995, 2002
- 2) Karpatkin S: Autoimmune (idiopathic) thrombocytopenic purpura. *Lancet* **349**: 1531, 1997
- 3) McMillan R, et al: Platelet-associated and plasma anti-glycoprotein autoantibodies in chronic ITP. *Blood* **70**: 1040, 1987
- 4) Tomiyama Y, et al: Antivinculin antibodies in sera of patients with immune thrombocytopenia and in sera of normal subjects. *Blood* **79**: 161, 1992
- 5) Tomiyama Y, Kosugi S: Autoantigenic epitopes on platelet glycoproteins. *Int J Hematol* **81**: 100, 2005
- 6) McMillan R, Nugent D: The effect of antiplatelet autoantibodies on megakaryocytopoiesis. *Int J Hematol* **81**: 94, 2005
- 7) 富山佳昭, 倉田義之: 血液疾患をどのように診断するか: 血小板減少症. *モダンフィジシャン* **27**: 511, 2007
- 8) Kelton JG, Powers PJ, Carter CJ: A prospective study of the usefulness of the measurement of platelet-associated IgG for the diagnosis of idiopathic thrombocytopenic purpura. *Blood* **60**: 1050, 1982
- 9) Kurata Y, et al: Diagnostic value of tests for reticulated platelets, plasma glycofibrin, and thrombopoietin levels for discriminating between hyperdestructive and hypoplastic thrombocytopenia. *Am J Clin Pathol* **115**: 656, 2001
- 10) George JN, et al: Idiopathic thrombocytopenic purpura: a practice guideline developed by explicit methods for the American Society of Hematology. *Blood* **88**: 2, 1996
- 11) Portielje JEA, et al: Morbidity and mortality in adults with idiopathic thrombocytopenic purpura. *Blood* **97**: 2549, 2001
- 12) Fujimura K, et al: Is eradication therapy useful as the first line of treatment in Helicobacter pylori-positive idiopathic thrombocytopenic purpura? Analysis of 207 eradicated chronic ITP cases in Japan. *Int J Hematol* **81**: 162, 2005
- 13) McMillan R: Therapy for adults with refractory chronic immune thrombocytopenic purpura. *Ann Intern Med* **126**: 307, 1997
- 14) Vesely SK, et al: Management of adult patients with persistent idiopathic thrombocytopenic purpura following splenectomy: a systematic review. *Ann Intern Med* **140**: 112, 2004
- 15) Kojouri K, George JN: Recent advances in the treatment of chronic refractory immune thrombocytopenic purpura. *Int J Hematol* **81**: 119, 2005
- 16) Arnold DM, et al: Systematic review: efficacy and safety of rituximab for adults with idiopathic thrombocytopenic purpura. *Ann Intern Med* **146**: 25, 2007
- 17) Bussel JB, et al: Eltrombopag for the treatment of chronic idiopathic thrombocytopenic purpura. *N Engl J Med* **357**: 2237, 2007
- 18) Kuter DJ, et al: Efficacy of romiplostim in patients with chronic immune thrombocytopenic purpura: a double-blind randomised controlled trial. *Lancet* **371**: 395, 2008

Potential Role of ADAMTS13 in the Progression of Alcoholic Hepatitis

Masahito Uemura^{*1}, Yoshihiro Fujimura², Tomomi Matsuyama¹, Masanori Matsumoto², Masatoshi Ishikawa¹, Hiromichi Ishizashi³, Seiji Kato², Tatsuhiro Tsujimoto¹, Masao Fujimoto¹, Hitoshi Yoshiji¹, Chie Morioka¹ and Hiroshi Fukui¹

¹Third Department of Internal Medicine, ²Department of Blood Transfusion Medicine, and ³Department of Health and Sports Science, Nara Medical University, Kashihara, Nara, 634-8522, Japan

Abstract: Alcoholic hepatitis (AH) is a potentially life-threatening complication of alcohol abuse. The severe form of AH, severe alcoholic hepatitis (SAH), is characterized by multiorgan failure (MOF) with manifestations of acute hepatic failure and is associated with high morbidity and mortality. However, the pathogenesis of SAH in addition to AH remains to be elucidated. Recent advances showed that ADAMTS13 (a disintegrin-like and metalloproteinase with thrombospondin type-1 motifs 13) is closely related to thrombotic thrombocytopenic purpura, a multiorgan disorder. Decreased activity of plasma ADAMTS13 (ADAMTS13:AC) leads to the accumulation of unusually large von Willebrand factor multimers (UL-VWFm) and subsequent platelet clumping and/or thrombi under high shear stress, resulting in microcirculatory disturbances. Immunological studies and *in situ* hybridization have indicated that ADAMTS13 is produced exclusively in hepatic stellate cells (HSCs). Plasma ADAMTS13:AC was extremely low in fatal SAH cases, and enhanced UL-VWFm production with deficient ADAMTS13:AC may contribute to the progression of MOF through microcirculatory disturbances in SAH and AH. Considering that ADAMTS13 is synthesized in HSCs and its substrate, UL-VWFm, is produced in transformed vascular endothelial cells, the imbalance between ADAMTS13:AC and VWF:Ag in AH patients might also involve sinusoidal microcirculatory disturbances and subsequent liver injury. It will be necessary to clarify the mechanism of the decrease in plasma ADAMTS13:AC in association with pro-inflammatory cytokinemia, an ADAMTS13 inhibitor and the production of ADAMTS13 in HSCs. The determination of ADAMTS13:AC and its substrate will give us new insights into the pathophysiology of acute alcoholic liver injury and help to elucidate additional therapeutic strategies for this disease.

Keywords: ADAMTS13 activity, alcoholic hepatitis, severe alcoholic hepatitis, von Willebrand factor, unusually large von Willebrand factor multimer, microcirculatory disturbance, multiorgan failure.

INTRODUCTION

Alcoholic hepatitis (AH) is a potentially life-threatening complication of alcohol abuse. The severe form of AH, severe alcoholic hepatitis (SAH), is characterized by multiorgan failure with manifestations of acute hepatic failure and is associated with high morbidity and mortality [1-5]. Although the pathogenesis of AH remains unclear, relevant factors include ethanol metabolism to toxic products, endotoxin-induced Kupffer cell activation, and subsequent cytokine stimulation, oxidant stress, acetaldehyde adducts, and impaired hepatic regeneration [2-5]. Particularly in the pathogenesis of SAH, endotoxemia due to hepatic reticuloendothelial dysfunction and increased intestinal permeability may trigger enhanced pro-inflammatory cytokine production, potentially causing systemic inflammatory response syndrome together with microcirculatory disturbances, systemic haemodynamic derangements, and subsequent multiorgan failure [2-6].

Recently, the activity of ADAMTS13 (a disintegrin-like and metalloproteinase with thrombospondin type-1 motifs 13) has been of great interest as it relates to the occurrence of thrombotic thrombocytopenic purpura (TTP) [7-10], a

multiorgan disorder characterized by Moschowitz's pentad [11], thrombocytopenia, renal dysfunction, fluctuating neurological symptoms, microangiopathic hemolytic anemia, and fever. ADAMTS13 is a metalloproteinase that specifically cleaves multimeric von Willebrand factor (VWF) between Tyr1605 and Met1606 within the VWF A2 domain [12-15]. VWF is synthesized in vascular endothelial cells and released into the plasma as "unusually large" VWF multimer (UL-VWFm) [7,8] where UL-VWFm is rapidly degraded into smaller VWF multimers by ADAMTS13. An ADAMTS13 deficiency, caused either by mutations in the *ADAMTS13* gene [14,16] or by inhibitory autoantibodies against ADAMTS13 [10,17], increases UL-VWFm plasma levels, leading to platelet clumping and/or thrombi under high shear stress and subsequent microcirculatory disturbances.

Northern blot analysis indicated that the 4.6-kilobase ADAMTS13 mRNA is exclusively expressed in the liver [18]. Furthermore, immunological studies and *in situ* hybridization unambiguously showed that ADAMTS13 is produced in hepatic stellate cells (HSCs) that are adjacent to the endothelial cells [19] that produce VWF. VWF is also a marker of endothelial cell activation and an acute phase reactant [7]. In patients with fulminant hepatic failure and liver cirrhosis, VWF plasma levels are remarkably high [20,21]. Immunostaining for VWF antigen (VWF:Ag) shows positive cells along the sinusoidal wall and perivenular region of the liver during the early stages of alcoholic liver diseases [22]

*Address correspondence to this author at the Third Department of Internal Medicine, Nara Medical University, Kashihara, Nara, 634-8522, Japan; Tel: +81-744-22-3051, Ext. 3415; Fax: +81-744-24-7122; E-mail: muemura@naramed-u.ac.jp

and liver cirrhosis [23]. Based on these findings, it is of particular interest to evaluate the activity of plasma ADAMTS13 (ADAMTS13:AC) in liver disease patients [24-29].

In this study, we first investigated the localization of ADAMTS13 in the human liver. Then, we addressed interesting findings from our previous results showing that plasma ADAMTS13:AC and its related parameters are potentially involved in the severity of liver disturbances and the development of multiorgan failure in alcoholic hepatitis patients [30, 31].

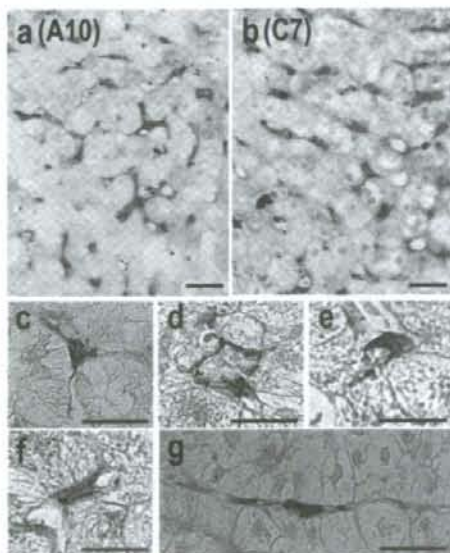
ADAMTS13 AND ITS LOCALIZATION IN THE HUMAN LIVER

From a historical perspective on ADAMTS13, Dent *et al.* [32] showed that the lack of a high molecular mass form of VWF results in the heightened proteolysis of the VWF subunit due to specific cleavage of the VWF Tyr 1605-Met 1606 bond in patients with type 2A Von Willebrand disease, a congenital bleeding disorder caused by VWF mutations. In 1996, Furlan *et al.* [33] and Tsai *et al.* [34] demonstrated that a metalloproteinase, termed VWF-cleaving protease (VWF-CP), was responsible for this cleavage. Subsequently, four investigators cloned the VWF-CP cDNA and identified it as

ADAMTS13, a new member of the ADAMTS family [12-15].

Northern blot analysis indicated that the 4.6-kilobase ADAMTS13 mRNA was exclusively expressed in the liver and a 2.4-kilobase ADAMTS13 mRNA was expressed in the placenta and skeletal muscle [18]. *In situ* hybridization analysis revealed that mRNA signals were expressed exclusively in perisinusoidal cells [35], but the type of cells expressing ADAMTS13 was not identified. We have shown that ADAMTS13 is produced exclusively in hepatic stellate cells (HSCs), formerly called Ito cells [36], by both *in situ* hybridization and immunohistochemistry using two novel mouse monoclonal ADAMTS13-specific antibodies (A10 and C7) [19]. The A10 and C7 epitopes were mapped to the disintegrin-like domain and the seventh and eighth thrombospondin type-1 domains, respectively [19]. When A10 immunostaining was performed on liver specimens from a HCV-related chronic hepatitis patient, dense brown staining was observed in perisinusoidal cells inside the lobule (Fig. 1A-a). When same liver section was stained with C7, the staining patterns were similar to those with A10 (Fig. 1A-b). The varied morphological features of these ADAMTS13-positive cells were consistent with those previously described for perisinusoidal stellate cells (Fig. 1A, a-g) [36,37].

A Immunohistochemistry



B In situ hybridization

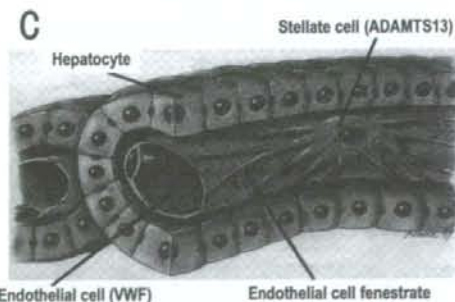
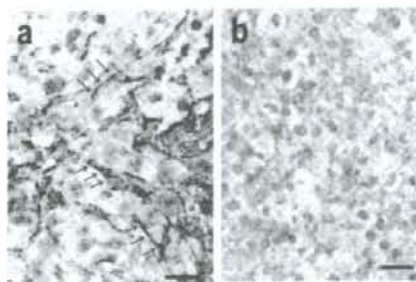


Fig. (1). Localization of ADAMTS13 in human liver. In frozen liver sections from a hepatitis C-related chronic hepatitis patient, immunostaining using ADAMTS13-specific monoclonal antibodies A10 (A-a) or C7 (A-b) showed dense brown staining in perisinusoidal cells but not in hepatocytes. The positive cells had a variety of morphological forms, including a tripolar cell with long processes extending between hepatocytes (A-c), combined cells surrounding a hepatocyte (A-d), a dome-shaped cell (A-e), a bipolar cell with short processes (A-f), and a unipolar cell with long processes (A-g). *In situ* hybridization for ADAMTS13 mRNA strongly labeled only perisinusoidal cells (B-a). When sense probes were used, no significant staining was observed (B-b). Bar = 30 μ m in A and B [19]. HSCs are located in the space of Disse adjacent to endothelial cells (C), and have many functions including vitamin A storage, liver fibrogenesis, and regulation of sinusoidal blood flow [42].

In situ hybridizations using antisense probes for ADAMTS13 strongly labeled only perisinusoidal cells with irregularly elongated cytoplasmic processes extending between hepatocytes (Fig. 1B-a), whereas control specimens treated with these sense probes showed no significant staining (Fig. 1B-b). Furthermore, we performed double immunofluorescence immunohistochemistry with antibodies to ADAMTS13 (A10) and α -SMA, a microfilament protein that is a specific marker for activated stellate cells [38, 39]. Colocalization of ADAMTS13 and α -SMA in single cells clearly indicated that stellate cells produce ADAMTS13 in the liver [19]. In addition, platelets [40], vascular endothelial cells [41], and hepatocytes have also been implicated as ADAMTS13-producing cells, although the amount produced by these cell types appears to be far less than that produced by HSCs. The mechanism of release and the origin of circulating ADAMTS13 remain to be elucidated.

HSCs are located in the space of Disse adjacent to endothelial cells (Fig. 1C) [42], and have many functions, including vitamin A storage, liver fibrogenesis, and regulation of sinusoidal blood flow [38]. These cells are also rich sources of bioactive mediators that maintain homeostasis in the hepatic sinusoid microenvironment [38]. Considering that ADAMTS13 is synthesized in HSCs and its substrate, UL-VWF, is produced in transformed vascular endothelial

cells, decreased plasma ADAMTS13:AC might involve sinusoidal microcirculatory disturbances.

PATHOPHYSIOLOGY OF ADAMTS13 DEFICIENCY

The mechanism underlying TTP in patients with a congenital or acquired deficiency in ADAMTS13 activity has not yet been fully elucidated; however, a hypothesis can be made based on previous reports, as illustrated in Fig. 2 [43]. UL-VWF is released into the circulation by vascular endothelial cells. When UL-VWF is transported to peripheral small arteries, it changes its molecular conformation from a globular form to an unfolded form under the high shear stress. Siedlecki *et al.* [44] showed that shear stress changes the three-dimensional structure of VWF from a globular, inactive state to an unfolded, activated state. The ADAMTS13 protease efficiently cleaves the unfolded, active form of UL-VWF. When ADAMTS13 activity is reduced, UL-VWF interacts more intensively with platelet GPIb and generates signals that further accelerate platelet activation. A series of these reactions leads to platelet microaggregates and thrombocytopenia. Furthermore, microangiopathic changes in red cells, schistocytes, are thought to take place upon collision with fibrin strands, which are formed surrounding platelet thrombi in TTP [43]. More recently, it has been shown that plasma ADAMTS13 efficiently cleaves newly-produced UL-

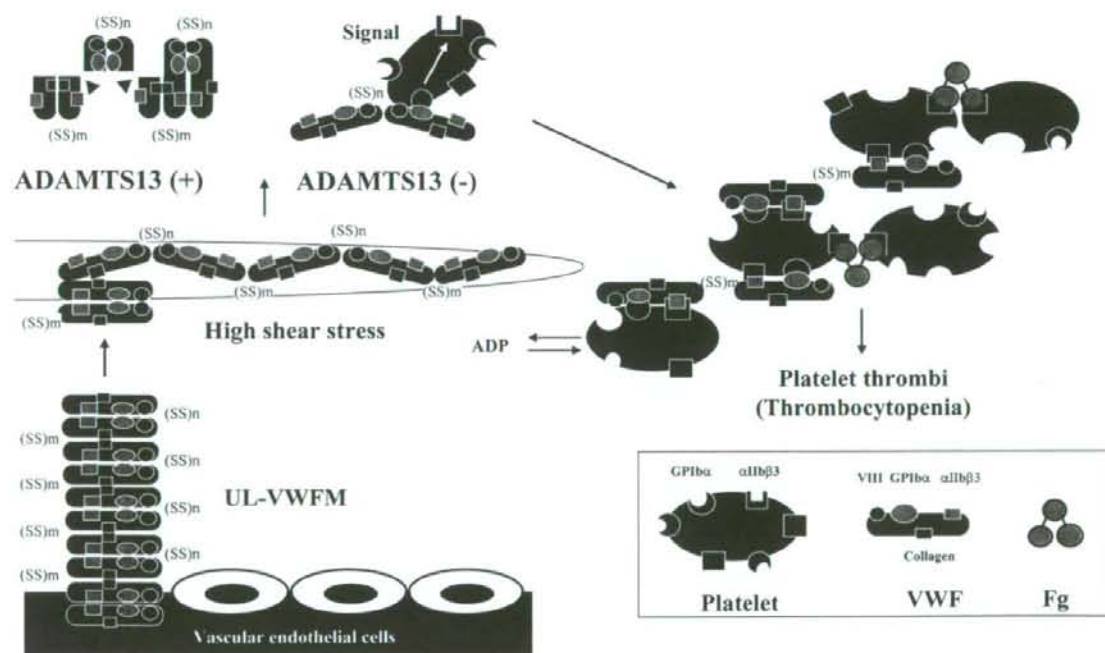


Fig. (2). A proposed mechanism for formation of platelet thrombus, resulting in thrombocytopenia and organ damage in a patient with thrombotic microangiopathy. Unusually large von Willebrand factor multimer (UL-VWF) polymerized by inter-subunit disulfide bonds (SS), are produced in vascular endothelial cells and released into the circulation. When UL-VWF is transported to peripheral small arteries, it changes its molecular conformation from a globular to an unfolded form under the high shear stress. The ADAMTS13 protease efficiently cleaves the unfolded, active form of UL-VWF. When ADAMTS13 activity is, however, deficient with or without its inhibitors, UL-VWF interacts more intensively with platelet GPIb and generates signals to activate self-platelets, inducing adenosine diphosphate release from platelets. A series of these reactions leads to platelet microaggregates and thrombocytopenia. UL-VWF= unusually large von Willebrand factor multimer, VWF=von Willebrand factor, Fg=fibrinogen [43].

VWFM when it binds to vascular endothelial cell surfaces via P-selectin [45].

ADAMTS13 ASSAYS

ADAMTS13:AC

Classical analyses of ADAMTS13:AC were performed using purified VWF as a substrate, and analyzed visually by SDS-agarose [17] or polyacrylamide gel electrophoresis [10] or functionally by ristocetin-induced platelet aggregation [46] or collagen binding [47]. These methodologies are, however, time-consuming in practice and the detection limits ranged from 3% to 10% of the normal control [10, 17, 46, 47]. The subsequent introduction of ELISA system using a double-tagged recombinant VWF-A2 domain (residues 1481-1668) [48] or a minimal 73-residue sequence of the VWF-A2 domain as substrates [49] enabled quickly to determine ADAMTS13:AC [48, 49], but these ELISAs are thought to be still limited sensitivity (3 to 12% of normal controls). Kokame *et al.* [50] developed a more convenient FRET-VWF73 assay, which is measurable to 3% of the

normal control, and is now widely used in research laboratories. However, it has been shown that the presence of hemoglobin, bilirubin, or chylomicron in samples significantly interferes with the FRET-VWF73 assay [51]. Kato *et al.* [52] recently produced a mouse monoclonal antibody (mAb), N10, which specifically recognizes the Y1605 residue of the VWF-A2 domain that is generated by ADAMTS13 cleavage. Using this mAb, a highly sensitive sandwich ELISA, termed ADAMTS13-act-ELISA, has been used to measure enzymatic activity. The lower limit of this assay is 0.5% of the normal control. Because of its high sensitivity, easy handling, and lack of interference from plasma components, the ADAMTS13-act-ELISA would be recommended for routine laboratory use.

ADAMTS13 Inhibitors

ADAMTS13-neutralizing autoantibodies (mostly IgG type inhibitors) can be measured using the Bethesda method for determining factor VIII inhibitors [53]. Prior to the assay, the test samples must be heat-treated at 56°C for 60 min to

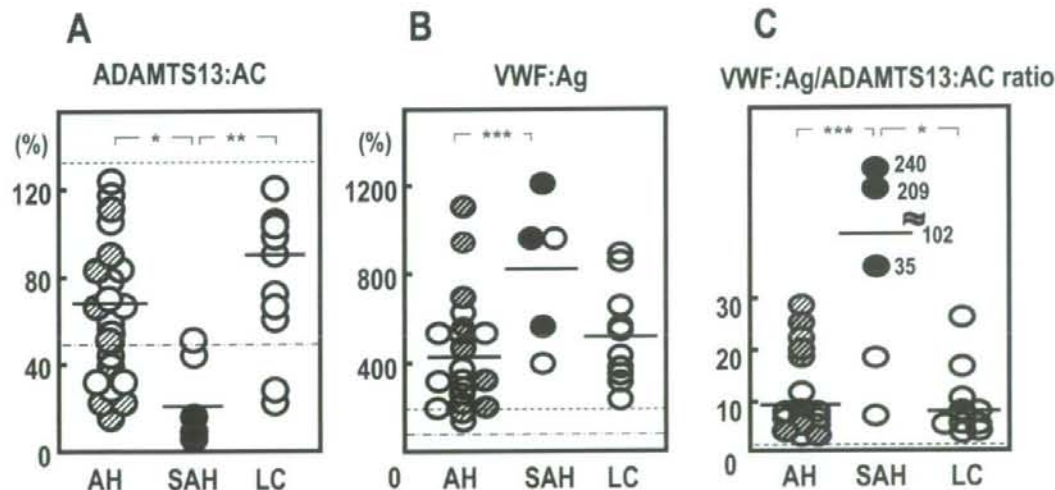


Fig. (3). The plasma values of ADAMTS13 activity, VWF:Ag, and the ratio of VWF:Ag to ADAMTS13 activity in the patients with alcoholic hepatitis, severe alcoholic hepatitis, and alcoholic liver cirrhosis. The dotted lines show upper limit of the normal range, and dot-dashed lines lower limit of the normal range. Normal range was $102 \pm 23\%$ (mean \pm 2SD, $n=60$) in ADAMTS13 activity, $100 \pm 53\%$ in VWF:Ag, and 1.0 ± 0.4 in the ratio of VWF:Ag to ADAMTS13 activity, respectively [30, 31]. Open and shaded circles indicate survivors and the closed circles indicate non-survivors. The shaded circles show alcoholic liver cirrhotics with superimposed AH. (A) ADAMTS13 activity was significantly lower in AH, SAH and LC patients than in healthy subjects. The activity further decreased in the patients with SAH compared to those with AH and LC. In three fatal SAH cases, ADAMTS13 activity was extremely low. (B) VWF:Ag was significantly higher in AH, SAH and LC patients than in healthy subjects. The antigen further increased in SAH patients compared to AH patients. In the three fatal SAH patients, VWF:Ag was extremely high. (C) VWF:Ag relative to ADAMTS13 activity was markedly higher in AH, SAH and LC patients than in healthy subjects. It further increased in patients with SAH compared to those with AH and LC. In the three fatal SAH cases, it was extremely high. AH=alcoholic hepatitis, SAH=severe alcoholic hepatitis, LC=alcoholic liver cirrhosis. ADAMTS13:AC=ADAMTS13 activity, VWF:Ag= von Willebrand factor antigen, VWF:Ag/ADAMTS13:AC=the ratio of VWF antigen to ADAMTS13 activity. * $p<0.05$, ** $p<0.01$, and *** $p<0.005$ significantly different between the two groups. The study was carried out on 24 patients with AH, 5 patients with SAH and 10 patients with alcoholic LC. Nine of 24 AH patients and all patients with SAH were complicated by LC. Maddrey score of SAH was 52 to 71 (mean: 60) on admission. The severity of alcoholic LC was Child A in 5, Child B in 3 and Child C in 2. In three non-survivors with SAH, hepatic encephalopathy of Grade II to III, ascites, renal failure, pneumonia, heart failure were noted on admission, indicating the occurrence of multiorgan failure. A patient was considered to have disseminated intravascular coagulation, but remaining 4 patients were not. One of the two survivors with SAH was complicated by renal failure and pneumonia, but without hepatic encephalopathy. The other one had moderate ascites, but without multiorgan failure [30, 31].

eliminate endogenous enzyme activity. Briefly, the assay consists of two steps; the test or control plasma is heat-inactivated, mixed with an equal volume of intact normal pooled plasma, and incubated for 2 hours after which the residual enzyme activity is measured. One Bethesda unit is defined as the amount of inhibitor that reduces activity by 50% of the control value, and values greater than 0.5 U/ml are significant.

ADAMTS13 ACTIVITY AND ITS RELATED PARAMETERS IN ALCOHOLIC HEPATITIS

Plasma ADAMTS13:AC was assayed according to the method of Furlan *et al.* [17] with slight modifications [54]. ADAMTS13:AC was markedly decreased in fatal SAH cases with multiorgan failure in contrast to a mild to moderate decrease in SAH and AH survivors (Fig. 3A) [30,31]. Interestingly, ADAMTS13:AC in fatal SAH cases with multiorgan failure was extremely low, which is consistent with typical TTP. The VWF:Ag level was remarkably increased in AH, especially in fatal SAH cases (Fig. 3B). Accordingly, VWF:Ag relative to ADAMTS13:AC was extremely high in fatal SAH cases compared to AH and SAH survivors (Fig. 3C). During recovery, ADAMTS13:AC returned to a normal range, and both VWF:Ag levels and VWF:Ag relative to ADAMTS13:AC decreased in AH and SAH survivors; however, in fatal SAH cases, the activity remained extremely low while the VWF:Ag level was still high, resulting in an extremely high ratio of VWF:Ag to ADAMTS13:AC [30,31]. These results suggest that plasma ADAMTS13:AC and its substrate, VWF:Ag, are closely correlated with the severity of liver disturbance and may be useful markers for predicting the clinical outcome of AH, especially in SAH with multiorgan failure. Indeed, the prognosis was very poor in three SAH patients with extremely low ADAMTS13:AC and markedly high VWF:Ag. Furthermore, cirrhotics with superimposed AH showed higher levels of VWF:Ag (576 vs 303, $p < 0.005$) and VWF:Ag relative to ADAMTS13:AC (14.0 vs 5.3, $p < 0.01$) than those with AH without LC, indicating that cirrhotics with superimposed AH may be a high risk for hepatic failure. In addition, in LC patients, ADAMTS13:AC tended to be lower as the cirrhotic stage progressed, suggesting that decreased ADAMTS13:AC is related to the functional liver capacity. Similar findings that ADAMTS13:AC decreases with increasing cirrhosis severity was recently reported [28].

ADAMTS13:AC was significantly correlated with 10 clinical variables in an univariate analysis, including functional liver capacity, inflammation signs, renal function, and platelet counts (Table 1) [30]. On the other hand, VWF:Ag was significantly correlated with nine clinical variables, including functional liver capacity, anemia, inflammation signs, and platelet counts (Table 2) [31]. The factors associated with decreased ADAMTS13:AC and increased VWF:Ag, reduced functional liver capacity, augmented inflammation, and thrombocytopenia are, indeed, consistent with the clinical characteristics that frequently appear in AH and SAH. Remarkably, the imbalance between the ADAMTS13:AC and VWF:Ag levels might provide another mechanism for thrombocytopenia that usually occurs in AH even in the absence of apparent disseminated intravascular coagulation signs.

Table 1. Correlation Coefficients Between Plasma ADAMTS13 Activity and Clinical Variables in Patients with Alcoholic Hepatitis

Variables	Coefficient Correlation	p Values
C-reactive protein (mg/dl)	-0.658	0.0023
Serum total bilirubin (mg/dl)	-0.616	0.0054
Lactate dehydrogenase (IU/L)	-0.606	0.0065
Total protein (g/dl)	0.539	0.0197
Serum albumin (g/dl)	0.535	0.0208
Polymorphonuclear neutrophil (/mm ³)	-0.523	0.0245
Prothrombin time (%)	0.518	0.0317
Serum creatinine (mg/dl)	-0.500	0.0355
White blood cell count (/mm ³)	-0.488	0.0390
Platelet count (x10 ⁹ /mm ³)	0.472	0.0471
Aspartate aminotransferase (IU/L)	-0.452	0.0594
Blood urea nitrogen (mg/dl)	-0.340	0.1707
Age (yr)	0.326	0.1894
Alanine aminotransferase (IU/L)	-0.176	0.4913
γ -Glutamyl transpeptidase (IU/L)	0.043	0.8711

Reprinted from Uemura M, *et al.*, ref. no. [30].

Table 2. Correlation Coefficients Between Plasma VWF:Ag and Clinical Variables in Patients with Alcoholic Hepatitis

Variables	Coefficient Correlation	p Values
Lactate dehydrogenase (IU/L)	0.647	<0.0001
Serum albumin (g/dl)	-0.638	<0.0001
Hemoglobin (g/dl)	-0.567	0.0011
Prothrombin time (%)	-0.553	0.0005
C-reactive protein (mg/dl)	0.454	0.0125
Serum total bilirubin (mg/dl)	0.429	0.0194
Polymorphonuclear neutrophil (/mm ³)	0.409	0.0466
Platelet count (x10 ⁹ /mm ³)	-0.375	0.0475
γ -Glutamyl transpeptidase (IU/L)	0.370	0.0487
Serum creatinine (mg/dl)	0.355	0.0952
Age (years)	-0.325	0.1240
White blood cell count (/mm ³)	0.293	0.1315
Aspartate aminotransferase (IU/L)	0.282	0.1393
Alanine aminotransferase (IU/L)	-0.152	0.4339
Blood urea nitrogen (mg/dl)	0.090	0.6636

Reprinted from Matsuyama *et al.*, ref. no. [31].

Interestingly, UL-VWFM on admission was detected in 4 (80.0%) of 5 SAH patients and in 5 (55.6%) of 9 AH pa-

tients, whose ADAMTS13:AC was less than 50% of normal control plasma (Fig. 4) [31]. UL-VWFm-positive patients showed lower ADAMTS13:AC, higher plasma VWF:Ag, and a higher ratio of VWF:Ag to ADAMTS13:AC than UL-VWFm-negative patients (ADAMTS13:AC mean 22% vs 43%, $p < 0.02$; VWF:Ag 724% vs 372%, $p < 0.05$; the ratio of VWF:Ag to ADAMTS13:AC 66.0 vs 8.2, $p < 0.01$, respectively). In particular, UL-VWFm was detected in three fatal SAH patients with multiorgan failure (cases 1, 2, and 3, Fig. 4). These findings of enhanced UL-VWFm production with deficient ADAMTS13 activity may, in part, contribute not only to the development of multiorgan failure but also to the progression of liver injury through microcirculatory disturbances in AH. Our results suggest an additional mechanism to explain multiorgan failure with liver disturbance, particularly in SAH patients. In order to confirm a TTP-like phenomenon above mentioned especially in patients with SAH, it will be necessary to confirm presence or absence of the platelet thrombi using samples obtained from liver and other organs in patients with SAH.

Microcirculatory disturbances in the liver are considered to play an important pathogenic role in alcoholic hepatitis. These disturbances include narrowing of the sinusoidal space due to ballooned hepatocytes and perisinusoidal fibrosis [55], imbalances between endothelin and nitric oxide [56], and contraction of HSCs [57]. The sinusoidal endothelium modulates microcirculation between hepatocytes and the sinusoidal space through the sinusoidal endothelial fenestration (SEF). After liver injury, fibrogenesis within the Disse's space and a decrease in the number of SEFs together with narrowing of its diameter may lead to neocapillarization of the endothelium [58, 59]. Actually, sinusoidal lining cells

and the scar-parenchyma interface were stained by anti-VWF antibodies, even at the early stages of alcoholic liver diseases [22], indicating capillarization of the sinusoidal endothelial cells. Deficiencies in plasma ADAMTS13:AC and augmented VWF production in transformed vascular endothelial cells might play an important role in sinusoidal microcirculatory disturbances and subsequent liver injury in AH patients. Indeed, in SAH patients mild to severe hepatic veno-occlusive disease (VOD) was frequently observed [60, 61], and the degree of ascites became more severe as VOD progressed [61]. After stem cell transplantation (SCT), plasma ADAMTS13:AC was significantly lower in patients with hepatic VOD than those without [26]. Furthermore, prophylactic infusion of fresh frozen plasma as a source of ADAMTS13 may be useful in preventing the development of hepatic VOD after SCT [62], indicating a causative role of increased VWF production relative to decreased ADAMTS13:AC. Our present findings of extremely decreased ADAMTS13:AC and markedly increased VWF:Ag may be involved in the pathogenesis of VOD in SAH patients.

As far as the plasma ADAMTS13:AC on other liver diseases, the activity was significantly low in patients with liver cirrhosis [24] and acute hepatitis [25]. As described above, it was also reduced in patients with VOD after SCT throughout their clinical course [26], indicating that its activity could, hence, be a predictor for the development of hepatic VOD. Additionally, there was a rapid decrease in ADAMTS13:AC early after ischemia-reperfusion injury and/or acute graft rejection in patients undergoing living-donor related liver transplantation [27], suggesting that the kinetics of ADAMTS13:AC and thrombocytopenia could be good indi-

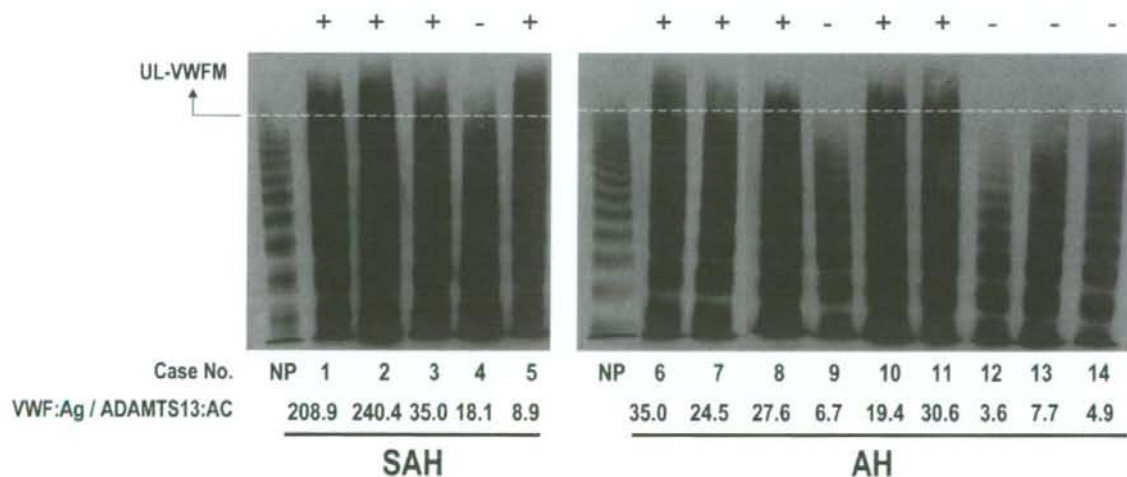


Fig. (4). The VWF multimer in the plasma of patients with alcoholic hepatitis and severe alcoholic hepatitis on admission. The unusually large plasma VWF multimer (UL-VWFm) was analyzed by SDS-0.9% agarose gel electrophoresis using 1 μ L of samples, and then visualized by Western blotting and luminography. UL-VWFm was detected in 4 (80.0%, cases 1, 2, 3, and 5) of 5 SAH patients, and 3 of these patients died of hepatic failure with multiorgan failure (cases 1, 2 and 3). In addition, UL-VWFm was detected in 5 (55.6%, cases 6, 7, 8, 10, and 11) of 9 AH patients, who had a moderate ADAMTS13 deficiency together with markedly high VWF values. UL-VWFm-positive patients showed lower ADAMTS13:AC, higher plasma VWF:Ag, and a higher ratio of VWF:Ag to ADAMTS13:AC than UL-VWFm-negative patients. NP shows the normal control plasma. AH=alcoholic hepatitis, SAH=severe alcoholic hepatitis, ADAMTS13:AC=ADAMTS13 activity, VWF:Ag= von Willebrand factor antigen [31].