

Figure 2 The cumulative survival rate of 108 patients with liver cirrhosis according to the Model for End-Stage Liver Disease (MELD) score. The survival of patients in the fourth quartile of the MELD risk score (RS) calculated by the formula⁵ was worse than that of the patients in the first three RS quartiles, while the survival of the patients in the first three RS quartiles did not differ among them (Log rank test among the four groups, $P < 0.0001$; fourth quartile vs. others, $P < 0.0001$). The red, blue, green, and pink lines indicate cirrhotic patients with the first RS quartile, second RS quartile, third RS quartile, and fourth RS quartile, respectively.

ROC and Cox proportional-hazard analysis were performed using a StatFlex ver. 6 for Windows. A two-tailed P -value less than 0.05 was considered significant. All data are presented as the mean \pm standard deviation (SD).

RESULTS

Clinical characteristics of patients with liver cirrhosis according to the CTP score, the MELD score, and the ADAMTS13:AC

OF THE LC patients, 35 were Child A, 33 were Child B, and 40 were Child C according to Child–Pugh's criteria³ (Table 1). The MELD score progressively increased from Child A to C. The platelet counts decreased with the severity of chronic liver diseases. The spleen volume increased as liver disease progressed. Ascites was easily mobilized in 16 patients and refractory in 28. Ten out of 26 Child C-LC with refractory ascites finally progressed to hepatorenal syndrome. SBP occurred in 10 Child C-LC with refractory ascites, and this was complicated by hepatorenal syndrome in seven patients. Forty-one LC patients developed hepatic encephalopathy grade II or higher. Sixty-seven LC patients had endoscopic signs of impending variceal

rupture, and its incidence was higher in LC patients with Child B and Child C than in Child A patients. HCC was detected in 22 patients (62.9%) with Child A, 16 patients (48.5%) with Child B, and 19 patients (47.5%) with Child C. The incidence of HCC did not differ among the three groups, but the JIS score progressively increased from Child A to C. Portal thrombosis was detected in three patients with Child B and in three with Child C. During a median follow-up of 475 days (range: 5 to 2406 days), 42 LC patients died within 5 to 1161 days after they had provided samples. Of these, five cirrhotic patients were classified as Child A, six as Child B, and 31 as Child C. The cause of death in Child A patients was HCC in four patients and acute myocardial infarction in one, that in Child B patients was HCC in five and gastrointestinal bleeding in one, and that in Child C patients was HCC in 17, hepatic failure in seven, hepatorenal syndrome in six, and TTP in one (Table 1).

With respect to the classification by the MELD score, the patients belonging to the fourth quartile showed the

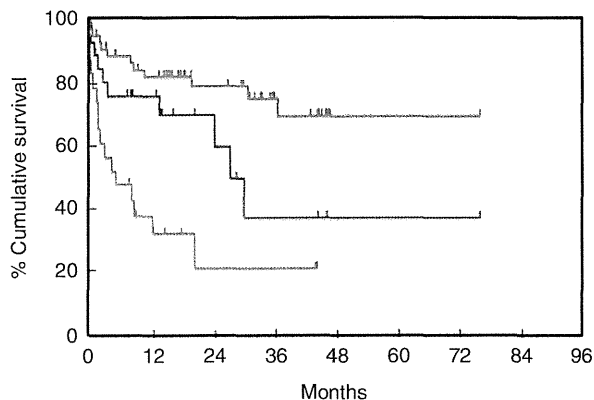


Figure 3 The cumulative survival rate of 108 patients with liver cirrhosis according to ADAMTS13 activity (ADAMTS13:AC). The survival rate was remarkably different among the patients with severe to moderate ADAMTS13:AC deficiency, mild ADAMTS13:AC deficiency, and normal range of ADAMTS13:AC (Log rank test among the three groups, $P < 0.0001$; severe to moderate deficiency vs. mild deficiency, $P = 0.0219$; mild deficiency vs. normal range, $P = 0.0287$; severe to moderate deficiency vs. normal range, $P < 0.0001$). The median survival time was the lowest (4.5 months) in the cirrhotic patients with severe to moderate ADAMTS13:AC deficiency. The red, blue, and green lines indicate cirrhotic patients with normal range of ADAMTS13:AC (>50%), mild ADAMTS13:AC deficiency (25–50% of the normal control), severe to moderate ADAMTS13:AC deficiency (<25% of the normal control), respectively.

Table 5 Hazard ratios for predicting the survival of the patients with liver cirrhosis

Factors	Category	Hazard ratio (95% confidence interval)	P-value
Child score	1: Child A	1.0	
	2: Child B	1.04 (0.71–1.50)	0.8453
	3: Child C	4.00 (2.35–6.80)	<0.001
MELD score	1: first quartile	1.0	
	2: second quartile	0.73 (0.44–1.19)	0.2095
	3: third quartile	0.85 (0.52–1.41)	0.5391
	4: fourth quartile	5.16 (2.70–9.86)	<0.001
ADAMTS13 activity	1: normal range (>50%)	1.0	
	2: mild deficiency (25–50%)	1.51 (1.05–2.17)	0.0248
	3: severe to moderate deficiency (<25%)	2.50 (1.68–3.72)	<0.001

MELD, Model for End-Stage Liver Disease.

highest values of CTP score, spleen volume, and JIS score, and the lowest levels of ADAMTS13:AC and platelet count (Table 2). The incidence of patients with refractory ascites, SBP, hepatorenal syndrome, and hepatic encephalopathy was higher in the fourth quartile group than in the other three quartile groups. The number of patient deaths was three in the first quartile, five in the second quartile, nine in the third quartile and 25 in the fourth quartile (Table 2).

According to the classification of ADAMTS13:AC, the incidence of patients with SBP, hepatorenal syndrome, and hepatic encephalopathy progressively increased

from patients with normal range to those with severe to moderate deficiency of the activity (Table 3). The CTP score, MELD score, spleen volume, and the incidence of refractory ascites were higher in the patients with mild and severe to moderate ADAMTS13:AC deficiency than in those with normal activity, but did not differ between patients with mild and severe to moderate deficiency of the activity. The JIS score was the lowest in patients with severe to moderate ADAMTS13:AC deficiency. The number of patient deaths was 11 in the group with normal activity, 12 in those with mild deficiency, and 19 in those with severe to moderate deficiency of the activ-

Table 6 Factors affecting the survival of the patients with liver cirrhosis in the multivariate analysis

Factors	Category	Hazard ratio (95% confidence interval)	P-value
ADAMTS13 activity	1: ≥50%	1.0	0.0059
	2: 25–50%	2.25 (1.27–3.99)	
	3: <25%	5.08 (1.62–15.97)	
Albumin	1: ≥2.8 mg/dL	1.0	0.0101
	2: <2.8 mg/dL	3.39 (1.34–8.61)	
Total bilirubin	1: <3.0 mg/dL	1.0	0.7573
	2: ≥3.0 mg/dL	1.20 (0.38–3.77)	
Prothrombin time	1: ≥40%	1.0	0.2602
	2: <40%	2.24 (0.55–9.09)	
Blood ammonia	1: <80 μg/dl†	1.0	0.4389
	2: ≥80 μg/dl	1.45 (0.57–3.71)	
Platelet count	1: ≥50 × 10 ⁹ /L	1.0	0.3329
	2: <50 × 10 ⁹ /L	0.56 (0.17–1.82)	
Age (years)	1: <65	1.0	0.0683
	2: ≥65	0.45 (0.19–1.06)	
Sex	1: male	1.0	0.2552
	2: female	1.808 (0.65–4.98)	

†Normal range of blood ammonia.

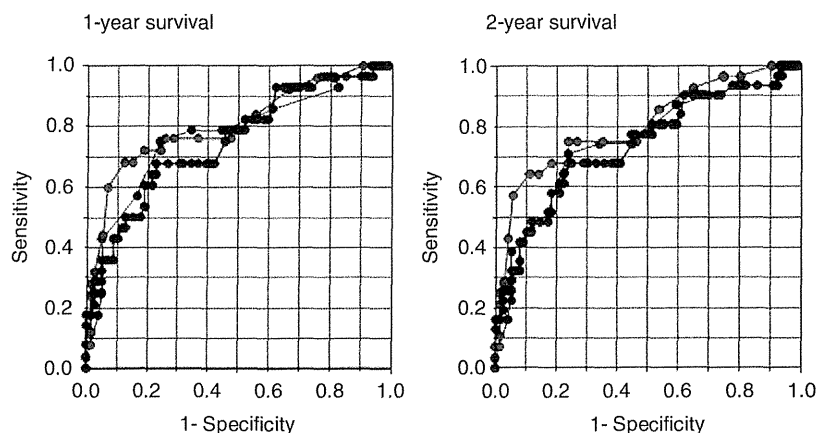


Figure 4 Receiver operating characteristic curves for the Child-Turcotte-Pugh (CTP) score, the Model for End-Stage Liver Disease (MELD) score, and the ADAMTS13 activity in predicting the 1-year and 2-year survival. The CTP score is represented by the black line, the MELD score by the red line, and the ADAMTS13 activity by the blue line. The areas under the curves (AUCs) for the CTP score, the MELD score, and the ADAMTS13 activity were 0.769, 0.805, and 0.752 in predicting the 1-year survival (left), and were 0.752, 0.805, and 0.739 in predicting the 2-year survival (right), respectively. The AUCs for the ADAMTS13:AC tended to be the lowest in the 1-year and 2-year survival, but the differences were not significant among the CTP score, the MELD score, and the ADAMTS13 activity.

ity. The mortality rate was higher in the patients with mild deficiency of ADAMTS13:AC (44.4%, $P < 0.03$) (Table 3) than in those with Child B (18.2%) according to the CTP score (Table 1) and the second quartile (16.7%) according to the MELD score (Table 2).

Determination of ADAMTS13:AC and its related parameters

Based on the VWFM assay, the plasma ADAMTS13:AC was $56 \pm 34\%$ in the LC patients, which was significantly lower than that in the healthy subjects ($P < 0.001$). This activity progressively decreased as cirrhosis advanced from Child A to C (Table 4). The ADAMTS13:AC determined by the act-ELISA also decreased as the cirrhosis severity increased and was consistent with the results of the VWFM assay ($r = 0.831$, $P < 0.001$). VWF: Ag was significantly higher in the LC patients than in the healthy subjects, and was higher in the patients with Child B and C than in those with Child A, but there was no difference between Child B and Child C patients. The VWF: RCo values were higher in the LC patients than in the healthy subjects but did not differ among the subgroups of LC patients from Child A to C. The ratio of VWF: RCo to VWF: Ag was lower in the LC patients (0.54 ± 0.45 , $P < 0.001$) than in the healthy subjects, but there were no differences among the LC patients with Child A, B, and C. In contrast, the ratio of VWF: RCo to ADAMTS13:AC significantly increased with the

progression of liver disease. With respect to the VWFM analyses, two Child A cirrhotics had only degraded-VWFM, eight and five Child B cirrhotics had degraded-VWFM and normal-VWFM, respectively, and six, 20, and eight Child C cirrhotics had degraded-VWFM, normal-VWFM, and UL-VWFM, respectively. The incidence of ADAMTS13:INH increased in the cirrhotic patients from Child A to C (Table 4). The inhibitory activity was 2.0 BU/mL³³ in one LC patient with TTP and 3.0 BU/mL in a patient with severe ADAMTS13:AC deficiency, but was in the marginal zone between 0.5 and 1.0 BU/mL in the remaining patients.

Relationship of the plasma ADAMTS13:AC with the clinical variables

Regarding the influence of HCC complicating LC on the plasma levels of ADAMTS13:AC, Child A LC patients with HCC had a significantly lower ADAMTS13:AC than those without HCC ($69 \pm 22\%$ vs. $103 \pm 11\%$, $P < 0.001$), but there were no differences between with and without HCC in the LC patients with Child B and Child C. Furthermore, the plasma ADAMTS13:AC levels were lower in the patients with JIS score of 4 ($32 \pm 28\%$, $P < 0.05$) and JIS score of 5 ($26 \pm 29\%$, $P < 0.05$) than in the patients with JIS score of 0 ($67 \pm 24\%$), score of 1 ($65 \pm 37\%$), and score of 2 ($69 \pm 22\%$). In addition, the ADAMTS13:AC levels were significantly lower in the LC patients with the following clinical conditions

than in those without; hepatic encephalopathy ($28 \pm 24\%$ vs. $71 \pm 29\%$, $P < 0.001$), hepatorenal syndrome ($13 \pm 12\%$ vs. $61 \pm 33\%$, $P < 0.001$), and severe esophageal varices ($46 \pm 33\%$ vs. $75 \pm 34\%$, $P < 0.05$). Moreover, the patients with refractory ascites had a lower ADAMTS13:AC ($25 \pm 17\%$) than those without ascites ($70 \pm 30\%$, $P < 0.001$) or those with easily mobilized ascites ($56 \pm 37\%$, $P < 0.001$). The ADAMTS13:AC was lower in the cirrhotic patients with portal thrombosis than those without ($18 \pm 19\%$ vs. $58 \pm 34\%$, $P < 0.005$). In seven cirrhotics in the sequential study, the ADAMTS13:AC significantly decreased with the progression of liver disturbance (ADAMTS13:AC $67 \pm 23\% \rightarrow 47 \pm 29\%$, $P < 0.02$, Child score $7.7 \pm 2.3 \rightarrow 8.9 \pm 2.7$).

Relationship of prognosis with the CTP score, MELD score and the plasma ADAMTS13:AC

Figures 1–3 show the actuarial curves calculated for the survival of the different patient subgroups, according to the three CTP classes, the quartiles of the MELD risk score, or the three ADAMTS13:AC classes. Child C patients had worse survival than Child A and B patients (Fig. 1) (Log rank test among the three groups, $P < 0.0001$; Child C vs. Child A, $P < 0.0001$; Child C vs. Child B, $P < 0.0001$), but the survival probabilities were not different between Child A and Child B patients. In addition, the survival of the patients in the fourth quartile of the MELD RS was worse than that of the patients in the first three RS quartiles (Fig. 2), while the survival of the patients in the first three RS quartiles did not differ among them (Log rank test among the four groups, $P < 0.0001$; fourth quartile vs. others, $P < 0.0001$). In contrast, the cumulative survival was clearly different among patients with severe to moderate ADAMTS13:AC deficiency, mild ADAMTS13:AC deficiency, and normal range of ADAMTS13:AC (Fig. 3) (Log rank test among the three groups, $P < 0.0001$; severe to moderate deficiency vs. mild deficiency, $P = 0.0219$; mild deficiency vs. normal range, $P = 0.0287$; severe to moderate deficiency vs. normal range, $P < 0.0001$). The median survival time was the lowest (4.5 months) in the cirrhotic patients with severe to moderate ADAMTS13:AC deficiency.

The hazard ratios for predicting the survival of cirrhotic patients were the highest in those with Child C (4.00 as compared to Child A) in the CTP score and the fourth quartile (5.16 as compared with the first quartile) in the MELD score, but did not differ between the patients with Child A and B, and among the patients

with the first, second, and third quartiles (Table 5). In contrast, the hazard ratios for the ADAMTS13:AC progressively increased from lowest in patients with normal activity (1.0), to those with mild deficiency (1.51), and to highest in those with severe to moderate deficiency of the activity (2.50) (Table 5). The AUCs for the CTP score, the MELD score, and the ADAMTS13:AC were 0.769 (95% confidence interval (CI) = 0.658–0.881), 0.805 (95% CI = 0.695–0.915), and 0.752 (95% CI = 0.643–0.861) in predicting the 1-year survival, and were 0.752 (95% CI = 0.645–0.859), 0.805 (95% CI = 0.702–0.907), and 0.739 (95% CI = 0.629–0.849) in predicting the 2-year survival, respectively (Fig. 4). The AUC for the ADAMTS13:AC tended to be the lowest in the 1-year and 2-year survival, but the differences were not significant among the CTP score, the MELD score, and the ADAMTS13:AC. The cut-off point for the ADAMTS13:AC was 44% for 1-year survival with the values of sensitivity and specificity being 67.9% and 77.2%, respectively.

Furthermore, to evaluate whether the ADAMTS13:AC is a significant predictor for survival of the cirrhotic patients, Cox proportional-hazards regression analysis was conducted using eight variables (age, sex, ADAMTS13:AC, albumin, total bilirubin, prothrombin time, blood ammonia, and platelet count) for potential covariates to predict the survival. In this analysis, ADAMTS13:AC and albumin were independently selected (Table 6). The hazard ratios of the patients with 25–50% and <25% of ADAMTS13:AC were 2.25 and 5.08, respectively ($P < 0.006$), and that of low serum albumin (<2.8 mg/dL) was 3.39 ($P < 0.01$) (Table 6).

DISCUSSION

IN THIS STUDY, we demonstrated that the cumulative survival differed according to the levels of plasma ADAMTS13:AC in the LC patients; the survival time was the shortest in the cirrhotics with severe to moderate ADAMTS13:AC deficiency, followed by those with mild ADAMTS13:AC deficiency, and was the longest in those with a normal range of activity (Fig. 3). In contrast, based on the CTP score, Child C patients had the worst survival, but the survival probabilities of Child A and Child B patients did not differ (Fig. 1). Based on the MELD score, the survival was the poorest in the cirrhotics in the fourth quartile, but it did not differ among the cirrhotics in the first three quartiles (Fig. 2). The CTP score is not always sufficient to predict the short-term prognosis,⁴ and the MELD score has been applied as a disease severity index to perform organ allocation for

liver transplantation in the patients with significantly advanced liver diseases. Remarkably, the median survival time was the lowest (4.5 months) in the cirrhotics with severe to moderate ADAMTS13:AC deficiency, and the actuarial curve was very similar or almost identical to that of the patients belonging to the fourth quartile of the MELD score (Figs 2,3).

Moreover, the three cumulative survival curves stratified by the degree of decrease in the ADAMTS13:AC were clearly different during a median follow-up of 475 days (range: 5 to 2406 days). This may be attributed to the higher mortality rate in the patients with mild deficiency of ADAMTS13:AC (44.4%, $P < 0.03$) (Table 3) than in those with Child B (18.2%) (Table 1) according to the CTP score and the second quartile (16.7%) according to the MELD score (Table 2). The hazard ratios for predicting the survival of cirrhotic patients were the highest in those with Child C in the CTP score and the fourth quartile in the MELD score, but did not differ between the patients with Child A and B, and among the patients with the first, second, and third quartiles (Table 5). In contrast, the hazard ratios for the ADAMTS13:AC progressively increased from lowest in patients with normal activity, to those with mild deficiency, and to highest in those with severe to moderate deficiency of the activity (Table 5). The AUCs for the ADAMTS13:AC tended to be the lowest in the 1-year and 2-year survival, but the differences did not differ among the CTP score, the MELD score, and the ADAMTS13:AC (Fig. 4), indicating that the change in the plasma ADAMTS13:AC is sufficient to evaluate the prognosis of the cirrhotic patients similar to the Child score and the MELD score. Furthermore, multivariate analysis using several potential covariates to predict the survival showed that ADAMTS13:AC and albumin were independent predictors for survival of the patients with liver cirrhosis (Table 6). Based on previous reports and our present study, the degree of decrease in the plasma ADAMTS13:AC may be a useful marker to predict not only the short-term prognosis, but also the long-term survival of the LC patients. It is important to be able to evaluate the prognosis of cirrhotic patients using only one parameter, such as ADAMTS13:AC, because both the CTP score and the MELD score are calculated based on a scoring system that encompasses several parameters (bilirubin, albumin, prothrombin time, ascites, and encephalopathy in the former, and creatinine, bilirubin, prothrombin time, and cause of cirrhosis in the latter).

Interestingly, ADAMTS13:AC significantly decreased with the progression of liver disturbance in the seven

LC patients with the sequential study. These patients were admitted into the hospital for a second time because of hepatic encephalopathy in three patients, ascites augmentation in three, and variceal rupture in one. We previously demonstrated that the plasma ADAMTS13:AC was remarkably low in the LC patients with hepatic encephalopathy, hepatorenal syndrome and refractory ascites.²⁹ A multivariate analysis identified blood ammonia, serum creatinine and spleen volume as independent factors that contribute to the decrease in ADAMTS13:AC, indicating that ADAMTS13:AC closely correlated with the severity of hepatic encephalopathy, renal dysfunction and splenomegaly in the LC patients.²⁹ Actually, the incidence of patients with SBP, hepatorenal syndrome, and hepatic encephalopathy progressively increased from the patients with normal range to those with severe to moderate deficiency of the ADAMTS13:AC (Table 3). These selected parameters are intimately related to the CTP score and the MELD score that predict the prognosis of the cirrhotic patients. On the other hand, the ADAMTS13:AC was lower in three Child B and three Child C LC patients with portal thrombosis than in those without, but further studies are needed to elucidate the significance of lower ADAMTS13:AC associated with portal thrombosis from the point of decreased functional liver capacity in more LC patients with portal thrombosis.

The levels of VWF: Ag, the substrate of ADAMTS13, progressively increased as the functional liver capacity decreased, probably due to the neocapillarization of the hepatic endothelial cells that leads to liver fibrosis, increased endothelial production induced by endotoxin^{21,45} and/or increased synthesis by extrahepatic endothelial cells.⁴⁶ VWF: RCo relative to ADAMTS13:AC increased as the chronic liver disease progressed, and VWF multimers appeared to shift from a degraded- to normal-VWF and finally to UL-VWF as the functional liver capacity and renal function deteriorated, indicating that advanced cirrhosis may predispose the patients to platelet microthrombi formation.²⁹ The marked impairment in the enzyme to substrate ratio; i.e., decreased ADAMTS13 to increased VWF: Ag, may lead to platelet hyperaggregability with subsequent microcirculatory disturbances not only in the liver but also in other organs, leading to multi-organ failure. Indeed, portal or hepatic vein thrombosis is often observed in advanced LC patients routinely screened with Doppler US,⁸ and in cirrhotic liver tissue removed at transplantation.⁹ Moreover, microthrombi were found in one or more organs in half of the cirrhotic livers at autopsy.¹⁰

The plasma ADAMTS13:AC may decrease in advanced cirrhosis due to reduced ADAMTS13 production in HSCs,⁴⁷ enhanced consumption to degrade large quantities of VWF: Ag,²⁶ and/or its plasma inhibitor.^{15,16} We detected plasma ADAMTS13:INH in 83% of the patients with severe to moderate ADAMTS13:AC deficiency, but the ADAMTS13 inhibitory activity was in the marginal zone between 0.5 and 1.0 BU/mL in most cases except one TTP patient (2.0 BU/mL)³³ and one patient with severe ADAMTS13:AC deficiency (3.0 BU/mL).²⁹ We could detect IgG-type autoantibodies in five end-stage cirrhotic patients with severe ADAMTS13:AC deficiency (<3%).²⁹ One patient had characteristic clinical features of TTP. However, the remaining four patients did not show any apparent clinical features of TTP, but were indistinguishable from the typical TTP patients based on ADAMTS13:AC and the presence of anti-ADAMTS13 autoantibodies. These results indicate that some end-stage cirrhotic patients with extremely low ADAMTS13:AC and IgG ADAMTS13 inhibitor might have a condition similar to TTP or have “subclinical” TTP. Together with our present results, these findings suggest that the degree of decrease in the plasma ADAMTS13:AC may be a useful predictor that closely correlates with the pathogenesis of hepatic failure, including encephalopathy and/or renal disturbance, in the patients with advanced LC.

Alternatively, various clinical conditions, including infection, malignancies, and certain drugs, can lead to acquired TTP.⁴⁸ In addition, some patients with congenital TTP whose ADAMTS13:AC is extremely low (<0.5%) due to mutations in the *ADAMTS13* gene showed no apparent clinical features during their childhood except mild to moderate thrombocytopenia during stressful conditions such as infection, but apparently developed “TTP” during the third trimester of pregnancy when VWF production from the placental endothelial cells markedly increases.⁴⁹ This condition is called “masqueraded TTP in congenital Upshaw–Schulman syndrome.” Furthermore, sepsis-induced multi-organ failure has been recently shown to have close correlation with the decrease in ADAMTS13:AC and increase in VWF: Ag.⁵⁰ This finding indicates that the enzyme to substrate ratio is extremely important in the formation of platelet microthrombi and subsequent microcirculatory disturbances that lead to multi-organ failure. In advanced cirrhotics, endotoxemia is frequently detected,²¹ and SBP sometimes occurs.³⁵ HCC becomes highly complicated as the cirrhotic stage progresses,⁵¹ suggesting that these patients are at high risk for platelet microthrombi formation. Therefore, LC patients with moderate

ADAMTS13:AC deficiency (3–25%) who have no apparent IgG ADAMTS13 inhibitor and whose inhibitory activity is in the marginal zone (0.5–1.0 BU/mL) may be especially prone to a poorer prognosis in case of infection and endotoxemia that augments VWF production from endothelial cell precipitates, ultimately resulting in a shorter survival.

In summary, the plasma ADAMTS13:AC concomitantly decreased as the functional liver capacity declined, and the degree of activity closely correlated with the prognosis of the LC patients. Therefore, ADAMTS13:AC may be a useful marker to predict the clinical outcome in advanced cirrhosis.

ACKNOWLEDGMENTS

THIS WORK WAS supported in part by Grants-in-Aid for Scientific Research from the Japanese Ministry of Education, Culture, Sports, Science, and Technology (MU, YF), from the Ministry of Health and Welfare of Japan for Blood Coagulation Abnormalities (YF), and from the Research Program of Intractable Disease provided by the Ministry of Health, Labor, and Welfare of Japan (to H. F.). The authors sincerely thank Ayami Isonishi for her great help in the assay of ADAMTS13 activity and VWF antigen.

REFERENCES

- 1 Durand F, Valla D. Assessment of prognosis of cirrhosis. *Semin Liver Dis* 2008; 28: 110–22.
- 2 Child CG, Turcotte JG. The liver and portal hypertension. In: Child CI, ed. *Surgery and Portal Hypertension*. Philadelphia: W.B. Saunders, 1964; 50–8.
- 3 Pugh RN, Murray-Lyon IM, Dawson JL, Pietroni MC, Williams R. Transection of the esophagus for bleeding oesophageal varices. *Br J Surg* 1973; 60: 646–9.
- 4 Salerno F, Merli M, Cazzaniga M *et al.* MELD score is better than Child-Pugh score in predicting 3-month survival of patients undergoing transjugular intrahepatic portosystemic shunt. *J Hepatol* 2002; 36: 494–500.
- 5 Kamath PS, Wiesner RH, Malinchoc M *et al.* A model to predict survival in patients with end-stage liver disease. *Hepatology* 2001; 33: 464–70.
- 6 Yoo HY, Edwin D, Thuluvath PJ. Relationship of the model for end-stage liver disease (MELD) scale to hepatic encephalopathy, as defined by electroencephalography and neuropsychometric testing, and ascites. *Am J Gastroenterol* 2003; 98: 1395–9.
- 7 Northup PG, Sundaram V, Fallon MB *et al.* Coagulation in Liver Disease Group. Hypercoagulation and thrombophilia in liver disease. *J Thromb Haemost* 2008; 6: 2–9.

- 8 Amitrano L, Guardascione MA, Brancaccio V *et al*. Risk factors and clinical presentation of portal vein thrombosis in patients with liver cirrhosis. *J Hepatol* 2004; 40: 736–41.
- 9 Wanless IR, Wong F, Blendis LM, Greig P, Heathcote EJ, Levy G. Hepatic and portal vein thrombosis in cirrhosis: possible role in development of parenchymal extinction and portal hypertension. *Hepatology* 1995; 21: 1238–47.
- 10 Oka K, Tanaka K. Intravascular coagulation in autopsy cases with liver diseases. *Thromb Haemost* 1979; 42: 564–70.
- 11 Moake JL. Thrombotic microangiopathies. *N Engl J Med* 2002; 347: 589–99.
- 12 Fujimura Y, Matsumoto M, Yagi H, Yoshioka A, Matsui T, Titani K. Von Willebrand factor-cleaving protease and Upshaw-Schulman syndrome. *Int J Hematol* 2002; 75: 25–34.
- 13 Levy GG, Nichols WC, Lian EC *et al*. Mutations in a member of the ADAMTS13 gene family cause thrombotic thrombocytopenic purpura. *Nature* 2001; 413: 488–94.
- 14 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 U S A* 2002; 99: 11902–7.
- 15 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* 1998; 339: 1578–84.
- 16 Tsai HM, Lian EC. Antibodies to von Willebrand factor-cleaving protease in acute thrombotic thrombocytopenic purpura. *N Engl J Med* 1998; 339: 1585–94.
- 17 Uemura M, Tatsumi K, Matsumoto M *et al*. Localization of ADAMTS13 to the stellate cells of human liver. *Blood* 2005; 106: 922–4.
- 18 Suzuki M, Murata M, Matsubara Y *et al*. Detection of von Willebrand factor-cleaving protease (ADAMTS-13) in human platelets. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 313: 212–16.
- 19 Turner N, Nolasco L, Tao Z, Dong JF, Moake J. Human endothelial cells synthesize and release ADAMTS-13. *J Thromb Haemost* 2006; 4: 1396–404.
- 20 Manea M, Kristoffersson A, Schneppenheim R *et al*. Podocytes express ADAMTS13 in normal renal cortex and in patients with thrombotic thrombocytopenic purpura. *Br J Haematol* 2007; 138: 651–62.
- 21 Ferro D, Quintarelli C, Lattuada A *et al*. High plasma levels of von Willebrand factor as a marker of endothelial perturbation in cirrhosis: relationship to endotoxemia. *Hepatology* 1996; 23: 1377–83.
- 22 Albornoz L, Alvarez D, Otaso JC *et al*. Von Willebrand factor could be an index of endothelial dysfunction in patients with cirrhosis: relationship to degree of liver failure and nitric oxide levels. *J Hepatol* 1999; 30: 451–5.
- 23 Aster RH. Pooling of platelets in the spleen: role in the pathogenesis of “hypersplenic” thrombocytopenia. *J Clin Invest* 1966; 45: 645–57.
- 24 Peck-Radosavljevic M, Wichlas M, Zacherl J *et al*. Thrombopoietin induces rapid resolution of thrombocytopenia after orthotopic liver transplantation through increased platelet production. *Blood* 2000; 95: 795–801.
- 25 Schffski P, Tacke F, Trautwein C *et al*. Thrombopoietin serum levels are elevated in patients hepatitis B/C infection compared with other causes of chronic liver diseases. *Liver* 2002; 22: 114–20.
- 26 Mannucci PM, Canciani MT, Forza I, Lussana F, Lattuada A, Rossi E. Changes in health and disease of the metalloproteinase that cleaves von Willebrand factor. *Blood* 2001; 98: 2730–5.
- 27 Feys HB, Canciani MT, Peyvandi F, Deckmyn H, Vanhoolbeke K, Mannucci PM. ADAMTS13 activity to antigen ratio in physiological and pathological conditions associated with an increased risk of thrombosis. *Br J Haematol* 2007; 138: 534–40.
- 28 Lisman T, Bongers TN, Adelmeijer J *et al*. Elevated levels of von Willebrand factor in cirrhosis support platelet adhesion despite reduced functional capacity. *Hepatology* 2006; 44: 53–61.
- 29 Uemura M, Fujimura Y, Matsumoto M *et al*. Comprehensive analysis of ADAMTS13 in patients with liver cirrhosis. *Thromb Haemost* 2008; 99: 1019–29.
- 30 Park YD, 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* 2002; 29: 789–94.
- 31 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* 2005; 29: 264S–71S.
- 32 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* 2006; 12: 859–69.
- 33 Yagita M, Uemura M, Nakamura T, Kunitomi A, Matsumoto M, Fujimura Y. Development of ADAMTS-13 inhibitor in a patient with hepatitis C virus-related liver cirrhosis causes thrombotic thrombocytopenic purpura. *J Hepatol* 2005; 42: 420–1.
- 34 Henderson JM, Heymsfield SB, Horowitz J, Kutner MH. Measurement of liver and spleen volume by computed tomography. *Radiology* 1981; 141: 525–7.
- 35 Arroyo V, Ginès P, Gerbes AL *et al*. Definition and diagnostic criteria of refractory ascites and hepatorenal syndrome in cirrhosis. International ascites club. *Hepatology* 1996; 23: 164–76.
- 36 Trey C, Burns DG, Saunders SJ. Treatment of hepatic coma by exchange blood transfusion. *N Engl J Med* 1966; 274: 473–81.
- 37 Japanese Research Society for Portal Hypertension. The general rules for recording endoscopic findings

- on esophageal varices. *Jpn J Surg* 1980; 10: 329–37.
- 38 Kudo M, Chung H, Haji S *et al.* Validation of a new prognostic staging system for hepatocellular carcinoma: the JIS score compared with the CLIP score. *Hepatology* 2004; 40: 1396–405.
- 39 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* 2002; 42: 572–80.
- 40 Furlan M, Robles R, Solenthaler M, Wassmer M, Sandoz P, Lämmle P. Deficiency activity of von Willebrand factor-cleaving protease in chronic relapsing thrombotic thrombocytopenic purpura. *Blood* 1997; 89: 3097–103.
- 41 Kato S, Matsumoto M, Matsuyama T, Isonishi A, Hiura H, Fujimura Y. Novel monoclonal antibody-based enzyme immunoassay for determining plasma levels of ADAMTS13 activity. *Transfusion* 2006; 46: 1444–52.
- 42 Macfarlane DE, Stibbe J, Kirby EP, Zucker MB, Grant RA, McPherson J. A method for assaying von Willebrand factor (ristocetin cofactor). *Thromb Diath Haemorrh* 1975; 34: 306–8.
- 43 Warren CM, Krzesinski PR, Greaser ML. Vertical agarose gel electrophoresis and electroblotting of high-molecular-weight proteins. *Electrophoresis* 2003; 24: 1695–702.
- 44 Kasper CK, Aledort L, Aronson D *et al.* A more uniform measurement of factor VIII inhibitors. *Thromb Diath Haemorrh* 1975; 34: 869–72.
- 45 Schorer AE, Moldow CF, Rick ME. Interleukin 1 or endotoxin increases the release of von Willebrand factor from human endothelial cells. *Br J Haematol* 1987; 67: 193–7.
- 46 Tornai I, Hirsfalvi J, Boda Z, Udvardy M, Pfliegler G, Rak K. Endothelium releases more von Willebrand factor and tissue-type plasminogen activator upon venous occlusion in patients with liver cirrhosis than in normals. *Haemostasis* 1993; 23: 58–64.
- 47 Kume Y, Ikeda H, Inoue M *et al.* Hepatic stellate cell damage may lead to decreased plasma ADAMTS13 activity in rats. *FEBS Lett* 2007; 581: 1631–4.
- 48 Matsumoto M, Yagi H, Ishizashi H, Wada H, Fujimura Y. The Japanese experience with thrombotic thrombocytopenic purpura-hemolytic uremic syndrome. *Semin Hematol* 2004; 41: 68–74.
- 49 Fujimura Y, Matsumoto M, Kokame K *et al.* Pregnancy-induced thrombocytopenia and TTP, and the risk of fetal death, in Upshaw-Schulman syndrome: a series of 15 pregnancies in 9 genotyped patients. *Br J Haematol* 2009; 144: 742–54.
- 50 Claus RA, Bockmeyer CL, Budde U *et al.* Variations in the ratio between von Willebrand factor and its cleaving protease during systemic inflammation and association with severity and prognosis of organ failure. *Thromb Haemost* 2009; 101: 239–47.
- 51 Sala M, Former A, Varela M, Bruix J. Prognostic prediction in patients with hepatocellular carcinoma. *Semin Liver Dis* 2005; 25: 171–80.

アルコール性肝炎における ADAMTS13 活性の動態

奈良県立医科大学第3内科

高谷 広章 植村 正人 松山 友美 石川 昌利 藤本 正男
森岡 千恵 辻本 達寛 瓦谷 英人 福井 博

奈良県立医科大学輸血部

松本 雅則 藤村 吉博

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 (severe alcoholic hepatitis; SAH) は, 劇症肝炎に類似し, 肝性脳症, 肺炎, 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)~4)}. その成因として, 肝網内系機能不全と腸管の透過性亢進に基づくエンドトキシン (Et) 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^{1)~8)}.

一方, ADAMTS13 (A Disintegrin-like And Metalloproteinase domain, with Thrombo Spondin type-1 motif 13) は, 血管内皮細胞から放出される超高分子量 VWF multimer (UL-VWFM) を切断する亜鉛含有酵素であり^{9)~11)}, 主に肝星細胞で産生される¹²⁾. ADAMTS13 は血栓性血小板減少性紫斑病 (thrombotic thrombocytopenic purpura; TTP)^{9), 10)} の発症との関連で注目を浴びているが, 最近, 肝硬変^{13)~20)}, 造血幹細胞移植後の veno-occlusive disease (VOD)^{21), 22)}, 肝移植後^{23), 24)}, 肝切除後肝障害²⁵⁾ 等における ADAMTS13 の動態

が, 肝障害の発症・進展, 肝発痛²⁶⁾ならびに多臓器不全合併との関連において注目されている. 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, 血小板の活性化を引き起こす. その結果, 血小板の微小凝集塊が形成され, 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^{9)~11)}.

我々は肝硬変では血漿 ADAMTS13 活性は肝予備能の低下に伴って低下するが, 進行した肝硬変における ADAMTS13 活性の著減と UL-VWFM の出現は, 血小板血栓形成の predisposing state を反映し, 腎障害, 脳症発現といった病態形成の一端を担っており^{14), 17)~19)}, 予後の指標になり得る²⁰⁾ことを報告した. また, 造血幹細胞移植前の ADAMTS13 活性の低下が, 移植後 veno-occlusive disease (VOD) 発症の予測因子となり²¹⁾, ADAMTS13 の補充療法としての FFP の予防投与が VOD 発症を抑制すること²²⁾, 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指摘した²³⁾.

本稿では, アルコール性肝炎, 特に SAH において ADAMTS13 活性著減と VWF 抗原著増という酵素・基質の不均衡がアルコール性肝炎の進

Determination of ADAMTS13 and its clinical significance in patients with alcoholic hepatitis

Hiroaki Takaya*¹, Masahito Uemura*¹, Tomomi Matsuyama*¹, Masatoshi Ishikawa*¹, Masao Fujimoto*¹, Chie Morioka*¹, Tatsuhiro Tsujimoto*¹, Hideto Kawaratani*¹, Masanori Matsumoto*², Yoshihiro Fujimura*², Hiroshi Fukui*¹. *¹Third Department of Internal Medicine, *²Department of Blood Transfusion Medicine, Nara Medical University

展ならびに SAH に伴う多臓器不全の発症に関与し、炎症性サイトカイン、Et および本酵素に対するインヒビターが本酵素活性を低下させる可能性のあることを指摘した最近の知見を踏まえて概説する^{27)~31)}。

2. ADAMTS13 とその作用機転

ADAMTS13 は 13 番目に発見された ADAMTS ファミリーに属する亜鉛含有メタロプロテアーゼであり、染色体 9q34 に存在し、1427 アミノ酸残基から成り、29 のエクソンを有する一本鎖糖蛋白質で、分子量は約 200 Kd である^{9), 10), 32)}。この遺伝子は、N 末端側から順に酵素活性中心である metalloproteinase domain, 基質認識・結合部位である cystrich-spacer domain, 血管内皮細胞表面にある CD36 受容体に結合するといわれている thrombospondin domain, そして本酵素の分泌に重要といわれている CUB domain の 4 つの活性ドメインから成る³²⁾。本酵素は主に肝星細胞で産生される¹²⁾が、血小板³³⁾、血管内皮細胞³⁴⁾、腎臓の podocyte³⁵⁾でも産生されると報告されている。

血管内皮細胞で産生され、Weibel-Palade 体 (WPB) で貯蔵された UL-VWFm は、炎症性サイトカイン、低酸素血症、DDAVP (デスマプレシン)、エピネフリン等のさまざまな刺激により、血中に放出される^{10), 31), 32)} (図 1)。血管内皮細胞が刺激を受けると、WPB で貯蔵された UL-VWFm と P-セレクトリンは内皮細胞上の細膜表面を移動し、そこで P-セレクトリンは UL-VWFm を細胞膜表面上で捕獲する役目を果たす。この状況下において、細小動脈内腔で高い圧力がかかると、UL-VWFm は球状から進展構造へと変化する。ADAMTS13 は進展した UL-VWFm の Tyr (842 番目)-Met (843 番目) ペプチド結合を有効的に切断する。この際、ADAMTS13 は血管内皮細胞表面のおそらく CD36 受容体に結合した上で、UL-VWFm を捕捉し、UL-VWFm を切断すると考えられている。ADAMTS13 活性が著減すると、UL-VWFm は切断されず、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 GPIIb/IIIa 受容体の活性化を引き起こす。血小板活性化は様々な細胞内物質の放出と Ca^{2+} の細胞

内への流入を引き起こす。中でも血小板の内的 ADP は微小循環下で自らの血小板のさらなる活性化を促し、より活性化された GPIIb/IIIa 受容体に VWF が結合し血小板の微小凝集塊が産生される。その結果、微小循環障害が惹起され、最終的に TTP が招来すると考えられる^{10), 31), 32)} (図 1)。

血漿 ADAMTS13 活性を低下させる要因としては、過剰な VWF 抗原を処理する為の ADAMTS13 の消費¹³⁾、肝星細胞からの産生障害³⁵⁾の他に、ADAMTS13 に対する inhibitor^{14), 17)~20), 30), 37), 38)}、炎症性サイトカイン^{30), 39)~41)} および Et^{30), 31), 42)}等が考えられている (図 1)。

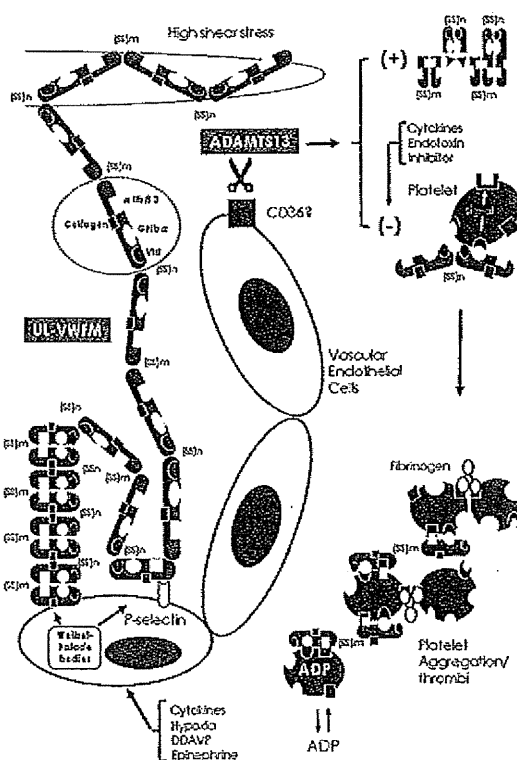


図 1 ADAMTS13 の作用機転

3. ADAMTS13 活性およびインヒビターの測定

従来の ADAMTS13 活性測定法は、VWF マルチマーを血漿と反応させ、その切断の程度をウエスタンブロットで調べる手法であり測定に数日を要した^{37), 43)}。最近、ADAMTS13 の特異的基質と

なり得る VWF の最小領域 Asp1596 ~ Arg1668 (73 アミノ酸残基) が特定され、この VWF73 のペプチド基質を利用し、FRET 法⁴⁴⁾と act-ELISA 法⁴⁵⁾の二つの簡易測定法が開発された。両者とも簡便性と迅速性に優れているが、後者は溶血、高ビリルビン血症、高脂血症の影響を受けることなく、正常活性の 0.5 % という低活性をも判別できる感度を有し、汎用的な ELISA 操作で活性を測定することができる利点がある。ELISA を用いた健常人の血漿 ADAMTS13 活性は $99 \pm 22 \%$ ($n = 56$, 平均 \pm 2SD) であった⁴⁵⁾。

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。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⁴⁶⁾。

4. アルコール性肝炎における ADAMTS13 活性

アルコール性肝炎 (AH) 28 例, SAH5 例 (生存 2 例, 死亡 3 例) の血漿 ADAMTS13 活性は、健常人 102 % (平均) に比し、AH 62 %, SAH 24 % と低値であった (図 2a)^{27)~29)}。この際、SAH では AH および肝硬変 (Child A 5 例, Child B 3 例, Child C 2 例) に比しより低値であり、特に多臓器不全合併死亡例の本酵素活性は著減していた (図 2a)。VWF 抗原は健常人 100 % に比し、AH では約 4 倍、SAH では約 8 倍増加しており (図 2b)、結果として VWF 抗原 / ADAMTS13 活性比は、健常人 1.0 に比し、AH では約 10 倍、SAH では約 100 倍高値を示し、特に SAH 死亡例では著増した (図 2c)。また、血小板と最も反応性に富む UL-VWFM は SAH5 例中 4 例 (80 %), AH28 例中 5 例 (17.9 %) に検出された (図 3a)。この際、SAH 多臓器不全合併死亡例の酵素活性は 4.5 % ~ 16.0 % と著しい低値を示し VWF 抗原は著増したことから、本酵素活性と基質の高度な不均衡が、AH の進展ならびに SAH に伴う多臓器不全の進展に関与する可能性が示唆された^{27)~29)}。

経過観察例において、生存例では ADAMTS13 活性は回復期に上昇し、VWF 抗原は低下するが、

SAH 死亡例では本酵素活性の上昇はみられず、VWF 抗原は高値を持続した^{27)~29)}。また、ADAMTS13 活性の低下は、肝予備能の低下、炎症反応の亢進、腎障害の程度と関連し、VWF 抗原の増加が血小板減少、貧血の程度と関連したことは、本酵素と基質の不均衡がアルコール性肝炎の病態の進展ならびに重症度と密に関連し、予後の指標になる可能性を示唆している^{27)~29)}。

今回、多臓器不全合併 SAH 死亡例の ADAMTS13 活性が TTP に匹敵する程度にまで

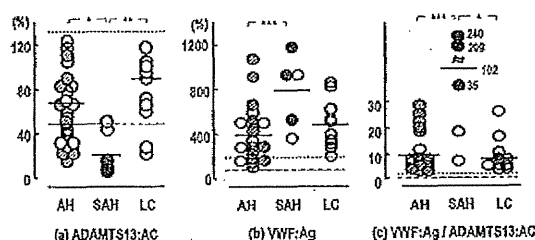


図 2 アルコール性肝炎における ADAMTS13 活性と VWF 抗原

(AH= アルコール性肝炎, SAH= 重症アルコール性肝炎, LC= アルコール性肝硬変, ADAMTS13:AC= ADAMTS13 活性, VWF:Ag=VWF 抗原, VWF:Ag/ADAMTS13:AC= VWF 抗原 / ADAMTS13 活性比。白丸と斜線丸は生存例, 黒丸は死亡例, 斜線丸はアルコール性肝硬変にアルコール性肝炎が合併した症例を示す。

点線は正常値の上限, 鎖線は正常値の下限を示す。正常値は ADAMTS13 活性 $102 \pm 23\%$ (平均 \pm 2SD), VWF 抗原 $100 \pm 53\%$, VWF 抗原 / ADAMTS13 活性比 1.0 ± 0.4 であった。

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.005$ は 2 群間の有意差を示す。

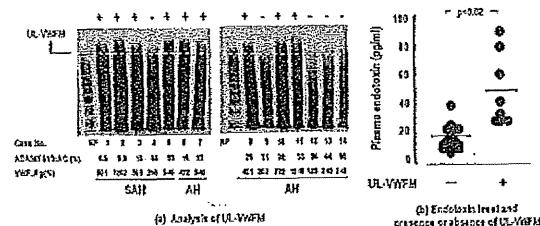


図 3 アルコール性肝炎における VWF マルチマー解析と血漿エンドトキシン濃度

(AH= アルコール性肝炎, SAH= 重症アルコール性肝炎, ADAMTS13:AC=ADAMTS13 活性, VWF:Ag=VWF 抗原, UL-VWFM= 超高分子量 VWF マルチマー, NP = 正常コントロール)

著減していたことは注目すべきであり、TTP 類似病態は、SAH の進展ならびに多臓器不全発症の一端を担っている可能性がある。この際、DIC 合併例は SAH1 例のみであり、明らかな DIC 徴候の無い時期に、ADAMTS13 活性と VWF 抗原の高度な不均衡が存在する事実は、SAH の成因ならびに重症化の機序を解明する上で留意すべきであろう。

ところで、アルコール性肝障害の発症、進展には肝微小循環障害の重要性が論じられている^{47)~49)}。ADAMTS13 は主に肝星細胞で産生される¹²⁾が、アルコール性肝障害において、早期より毛細血管化した類洞内皮細胞に VWF 抗原の産生がみられること^{50), 51)}から、AH、特に SAH における本酵素活性の著減と VWF の著増は、肝類洞内微小循環障害の一因となり、肝細胞障害を増悪させる可能性がある。また、SAH では軽度~高度の VOD が高頻度に観察され^{52), 53)}、VOD が高度な例ほど、腹水が高度であること⁵³⁾から、SAH における ADAMTS13 活性と VWF 抗原の高度な不均衡は VOD 発症の解明にも繋がる可能性がある。なお、我々は劇症肝炎を含めた急性肝不全における ADAMTS13 活性を測定し、SAH における本酵素活性とほぼ同様の動態を示すことを確認している。

5. アルコール性肝炎における ADAMTS13 活性低下の機序

ADAMTS13 活性を低下させる機序としては、過剰な VWF 抗原を処理する為の ADAMTS13 の消費¹³⁾、肝星細胞からの産生障害³⁶⁾、ADAMTS13 に対する inhibitor^{14), 17)~20), 30), 37), 38)}、炎症性サイトカイン^{30), 39)~41)}および Et^{30), 31), 42)}等が考えられている。AH、特に SAH では、肝網内系機能不全と腸管の透過性亢進に基づく Et 血症が、各種サイトカイン血症の引き金となり、SIRS、微小循環障害を惹起させ、肝不全や多臓器不全をもたらすと考えられている^{1)~8)}。

そこで、まず炎症性サイトカインを検討した結果、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

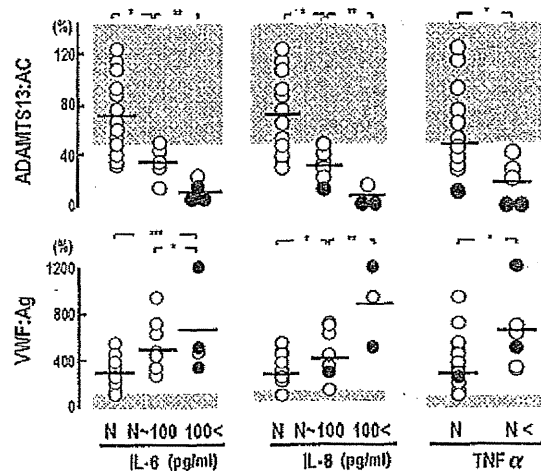


図4 アルコール性肝炎における血漿サイトカイン濃度と ADAMTS13 活性および VWF 抗原との関係
ADAMTS13:AC=ADAMTS13 活性, VWF:Ag=VWF 抗原, IL-6=interleukin 6, IL-8=interleukin 8, TNF α =tumor necrosisfactor α , N=正常範囲, 斜線部は正常範囲を示す。* $p<0.05$, ** $p<0.005$ は 2 群間の有意差を示す。

た(図4上段)^{30), 31)}。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4下段)^{30), 31)}。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 以上の群では全例に UL-VWFM が検出された³⁰⁾。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 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^{30), 31)}。最近、IL-6 が ADAMTS13 の作用を抑制し、IL-8, TNF α が UL-VWFM の放出を増強させることが報告され、炎症性サイトカインと ADAMTS13 の動態との関連が注目されている³⁰⁾。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^{54)~56)}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 の増加をもたらす、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。

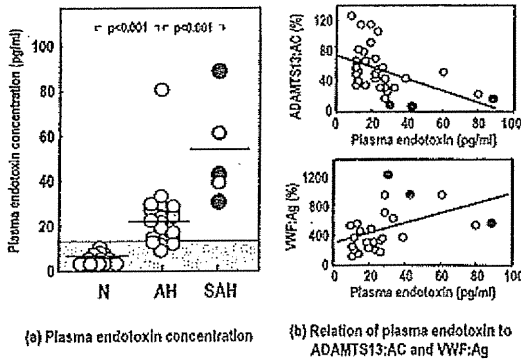


図5 アルコール性肝炎における血漿エンドトキシン濃度と ADAMTS13 活性および VWF 抗原との関係 (N= 健常者, AH= アルコール性肝炎, SAH= 重症アルコール性肝炎, ADAMTS13:AC=ADAMTS13 活性, VWF:Ag=VWF 抗原, 白丸は生存例, 黒丸は死亡例, 斜線部は正常範囲を示す.)
 図b上段 血漿エンドトキシン濃度と血漿 ADAMTS13 活性との相関 ($r = -0.474, p < 0.01$).
 図b下段 血漿エンドトキシン濃度と血漿 VWF 抗原との相関 ($r = 0.406, p < 0.05$).

一方、血漿 Et 濃度は、入院時 AH では健常人の約 2 倍、SAH では約 5 倍増加しており (図 5a)、生存例の回復期には低下したが、死亡例の 1 例では末期にさらに上昇した^{30), 31)}。この際、血漿 Et 濃度は血漿 ADAMTS13 活性と負の相関 (図 5b)、VWF 抗原と正の相関 (図 5b) がみられ、UL-VWFM 陽性群は陰性群に比して血漿 Et 濃度は有意に上昇した (図 3b)^{30), 31)}。これらの結果は、AH における高度な Et 血症は、血漿 ADAMTS13 活性の低下、VWF 抗原の増加ならびに ULVWFM の出現と密に関連することを示唆している。最近、全身炎症性反応と関連した ADAMTS13 活性の低下は血漿中に UL-VWFM の形成を促すことが報告⁴²⁾されており、我々の成績を支持する。

ところで、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³⁰⁾。また、AH 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、CRP および血漿 Et 濃度が高値で、血清アルブミンは低値であった³⁰⁾。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、炎症反応ならびに Et 血症の程度と密に関連していることを示唆している^{30), 31)}。最近、健常ボランティアに Et を静注した際、急性炎症反応とともに血漿 ADAMTS13 活性が低下し、VWF 抗原の増加に加えて UL-VWFM が出現することが確認されており⁴²⁾、Et 自身がサイトカインと共に血漿 ADAMTS13 活性を低下させる可能性が論じられている。我々は TTP を合併した肝硬変¹⁴⁾、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⁵⁷⁾において検出した ADAMTS13 に対するインヒビター活性はそれぞれ 2.0 BU/ml、1.6 BU/ml であり、進行した肝硬変¹⁴⁾では 0.5 ~ 3.0 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 %) にインヒビター活性がみられ、うち 33 例 (61.1 %) は 0.5 ~ 2.0 BU/ml、残り 21 例 (38.9 %) が 2.0 BU/ml 以上であった⁵⁸⁾。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。今後、AH、特に SAH における ADAMTS13 活性低下の機序について、インヒビターがどのようなタイプなのか、ADAMTS13 抗体依存性インヒビター、Et、サイトカインあるいはエタノール自身の作用との関連のもとにさらに検討していく必要がある。

6. 健常人における中等度～高度エタノール負荷後の血漿 ADAMTS13 活性の動態

アルコール性肝障害の発生には、肝細胞でのエタノール代謝により生じるアセトアルデヒドが主因の一つを成していると推定されている⁵⁹⁾。日本人の半数はアセトアルデヒドを主として代謝する aldehyde dehydrogenase-2 (ALDH2) が欠損しており^{60)~62)}、ALDH2 欠損者が常習飲酒を続けた際には、持続的に高濃度のアセトアルデヒドにさらされる為、アルコール性肝障害が発症し易い可能性がある。事実、ALDH2 の変異遺伝子を持つヘテロ接合体 (ALDH2*1/ALDH2*2) では、正

常ホモ接合体 (ALDH2*1/ALDH2*1) に比べ、より少量の飲酒によりアルコール性肝炎が発症する頻度が高い傾向にあるという⁶³⁾。

そこで、健常人に中等度～高度のエタノールを負荷した際の ADAMTS13 活性の動態を ALDH2 遺伝子型の差異との関連のもとに検討した結果、血漿 ADAMTS13 活性は、正常ホモ接合体では飲酒後 4 時間で前値に比し平均 10 % 程度の低下に留まったのに対し、ヘテロ接合体では飲酒後 2～5 時間にわたり平均 18～21 % の低下が持続した⁶⁴⁾。この際、飲酒後、前値の 20 % 以上低下した症例の割合は、正常ホモ接合体では 27.3 % であったのに対し、ヘテロ接合体では 88.9 % と高率であった。なお、経過を通じて本酵素に対するインヒビターは検出されなかった。血漿 VWF 抗原は、正常ホモ接合体では飲酒後ほとんど変化がみられなかったが、ヘテロ接合体では 3～5 時間にかけて前値に比し 30～37 % 増加し、結果として VWF 抗原/ADAMTS13 活性比は、正常ホモ接合体ではほとんど変化なかったのに対し、ヘテロ接合体では前値に比し 55 %～79 % の上昇がみられた⁶⁴⁾。以上より、健常人においてエタノール中等量～多量摂取後の血漿 ADAMTS13 活性低下の程度には個人差があり、変異遺伝子 ALDH2*2 を持つヘテロ接合体は、正常ホモ接合体に比し、本酵素活性は飲酒後、より高度に低下することが明らかとなった。

アルコール性肝障害では禁酒後、脳血栓症、肺塞栓症、下肢静脈血栓症を発症する頻度が高く^{65)～67)}、若年のアルコール依存症の剖検例において脳血栓合併が多いこと⁶⁸⁾から、長期間に亘るアルコール過剰摂取が易血栓形成状態を惹起する可能性が指摘されている。最近、変異遺伝子 ALDH2*2 を持つ飲酒家は心筋梗塞のリスク因子になること^{69), 70)}、ラット心筋虚血モデルでは変異遺伝子 ALDH2*2 の酵素活性の程度が虚血による心筋傷害の程度と関連し、ALDH2*2 酵素活性を上昇させると、虚血心筋傷害が軽減されることが報告され、ALDH2*2 酵素活性が虚血による心筋傷害の保護作用の役目を担っていることが明らかにされた⁷¹⁾。飲酒後の血漿 ADAMTS13 活性低下が、変異遺伝子 ALDH2*2 を持つヘテロ接合

体においてより高度であるという今回の成績⁶⁴⁾は、アルコール多量摂取時における血小板機能異常、微小循環障害の成因を解明する上で新たな知見をもたらす可能性がある。今後、アセトアルデヒド代謝と ADAMTS13 活性低下との関連を *in vivo* ならびに *in vitro* の系を用いてさらに検討していく必要がある。

7. アルコール性肝炎進展における ADAMTS13 とその関連因子の関与 (作業仮説)

慢性エタノール摂取時には腸管粘膜の透過性が増し、Et の吸収が亢進するとともに肝網内系機能が低下するために Et 血症が生じ易く^{1)～3), 6)～8)}、このような状態において、エタノールをさらに大量に過剰摂取すると著明な Et 血症が招来することが予想される。エタノール過剰摂取による高 Et 血症は炎症性サイトカイン誘導の trigger となり、肝類洞内皮細胞障害とともに SIRS を引き起こすが、AH、特に SAH では肝類洞ならびに全身諸臓器の微小循環障害が肝細胞障害と共に多臓器不全を惹起すると考えられている^{1)～8)} (図 6)。今回、我々の成績から、高 Et 血症、高サイトカイン血症ならびに ADAMTS13 に対するインヒビターの存在は、ADAMTS13 活性の低下と VWF 抗原の増加をもたらし、これら酵素・基質の著しい不均衡が微小循環障害に伴う肝細胞障害ならびに多臓器不全をもたらし、SAH の病態形成の一役を担っている可能性が想定される (図 6)。

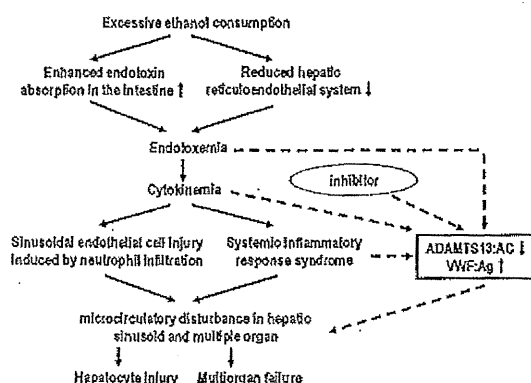


図 6 アルコール性肝炎進展における ADAMTS13 とその関連因子の関与 (作業仮説)

文 献

- 1) Mandayam S, Jamal MM & Morgan TR. Epidemiology of alcoholic liver disease. *Semin Liver Dis.* 24: pp. 217-232, 2004.
- 2) Nolan JP. The role of intestinal endotoxin in liver injury: a long and evolving history. *Hepatology.* 52: pp. 1829-1835, 2010.
- 3) Mandrekar P. & Szabo G. Signalling pathways in alcohol-induced liver inflammation. *J Hepatol.* 50: pp. 1258-1266, 2009.
- 4) Maddrey WC, Boitnott JK, Bedine MS, et al. Corticosteroid therapy of alcoholic hepatitis. *Gastroenterology.* 75: pp. 193-199, 1978.
- 5) McClain C, Barve S, Joshi-Barve S, et al. Dysregulated cytokine metabolism, altered hepatic methionine metabolism and proteasome dysfunction in alcoholic liver disease. *Alcohol Clin Exp Res.* 29: 180S-188S, 2005.
- 6) Bode C. & Bode JC. Activation of the innate immune system and alcoholic liver disease: effects of ethanol per se or enhanced intestinal translocation of bacterial toxins induced by ethanol? *Alcohol Clin Exp Res.* 29: 166S-171S, 2005.
- 7) 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: pp. 162-169, 1991.
- 8) Sakaguchi S, Takahashi S, Sasaki T, et al. Progression of alcoholic and non-alcoholic steatohepatitis: common metabolic aspects of innate immune system and oxidative stress. *Drug Metab Pharmacokinet.* 26: pp. 30-46, 2011.
- 9) Moake, JL. Thrombotic microangiopathies. *N Engl J Med.* 347: pp. 589-599, 2002.
- 10) Fujimura Y, Matsumoto M, Yagi H, et al. Von Willebrand factor-cleaving protease and Upshaw-Schulman syndrome. *Int J Hematol.* 75: pp. 25-34, 2002.
- 11) Dent JA, Berkowitz SD, Ware J, et al. Identification of a cleavage site directing the immunochemical detection of molecular abnormalities in type IIA von Willebrand factor. *Proc Natl Acad Sci USA.* 87: pp. 6306-6310, 1990.
- 12) Uemura M, Tatsumi K, Matsumoto M, et al. Localization of ADAMTS13 to the stellate cells of human liver. *Blood.* 106: pp. 922-924, 2005.
- 13) Mannucci PM, Canciani MT, Forz I, et al. Changes in health and disease of the metalloproteinase that cleaves von Willebrand factor. *Blood.* 98: pp. 2730-2735, 2001.
- 14) Yagita M, Uemura M, Nakamura T, et al. Development of ADAMTS13 inhibitor in a patient with hepatitis C virus-related liver cirrhosis causes thrombotic thrombocytopenic purpura. *J Hepatol.* 42: pp. 420-421, 2005.
- 15) Lisman T, Bongers TN, Adelmeijer J, et al. Elevated levels of von Willebrand Factor in cirrhosis support platelet adhesion despite reduced functional capacity. *Hepatology.* 44: pp. 53-61, 2006.
- 16) Feys HB, Canciani MT, Peyvandi F, et al. ADAMTS13 activity to antigen ratio in physiological and pathological conditions associated with an increased risk of thrombosis. *Br J Haematol.* 138: pp. 534-540, 2007.
- 17) Uemura M, Fujimura Y, Matsumoto M, et al. Comprehensive analysis of ADAMTS13 in patients with liver cirrhosis. *Thromb Haemost.* 99: pp. 1019-1029, 2008.
- 18) Uemura M, Fujimura Y, Ko S, et al. Determination of ADAMTS13 and Its Clinical Significance for ADAMTS13 Supplementation Therapy to Improve the Survival of Patients with Decompensated Liver Cirrhosis. *Int J Hepatol.* 2011; 2011: 759047. Epub 2011 Jul 18.
- 19) Uemura M, Fujimura Y, Ko, S, et al. Pivotal role of ADAMTS13 function in liver diseases. *Int J Hematol.* 91: pp. 20-29, 2010.
- 20) Takaya H, Uemura M, Fujimura Y, et al. ADAMTS13 activity may predict the cumulative survival of patients with liver cirrhosis in comparison with the Child-Turcotte-Pugh score and the Model for End-Stage Liver Disease score. *Hepatol Res.* 2012 Jan 31. doi: 10.1111/j.1872-034X.2011.00950.x. [Epub ahead of print]
- 21) Park YD, 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: pp. 789-794, 2002.
- 22) Matsumoto M, Kawa K, Uemura M, et al. Prophylactic fresh frozen plasma may prevent development of hepatic VOD after stem cell transplantation via ADAMTS13-mediated restoration of von Willebrand factor plasma levels. *Bone Marrow Transplant.* 40: pp. 251-259, 2007.

- 23) 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: pp. 859-869, 2006.
- 24) Kobayashi T, Wada H, Usui M, et al. Decreased ADAMTS13 levels in patients after living donor liver transplantation. *Thromb Res.* 124: pp. 541-545, 2009.
- 25) Okano E, Ko S, Kanehiro H, et al. ADAMTS13 activity decreases after hepatectomy, reflecting a postoperative liver dysfunction. *Hepatogastroenterology.* 57: pp. 316-320, 2010.
- 26) Ikeda H, Tateishi R, Enooku K, et al. Prediction of hepatocellular carcinoma development by plasma ADAMTS13 in chronic hepatitis B and C. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 20: pp. 2204-2211, 2011.
- 27) 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.
- 28) 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.* 31: 27S-35S, 2007.
- 29) Uemura M, Fujimura Y, Matsuyama T, et al. Potential role of ADAMTS13 in the progression of alcoholic hepatitis. *Curr Drug Abuse Rev.* 1: pp. 188-196, 2008.
- 30) Ishikawa M, Uemura M, Matsuyama T, et al. Potential role of enhanced cytokinemia and plasma inhibitor on the decreased activity of plasma ADAMTS13 in patients with alcoholic hepatitis: relationship to endotoxemia. *Alcohol Clin Exp Res.* 34: S25-S33, 2010.
- 31) Uemura M, Fujimura Y, Matsuyama T, et al. Crucial Role of ADAMTS13 Related to Endotoxemia and Subsequent Cytokinemia in the Progression of Alcoholic Hepatitis. In: *Trends in Alcoholic Liver Disease Research - Clinical and Scientific Aspects.* (Ed) by Shimizu I, InTech, Croatia, 2012, pp. 179-204.
- 32) Fujimura Y, Matsumoto M & Yagi H. *Thrombotic microangiopathy.* Springer, Tokyo, 2008, pp. 625-639.
- 33) Suzuki M, Murata M, Matsubara Y, et al. Detection of von Willebrand factor-cleaving protease (ADAMTS-13) in human platelets. *Biochem Biophys Res Commun.* 313: pp. 212-216, 2004.
- 34) Turner N, Nolasco L, Tao Z, et al. Human endothelial cells synthesize and release ADAMTS-13. *J Thromb Haemost.* 4: pp. 1396-1404, 2006.
- 35) Manea M, Kristoffersson A, Schneppenheim R, et al. Podocytes express ADAMTS13 in normal renal cortex and in patients with thrombotic thrombocytopenic purpura. *Br J Haematol.* 138: pp. 651-662, 2007.
- 36) Kume Y, Ikeda H, Inoue M, et al. Hepatic stellate cell damage may lead to decreased plasma ADAMTS13 activity in rats. *FEBS Lett.* 581: pp. 1631-1634, 2007.
- 37) 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: pp. 1578-1584, 1998.
- 38) Tsai HM. & Lian EC. Antibodies to von Willebrand factor-cleaving protease in acute thrombotic thrombocytopenic purpura. *N Engl J Med.* 339: pp. 1585-1594, 1998.
- 39) 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: pp. 100-106, 2004.
- 40) Cao WJ, Niiya M, Zheng XW, et al. Inflammatory cytokines inhibit ADAMTS13 synthesis in hepatic stellate cells and endothelial cells. *J Thromb Haemost.* 6: pp. 1233-1255, 2008.
- 41) Bockmeyer CL, Claus RA, Budde U, et al. Inflammation-associated ADAMTS13 deficiency promotes formation of ultra-large von Willebrand factor. *Haematologica.* 93: pp. 137-140, 2008.
- 42) Reiter RA, Varadi K, Turecek PL, et al. Change in ADAMTS13 (von-Willebrand- factor-cleaving protease) activity after induced release of von Willebrand factor during acute systemic inflammation. *Thromb Haemost.* 93: pp. 554-558, 2005.
- 43) Kinoshita S, Yoshioka A, Park YD, et al. Upshaw-Schulman syndrome revisited: a concept of congenital thrombotic thrombocytopenic purpura. *Int J Hematol.* 74: pp. 101-108, 2001.
- 44) Kokame K, Nobe Y, Kokubo Y, et al. FRET-S-VWF73, a first fluorogenic substrate for ADAMTS13 assay. *Br J Haematol.* 129: pp. 93-100, 2005.
- 45) Kato S, Matsumoto M, Matsuyama T et al. Novel monoclonal antibody-based enzyme immunoassay for determining plasma levels of ADAMTS13 activity. *Transfusion.* 46: pp. 1444-1452, 2006.
- 46) Kasper CK, Aledort L, Aronson D, et al. A more uniform measurement of factor VIII inhibitors. *Thromb Diath Haemorrh.* 34: p. 612, 1975.
- 47) French SW, Benson NC, Sun PS. Centrilobular liver necrosis induced by hypoxia in chronic ethanol-fed

- rats. *Hepatology*. 4: pp. 912-917, 1984.
- 48) Oshita M, Takei Y, Kawano S, et al. Roles of endothelin-1 and nitric oxide in the mechanism for ethanol-induced vasoconstriction in rat liver. *J Clin Invest* 91: pp. 1337-1342, 1993.
- 49) Itatsu T, Oide H, Watanabe S, et al. Alcohol stimulates the expression of L-type voltage-operated Ca^{2+} channels in hepatic stellate cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 251: pp. 533-537, 1988.
- 50) Urashima S, Tsutsumi M, Nakase K, et al. Studies on capillarization of the hepatic sinusoids in alcoholic liver disease. *Alcohol Alcohol*. 28: pp. 77-84, 1993.
- 51) Mak KM & Lieber CS. Alterations in endothelial fenestrations in liver sinusoids of baboons fed alcohol: a scanning electron microscopic study. *Hepatology*. 4: pp. 386-491, 1984.
- 52) Goodman ZD & Ishak KG. Occlusive venous lesions in alcoholic liver disease. A study of 200 cases. *Gastroenterology* 83: pp. 786-796, 1982.
- 53) Kishi M, Maeyama S, Iwaba A, et al. Hepatic veno-occlusive lesions and other histopathological changes of the liver in severe alcoholic hepatitis--a comparative clinicohistopathological study of autopsy cases. *Alcohol Clin Exp Res*. 24: 74S-80S, 2000.
- 54) 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*. 18: pp. 97-103, 1993.
- 55) 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: pp. 1182-1187, 2003.
- 56) 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.
- 57) Kitano K, Gibo Y, Kamijo 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, Aug; 91 (8 Suppl): ECR34.
- 58) Matsumoto M, Yagi H, Ishizashi H, et al. The Japanese experience with thrombotic thrombocytopenic purpura-hemolytic uremic syndrome. *Semin Hematol*. 41: pp. 68-74, 2004.
- 59) Lieber CS. Metabolic effects of ethanol and its interaction with other drugs, hepatotoxic agents, vitamins and carcinogens: A 1988 update. *Semin Liver Dis*. 8: pp. 47-68, 1988.
- 60) Harada S, Misawa S, Agarwal DP, et al. Liver alcohol dehydrogenase and aldehyde dehydrogenase in the Japanese: Isozyme variation and its possible role in alcohol consumption. *Am J Hum Genet*. 32: pp. 8-15, 1980.
- 61) Takase S, Takada A, Yasuhara M, et al. Hepatic aldehyde dehydrogenase activity in liver diseases, with particular emphasis on alcoholic liver disease. *Hepatology*. 9: pp. 704-709, 1989.
- 62) Enomoto N, Takada A, Date T. Genotyping of the aldehyde dehydrogenase 2 (ALDH2) gene using the polymerase chain reaction: Evidence for single point mutation in the ALDH2 gene of ALDH2-deficiency. *Gastroenterol Japonica*. 26: pp. 440-447, 1991.
- 63) Enomoto N, Takase S, Takada N, et al. Alcoholic liver disease in heterozygotes of mutant and normal aldehyde dehydrogenase-2 gene. *Hepatology*. 13: pp. 1071-1076, 1991.
- 64) Matsuyama T, Uemura M, Takaya H, et al. Decreased plasma ADAMTS13 activity during moderate to much consumption of ethanol in healthy volunteers: Differences between normal and heterozygous mutant aldehyde dehydrogenase-2 Alleles. *Hepatol Res*. 2012, (in press).
- 65) Haselager EM & Vreeken J. Rebound thrombocytosis after alcohol abuse: A possible factor in the pathogenesis of thromboembolic disease. *Lancet* ii: pp. 774-775, 1977.
- 66) Lee K. Alcoholism and cerebrovascular thrombosis in the young. *Acta Neurol Scand*. 59: pp. 270-274, 1979.
- 67) Hillbom K & Kaste M. Ethanol intoxication: A risk factor for ischemic brain infarction in adolescents and young adults. *Stroke*. 12: pp. 422-425, 1981.
- 68) Walbran BB, Nelson JS, Taylor JR. Association of cerebral infarction and chronic alcoholism: An autopsy study. *Alcohol Clin Exp Res*. 5: pp. 531-535, 1981.
- 69) Takagi S, Iwai N, Yamauchi R, et al. Aldehyde dehydrogenase 2 gene is a risk factor for myocardial infarction in Japanese men. *Hypertens Res*. 25: pp. 677-681, 2002.
- 70) Jo SA, Kim EK, Park MH, et al. A Glu487Lys polymorphism in the gene for mitochondrial aldehyde dehydrogenase 2 is associated with myocardial infarction in elderly Korean men. *Clin Chim Acta*. 382: pp. 43-47, 2007.
- 71) Chen CH, Budas GR, Churchill EN, et al. Activation of aldehyde dehydrogenase-2 reduces ischemic damage to the heart. *Science* 321: pp. 1493-1495, 2008.

6. 肝不全における血漿エンドトキシン濃度と ADAMTS13 活性の動態

高谷 広章¹⁾, 植村 正人¹⁾, 藤本 正男¹⁾, 松山 友美¹⁾
森岡 千恵¹⁾, 石川 昌利¹⁾, 辻本 達寛¹⁾, 瓦谷 英人¹⁾
松本 雅則²⁾, 藤村 吉博²⁾, 福井 博¹⁾

¹⁾奈良県立医科大学第3内科, ²⁾同 輸血部

はじめに

エンドトキシン (ET) は, グラム陰性桿菌の細胞壁に存在するリポ多糖類 (lipopolysaccharide : LPS) である。敗血症を始めとする各種のグラム陰性桿菌感染症において, 感染巣から血液中に放出される他に, 肝疾患では, 腸管内グラム陰性桿菌の増殖, 腸管透過性亢進, Kupffer 細胞機能不全, 門脈・大循環シャントなどの複合因子により ET 血症が生じる¹⁾。1975 年, 肝毒性物質による障害肝の LPS に対する感受性の亢進が明らかにされて以来, 肝障害における小腸由来の ET の重要性が指摘されている¹⁾。急性・慢性肝不全では ET 血症が出現し, 炎症性サイトカイン血症, 血管内血液凝固症候群 (disseminated intravascular coagulation : DIC) を引き起こし, 肝障害の進展ならびに多臓器不全合併の原因となる可能性が指摘されている^{1,2)}。

一方, ADAMTS13 (A Disintegrin-like And Metalloproteinase domain, with Thrombospondin type-1 motif 13) は, 血管内皮細胞から放出される超高分子量 VWF multimer (UL-VWFM) を切断する亜鉛含有酵素であり^{3,4)}, 主に肝星細胞で産生される⁵⁾。ADAMTS13 は血栓性血小板減少性紫斑病 (thrombotic thrombocytopenic purpura : TTP)⁶⁾ の発症との関連で脚光を浴びているが, 最近肝障害時における ADAMTS13 の動態が, 肝障害の発症・進展ならびに多臓器不全合併との関連において注目されている⁷⁻¹²⁾。

本稿では, 急性・慢性肝不全における ET 血症

と ADAMTS13 活性の動態とその臨床的意義について概説する。

1. ADAMTS13 の作用機転

TTP は血管内皮細胞障害と血管内血小板凝集がその主因をなすと考えられるが, VWF に着目すると血管内皮細胞で産生され血中に放出された UL-VWFM は細小動脈内腔で高い応力を受けて伸展, 活性化し, 強い血小板凝集を引き起こす^{3,4)}。この伸展した UL-VWFM 上の A2 ドメインにある Tyr842-Met843 ペプチド結合を切断する酵素が ADAMTS13 である^{3,4)}。本酵素活性が著減すると UL-VWFM が切断されなくなるため, 血小板凝集が亢進し, 微小循環障害が惹起され, 最終的に TTP が招来すると考えられる^{3,4)} (図 1)。

2. 肝不全における向血栓状態

慢性および急性肝不全における凝固線溶系の異常については多くの研究がなされてきた^{13,14)}。慢性肝不全においては, 血小板減少, 凝固線溶系の異常, DIC の出現など, 凝固・線溶系の不均衡によって易出血性を呈する。一方で, 血栓が形成され易い状態にある^{13,14)}。事実, 肝硬変剖検例において多臓器に高率に血栓形成がみられたこと, 肝移植を受けた末期肝不全の肝静脈や門脈に高頻度に血栓形成が観察され, 肝硬変が進展するに従い門脈血栓が高頻度であることなど, 末期肝不全における hypercoagulability の存在が論じられている¹⁴⁾。急性肝不全においては, Rake らは劇症肝

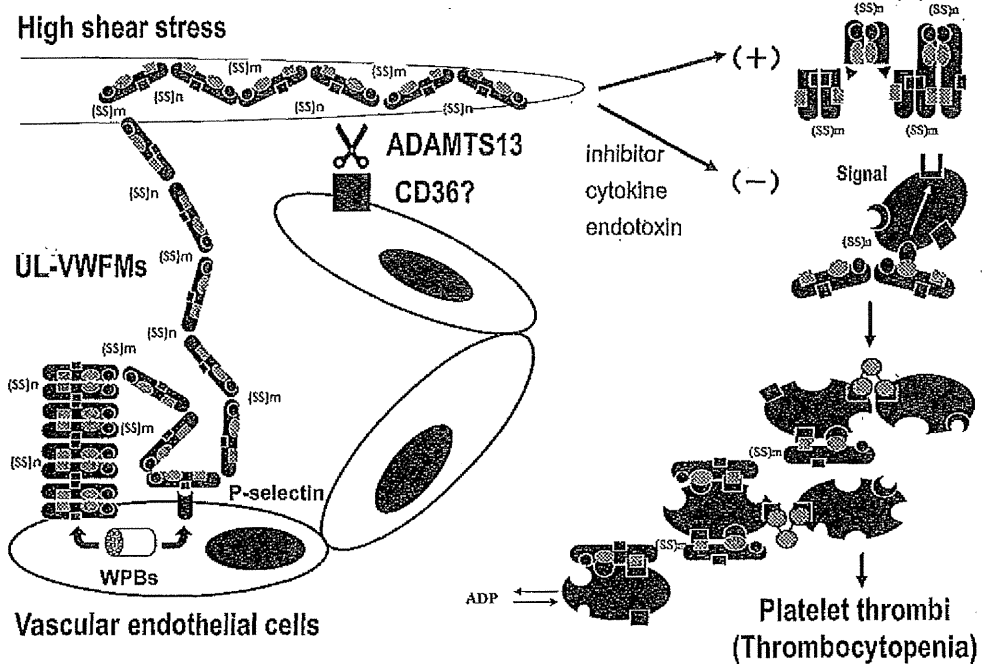


図 1

血管内皮細胞で産生され、血中に放出された UL-VWFM は細小動脈内腔で高いせん断力のため伸展構造へと変化をする。ADAMTS13 は UL-VWFM の Tyr (842 番目)-Met (843 番目) のペプチド結合を切断する。ADAMTS13 活性が著減すると、UL-VWFM は切断されず、血小板の GP I b 受容体と反応し細胞内シグナル伝達機構を通じて GP II b/III a 受容体の活性化を引き起こす。血小板活性化はさまざまな細胞内物質の放出と Ca^{2+} の細胞内への流入を引き起こす。中でも血小板内 ADP は微小循環下で自らの血小板のさらなる活性化を促し、より活性化された GP II b/III a 受容体に VWF が結合し、血小板の微小凝集塊を作る。血漿 ADAMTS13 活性を低下させる要因としては、過剰な VWF 抗原を処理するための ADAMTS13 の消費、肝星細胞からの産生障害の他に、ADAMTS13 に対する inhibitor、炎症性サイトカイン、エンドトキシンなどが考えられる (文献 4) を一部改変)。

炎の肝組織中に類洞内に fibrin 血栓の存在を証明し¹⁵⁾、藤原らは急性肝不全モデルを用いて類洞内凝固を提唱し¹⁶⁾、これが肝不全の増悪・進展に関与する可能性を指摘した。また、肝硬変、劇症肝炎においては、血中 VWF 抗原は著増し、組織学的に肝細胞壊死後に生じる線維化・瘢痕部に一致して VWF 抗原が強く表出される¹⁷⁾。障害肝の類洞内皮細胞において、ADAMTS13 の基質である VWF 抗原が過剰に産生され、肝星細胞が ADAMTS13 の主たる産生細胞であることが判明⁵⁾した現在、本酵素と基質の不均衡が障害肝における類洞内微小循環を調節する役目の一端を

担っている可能性が想定される。

3. 重症肝不全における血中エンドトキシン濃度と血漿 ADAMTS13 活性

3-1. 肝硬変

肝硬変では、肝予備能が低下するに従って血中 ET が上昇し、肝腎症候群、特発性細菌性腹膜炎、hyperdynamic state、サイトカイン血症、血管内皮細胞障害、凝固活性化と密に関連し、予後悪化因子の一つとして重要視されている^{1,2,18)}。

われわれも chromogenic substrate assay (Toxicolor LS-50M Kit)¹⁰⁾を用いて血漿 ET を測

定した結果、ETが10 pg/mL以上の例はChild Aの4%、Child Bの17%、Child Cの33%に認められ、肝障害が重篤になるに従いET濃度は上昇した。ADAMTS13活性は肝予備能が低下するに従い低値を示し、TTPに匹敵する著減例はChild Cの5例に観察され、うち1例はTTP合併C型肝炎硬変であった⁹⁾。さらに、血小板と最も反応性に富むUL-VWFMは腎障害・脳症発現例で高頻度に観察されたことから、進行した肝硬変は血小板血栓形成のpredisposing stateにあり、これら病態形成の一端を担っている可能性が示唆された⁹⁾。さらに、ET濃度が10 pg/mL以上の群はそれ以下の群に比し、ADAMTS13活性が低値、VWF/ADAMTS13比が高値であり、血清クレアチニン高値、Child score高値であったことから、肝硬変における高度なET血症は、ADAMTS13酵素・基質不均衡による腎機能障害との関連が示唆された。

3-2. アルコール性肝炎

アルコール性肝炎 (alcoholic hepatitis: AH)、とくに重症アルコール性肝炎 (severe alcoholic hepatitis: SAH) は、肝性脳症、肺炎、急性腎不全、消化管出血などの多臓器不全を合併する予後不良な疾患である。その成因として、肝網内系機能不全と腸管の透過性亢進に基づくET血症が、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)、微小循環障害に基づく多臓器不全を惹起すると考えられている^{1,2,18)}。

われわれはAH、とくにSAHにおいて、ADAMTS13活性の著減⁹⁾、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に伴う多臓器不全発症に関与する可能性を指摘した^{7,9,10)}。一方、血漿ETは入院時AHでは健常人の約2倍、SAHでは約5倍上昇し、生存例回復期にはETは低下したが、SAHの死亡例1例では末期にさらに上昇した¹⁰⁾。血中のETは血漿ADAMTS13活性と負の相関、VWF抗原と正の相関関係にあり、UL-VWFM陽性群は陰性群に比してさらに高値を示した¹⁰⁾。これらの結果は、AHにおける

高度なET血症は、血漿ADAMTS13活性の低下、VWF抗原の増加ならびにUL-VWFMの出現と密に関連することを示唆している。

3-3. 急性肝不全

急性肝不全の大部分を占める劇症肝炎は、初発症状出現から8週以内にプロトロンビン時間が40%以下に低下し、昏睡Ⅱ度以上の肝性脳症を生じる肝炎である。昏睡出現までの期間が10日以内を急性型、10日以上を亜急性型とするが、亜急性型の予後は不良である。本症はSIRSの病態を示すことがまれではなく、感染、消化管出血、腎不全、DICなどが25~50%に併発し、多臓器不全を呈する症例も多い¹⁹⁾。血中ETは、入院時、急性肝炎では1例を除き正常範囲にあったが、急性肝不全では健常人に比し約4倍高値を示した。血漿ADAMTS13活性は、健常人100%に比し、急性肝炎68%、急性肝不全23%と急性肝不全で著明な低下を示した。VWF抗原は、健常人100%に比し、急性肝炎237%、急性肝不全659%と急性肝不全で著増した。この際、血漿ET濃度が20 pg/mL以上の群は以下の群に比して、血漿ADAMTS13活性は低値であり、血漿ET濃度はVWF抗原と正の相関関係にあった。以上より、急性肝不全において高度のET血症はADAMTS13活性の低下ならびにVWF抗原の著増をもたらし、AHFの多臓器不全の進展に関与している可能性が示唆された。

4. 肝不全におけるADAMTS13低下の機序

肝不全におけるADAMTS13活性低下の機序としては、過剰なVWF抗原を処理するためのADAMTS13の消費、肝星細胞からの産生障害あるいは本酵素に対するインヒビターの存在などが考えられる⁷⁾。ADAMTS13に対するインヒビターは、肝硬変では57%に検出され、その際の力価は2例を除き、0.5~1.0 BU/mLと比較的低値であった⁸⁾。ADAMTS13に対するIgG自己抗体は、ADAMTS13活性高度低下 (<3%) の5例にのみ検出され、この際、TTPを合併した例 (1例) とTTPの臨床徴候を呈しなかった例 (4例) を;