

---

# 総 説

---

## ADAMTS13 解析による TTP/HUS 診断

奈良県立医科大学輸血部

松本雅則, 石指宏通, 八木秀男, 藤村吉博

### ANALYSIS OF ADAMTS13 IN PATIENTS WITH TTP/HUS

MASANORI MASTUMOTO, HIROMICHI ISHIZASHI,

HIDEO YAGI and YOSHIHIRO FUJIMURA

*Department of Blood Transfusion Medicine*

*Nara Medical University*

Received December 28, 2005

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

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

### はじめに

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

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

### 血栓の形成機序と VWF

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

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

VWF は、前述のごとく、一次血栓である血小板血栓の形成に重要な働きをしているとともに、二次血栓にも関連する 2 つの機能を持った血漿糖蛋白質である<sup>1)</sup>。1 つは、障害血管壁において血小板を粘着させ、血小板血栓形成を促す分子糊としての一次血栓の機能である。もう 1 つは、キャリア蛋白質として、血液凝固第 VIII 因子と循環血漿中で結合して VIII/VWF 複合体を形成し、VIII 因子を保護するという二次血栓の役割も担っている。また、最近の研究で、生体内での VWF の機能は、ずり応力によって調節されていることが明らかとなった<sup>2)</sup>。血管内での血流速度は、血管中央で最大で、血管壁では摩擦により遅くなるため、速度勾配が生じる。この速度勾配のため、物体を歪ませようとする力、すなわち“ずり応力 (shear stress)”が働く。ずり応力は流速に比例するため、流れの遅い静脈では低いずり応力が、流れの早い動脈では高いずり応力が働くことになる。心筋梗塞などの重篤な血栓症は動脈血栓であるので、高ずり応力下の血小板凝集のメカニズムが重要であることが予想される。高ずり応力下の血小板凝集では、まず VWF が、血管内皮細胞下組織のコラーゲンと結合して固相化され、活性型となる。そして、活性型 VWF は、A1 ドメインを介して血小板膜蛋白 (GP)Ib と結合する。血小板は、血流のトルクにより VWF 上を回転し、結合と解離を繰り返す。これによって GPIb からのシグナル伝達が起こり、血小板  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 が活性化され、これに VWF C1 ドメインが結合する。これによって、血小板血栓が形成されると考えられている。

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

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

### ADAMTS13

UL-VWFM 依存性の血小板血栓形成を防止するために、VWF マルチマーサイズを減少させる働きをするのが、VWF 切断酵素 (VWF-cleaving protease: VWF-CP) であり、最近では ADAMTS13 と呼ばれている。ADAMTS13 は亜鉛型のメタロプロテアーゼで、その作用の発現には、Ba<sup>2+</sup> や Ca<sup>2+</sup> などの二価の陽イオンが必要である<sup>5)</sup>。本酵素をコードする遺伝子は染色体の 9q34 に存在し、cDNA は 29exon より構成されている。ヌクレオチドの全長は 4281bp で、1427 アミノ酸残基よりなる 1 本鎖糖蛋白質である。Northern blot で ADAMTS13 の mRNA を探索すると、その約 4.7kb のメッセージは肝臓で最も強く発現していたが、肝臓のどの細胞で産生されているかについては長い間不明であった。2005 年に共同研究者の Uemura ら<sup>6)</sup> は、抗 ADAMTS13 マウスモノクローナル抗体による免疫染色と in situ hybridization にて肝星細胞 (旧名 伊東細胞) が ADAMTS13 の主たる産生細胞である事を明らかにした。また、ADAMTS13 は、図 1 に示すように様々なドメインをもつマルチドメイン構造から成り立っている。そこで、共同研究者の Soejima ら<sup>7)</sup> は、このドメイン構造の機能を検討するため、C 末端からドメインを順に欠損させた変異体を 11 種類作成し、

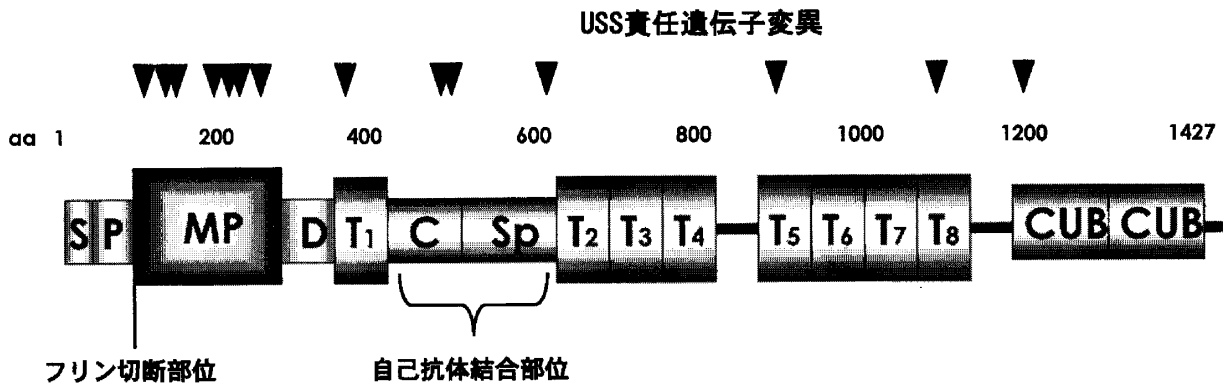


図1. ADAMTS13 のドメイン構造

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

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

D: ディスインテグリン様ドメイン C: システインリッチドメイン

Sp: スペーサードメイン T: TSP1 モチーフ

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

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

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

### TTP/HUS と ADAMTS13

1924 年に米国の Moschowitz<sup>8)</sup>によって初めて報告された TTP は、①血小板減少、②細血管障害性溶血性貧血(microangiopathic hemolytic anemia: MAHA)、③腎機能障害、④発熱、⑤動揺性精神神経障害のいわゆる古典的 5 徴候からなる重篤な疾患である。一方、これによく似た症状を示す HUS は、前記の①~③の 3 徴候からなる疾患で 1955 年にドイツの Gasser ら<sup>9)</sup>により報告された。TTP は極めて稀な成人に発生する疾患、HUS は

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

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

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

1996 年から 1998 年にかけてスイスの Furlan ら<sup>12)</sup>、そ

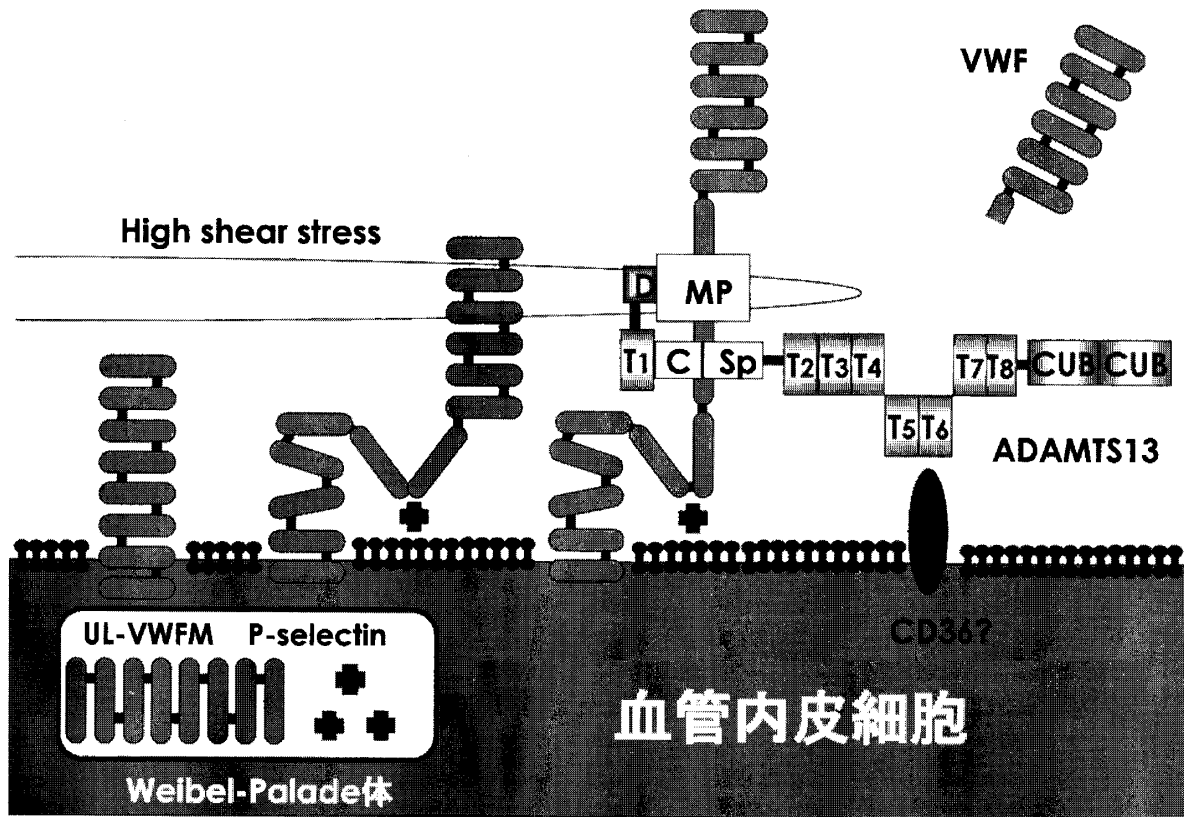


図2. ADAMTS13によるUL-VWFMの切断

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

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

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

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

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

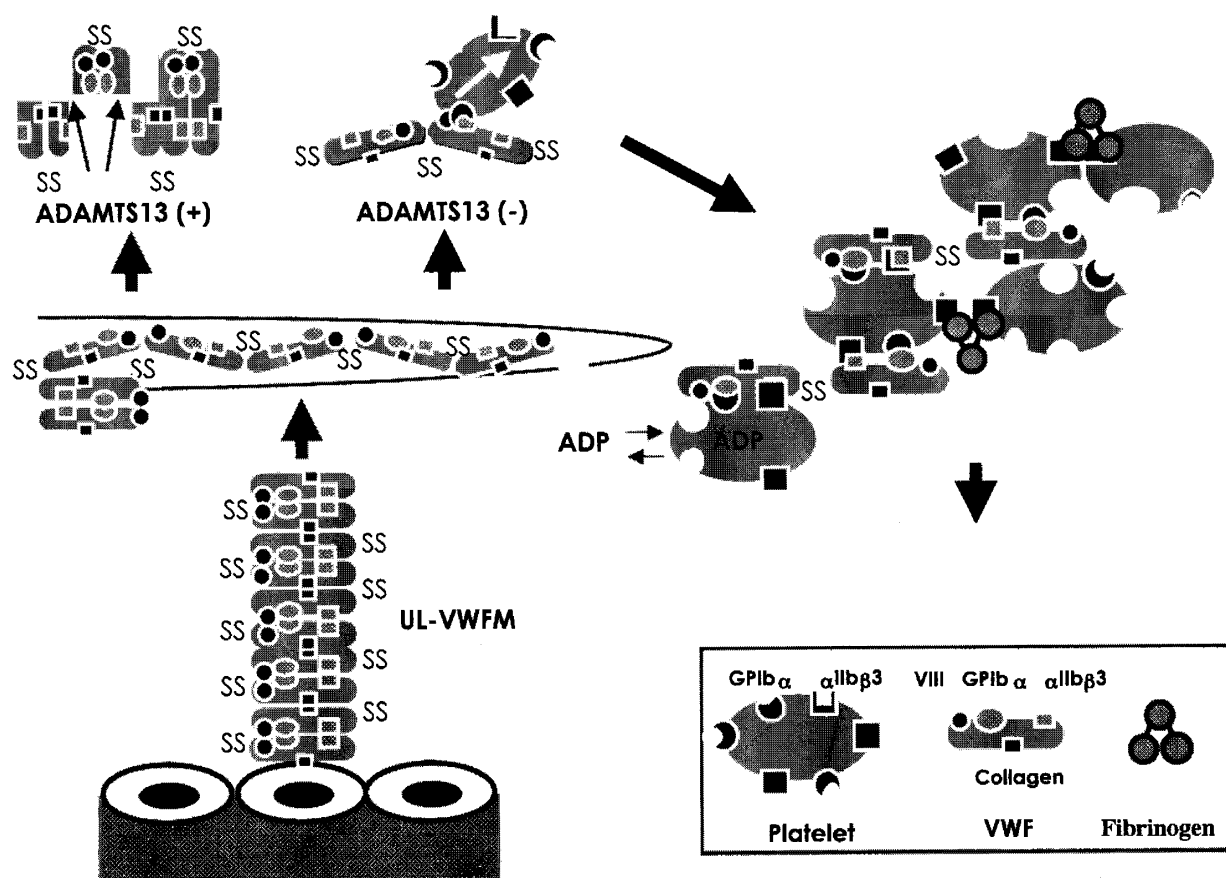


図3. ADAMTS13 活性欠損時における血小板血栓形成機構

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

### TMA の臨床

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

#### 先天性 TTP

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

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

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

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

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

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

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

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

#### 後天性 TTP

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

1) 特発性: 188 例中 112 例 (60%) が ADAMTS13 活性 <3% と著減し, これらの症例では同酵素に対する IgG 型の自己抗体 (インヒビター) が陽性であった. 特発性 TTP の半数以上が ADAMTS13 に対する自己抗体陽性である事から, 「特発性 TTP の多くは自己免疫疾患」である事が判明した. 文献的には稀にインヒビター活性を持たない IgM 型の自己抗体陽性例も報告されているが, 我々の症例では未発見である. また, ADAMTS13 活性と予後との関連を調べたところ, 同酵素活性が著減している症例の方が, 軽度から中等度の低下を認める症例よりも, 血漿交換やステロイドによる治療に反応し予後が良いことが判明した<sup>22)</sup>.

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

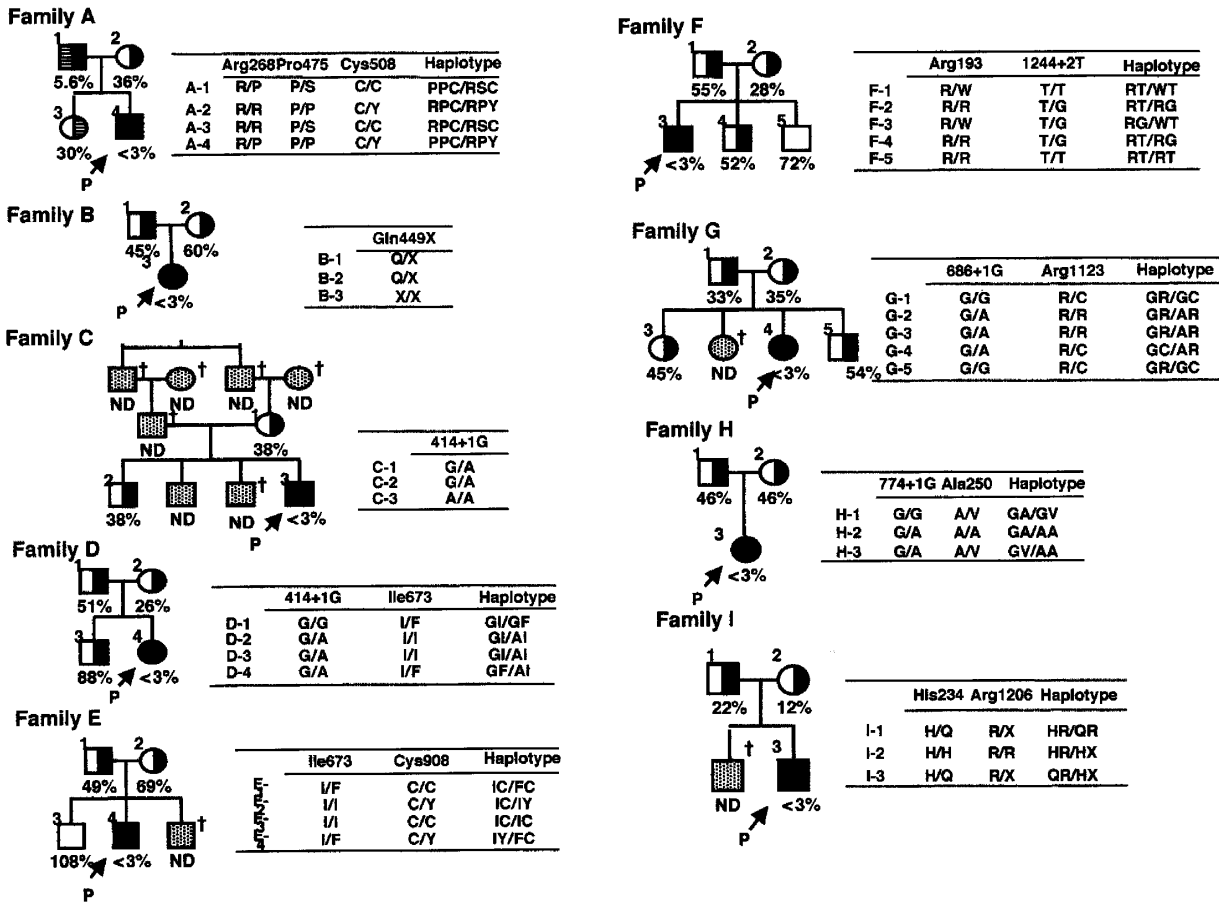


図4. 本邦 USS9 家系 9 症例の家系図と ADAMTS13 遺伝子解析(文献 18-21)

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

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

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

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

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

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

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

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

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

#### 先天性 HUS

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

#### 後天性 HUS

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

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

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

エノピリジン誘導体とは全く異なった機序での発症と考えられ、大変興味深い。

### 今後の ADAMTS13 研究の課題

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

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



## 最 後 に

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

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

## 文 献

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

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