

高ずり応力が引き起こす後天性フォンウィルブランド症候群 の簡易診断法の開発

[1] 組織

代表者：菅原 新吾
(東北大学病院診療技術部検査部門)
対応者：堀内 久徳
(東北大学加齢医学研究所)
分担者：藤巻 慎一
(東北大学病院診療技術部検査部門)
大久保 礼由
(東北大学病院診療技術部検査部門)

研究費：消耗品その他 13 万円

[2] 研究経過

高齢者に多い大動脈弁狭窄症 (AS) や人工心臓などではフォンウィルブランド因子 (VWF) 高分子多量体の欠損・減少を来し、後天性フォンウィルブランド症候群 (AVWS) となる。AVWS の診断は、これまでのところウェスタンブロットを用いた VWF 多量体解析がゴールドスタンダードとして行われてきたが、技術的に高度であり、我が国でも限られた施設でのみ行われている。一方、VWF 高分子多量体が欠損する遺伝性フォンウィルブランド病 2A 型の診断には VWF リストセチンコファクター活性 (VWF:Rco) と VWF 抗原量 (VWF:Ag) の比 (VWFRCo/Ag raito) が 0.6 または 0.7 未満が診断を支持する値として使用される。しかし、高ずり応力が引き起こす AVWS の診断には用いられていない。VWF:RCo および VWF:Ag は臨床検査室で用いる測定機器で自動計測可能である。本研究では、VWFRCo/Ag raito が AVWS の診断に有用かを評価し、AVWS の簡易検査法として確立することを目的とした。以下、研究活動状況の概要を記す。

2020 年 4 月に東北大学加齢学研究所、堀内研究室にて研究打ち合わせを実施し、東北大学病院検査部にてサンプル処理、VWF:Ag と VWF:Rco の測定を行い、堀内研究室で VWF large multimer index (VWF LMI) の解析を行うこととし、2021 年 3 月まで前回の研究を実施した。2021 年 4 月に堀内研究室にて研究打ち合わせを実施し、前回と同様の分担で行うことに決定

した。前回までの研究で、正常血漿をボルテックスミキサーの攪拌で VWF 高分子多量体を段階的に分解できることを確認した。また VWF:Ag が 200% を超える高値域では通常測定モードで偽低値を示す場合があり、希釈測定モードで回避できることが明らかとなった。AS 患者の VWF:Ag は 200% 以上を示すことが多く、VWF:Ag の偽低値を回避する必要がある。また、200% 以上の測定レンジ上限を超える場合は希釈測定を再度実施する必要がある、AS 患者においては希釈再測定する頻度が高く、時間とコストを要する。今回、新たにキャリブレータを 2 倍希釈して検量線を作成し、測定レンジを延長させた改良測定モードの開発を試み、通常測定モードと比較した。

まず、測定レンジ延長のため、キャリブレーションの改良を試みた。通常は VWF:Ag 100% 程度のキャリブレータを上限 2 倍濃度で測定し検量線の値を得る。それによる VWF:Ag 測定上限は 200 数十% 程度となり、それを超える場合は希釈再測定となる。改良キャリブレーションは、キャリブレータを 2 倍希釈し、上限濃度を 4 倍にすることで測定レンジを 400% 程度に延長させるものである。しかし、測定装置の設定上 4 倍濃度の測定が現状できないということが判明し、メーカー開発部に 4 倍濃度の設定ができるように依頼し回答待ちである。そのため今回の検討は、新たな改良測定モードが通常希釈測定モードと同等の結果が得られるか確認することとした。

前回と同様にコンファクト F を 15 倍、20 倍、30 倍、40 倍、50 倍、100 倍に希釈し、VWF:Ag を正常域から高値域まで調整した。さらにボルテックスミキサーの攪拌で VWF 高分子多量体を段階的に分解させ、VWF:Ag、VWF:Rco を測定した。残サンプルを VWF LMI の解析用に -80°C で凍結保存し、堀内研究室に VWF LMI の解析を依頼した。

[3] 成果

(3-1) 研究成果

本年度は、以下に示す研究成果を得た。

まず第 1 に、ボルテックスミキサーで攪拌することで高分子多量体を分解できることが前回の研究で明らかとなったが、攪拌スピードにより分解度合いを調整できることが判明した。前回は攪拌 20 分から

VWF:Rco%の低下が見られたが、今回は前回より攪拌スピードを上げた結果、攪拌5分から低下が見られた(図1)。また、VWF:Agでも攪拌時間を長くすることで低下が見られ、攪拌20分から明らかに低下した(図2)。攪拌スピードと攪拌時間を調整することで、さまざまなサンプルを調整できることが示唆された。

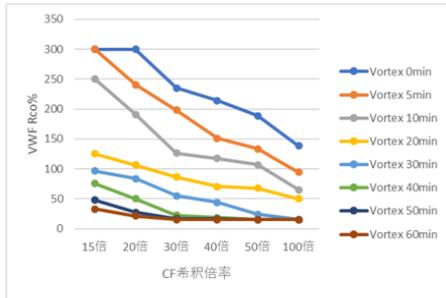


図1. ボルテックスミキサー攪拌時間によるVWF:Rco%の比較

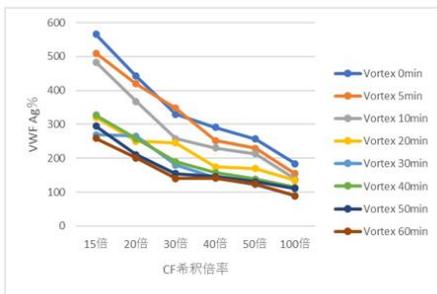


図2. ボルテックスミキサー攪拌時間によるVWF:Ag%の比較

第2に、通常希釈測定モードと改良測定モードを比較した結果、両測定モードでVWF:Agに有意差がないことが確認された(図3)。高分子多量体を分解した各攪拌時間でも両測定モードで明らかな差は見られなかった(図4)。以上の結果から、改良測定モードは、通常希釈測定モードと同等に使用できると考えられる。今回、改良測定モードのキャリブレーション上限は、通常測定モードのキャリブレーション濃度1倍に相当する。通常測定モードは2倍濃度が上限であることから、改良測定モードでは4倍相当までキャリブレーション可能であり、測定レンジを400%まで延長できる可能性が示唆された。これが装置上で可能であるかはメーカー開発部の回答を待ちたい。

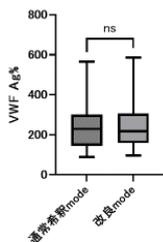


図3. 通常希釈測定モードと改良測定モードのVWF:Agの比較

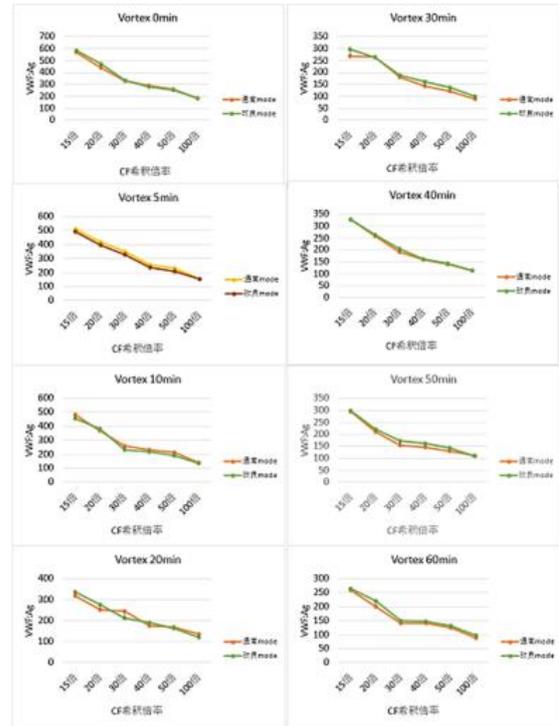


図4. 攪拌時間ごとの通常希釈測定モードと改良測定モードの比較

(3-2) 波及効果と発展性など

これまで循環器疾患に伴うAVWSの実態解明を目的とする前向き臨床研究(The AVeC Study)として大動脈弁狭窄症患者500例を対象にVWF多量体解析を行うとともに、VWF:RCoおよびVWF:Agを測定してきたが、VWF:LMIが明らかに低下していてもVWF:RCo/Ag ratioが0.7以上と低下していない症例が多かった。この要因の1つとしてVWF:Ag高値域での偽低値や測定値のばらつきを考えている。これまでの研究においてVWF:Agが200%を超える高値域ではVWF:Agが偽低値になることがあり、それが希釈測定により回避できた。VWF:Agの通常モードの測定レンジ上限は200数十%までであり、300%に近いサンプルの測定ではVWF:RCo/Ag ratioが偽高値になる可能性がある。このことから、AS患者のようなVWF抗原量が高値である患者用として高値域を対象とする測定モードが必要である。本研究の改良測定モードは、希釈測定をベースとして、高値域の安定性を保ちつつ、測定レンジを400%ほどに延長できる。VWF:Ag高値のAS患者で希釈再検の頻度を減らし、VWF:RCo/Ag ratioの精度向上が期待できる。

[4] 成果資料
なし