

課題番号 80

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：物件費 15 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・減少を来とし、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た。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た。

同 4 月、ボルテックスミキサーを使用し VWF 高分子多量体を段階的に分解できるか確認した。血液凝固

試験用標準ヒト血漿 (SHP) をボルテックスミキサーで高ずり応力を様々な時間 (0-60 分) かけた血漿を作製した。VWF:Ag と VWF:Rco の測定および VWF LMI の解析を行い、VWFRCo/Ag raito と VWF LMI が低下することを確認した。SHP の VWF:Ag は 100% 前後であるのに対し AS 患者の VWF:Ag は 200% 以上を示すことが多く、VWF:Ag の高濃度域の測定では測定試薬の VWF に対する感受性の低下が示唆された。そのため高濃度域の反応性を確認するため、本研究では、VWF を含む乾燥濃縮人血液凝固第 VIII 因子コンファクト F 注射用 250 (CF) を使用することとした。

2020 年 5 月、CF の VWF 高分子多量体を分解したサンプルの作製と VWF:Ag と VWF:Rco の測定を行った。CF を VWF:Ag が 600%, 500%, 400%, 300%, 200%, 100% 相当になるように SHP で希釈した。各抗原量に調整した CF をボルテックスミキサーで高ずり応力を 0,3,5,6,9,10,12,15,18,20,30,40,50,60 分かけて VWF 高分子多量体を分解させた血漿を作製した。VWF:Ag と VWF:Rco の測定を通常モード、1/2 希釈モード、1/3 希釈モードで行い、残サンプルを VWF LMI の解析用に -80℃ で凍結保存した。VWF:Ag600%, 500%, 400%, 300% において、通常モードと希釈モードで差があることが確認された。

2020 年 6 月～10 月は、検査部での COVID-19 の PCR 検査対応のため、研究を中断。

2020 年 11 月、堀内研究室に VWF LMI の解析を依頼した。

2021 年 1 月、VWF LMI の解析が完了。

2021 年 2 月、解析した LMI が全体的に低値であったため、堀内研究室に残サンプルで再解析を依頼。現在、再解析を実施中。

[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、血漿にボルテックスミキサーで時間を調整して高ずり応力をかけることにより、段階的に VWF 高分子多量体を分解できることが明らかとなった。

第 2 に、VWF:Ag が 200% を超える高値域では通常

測定モードと希釈測定モードでは差があることが明らかとなった。VWF:Agは15分程度までは高ずり応力による低下はみられず、長時間かけることにより低下した(図1)。またVWF:Ag600%、500%、400%、300%相当に調整したサンプルでは、通常測定モードの場合に偽低値傾向を示した。VWF:RCoは3-5分程度で低下した(図2)。VWF:Agが200%を超える高値域では通常、測定モードの場合にVWF RCo/Ag raitoは偽高値傾向を示した。それについては1/2希釈測定モードで回避できることが明らかとなった(図3)。VWF LMIの再解析結果が出たのちに、出血の危険性が増す可能性のあるVWF LMI60%以下とVWF RCo/Ag raitoを比較し、cut offを検討するとともにVWF抗原量高値域の影響を確認する。



図1) 高ずり応力をかけたサンプルの各VWF抗原量の測定モードによる比較

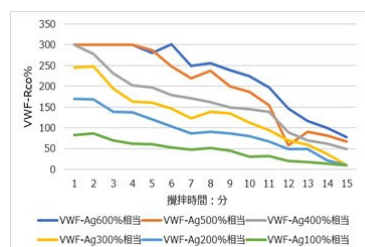


図2) 高ずり応力をかけたサンプルの各VWF抗原量におけるVWF:RCo%

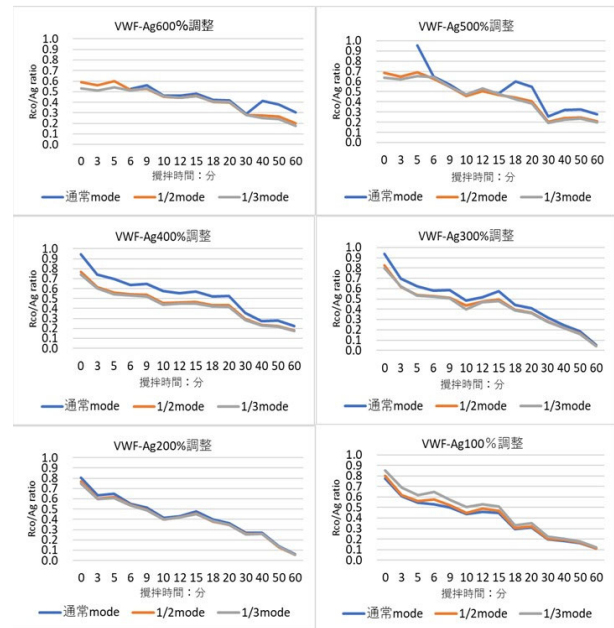


図3) 高ずり応力をかけたサンプルの各VWF抗原量におけるVWF:Rco/VWF:Ag ratioの測定モードによる比較

(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 raitoが0.7以上と低下していない症例が多かった。本研究においてVWF:Agが200%を超える高値域ではVWF:Agが偽低値となり、それが希釈測定により回避できることが確認できた。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 raito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。本研究の結果から、希釈測定を基本とした検量線作成と高値測定モードの新たな開発によりVWF RCo/Ag raitoの精度向上が期待できる。

[4] 成果資料
なし