〈原 著〉

高齢者高血圧における内皮細胞傷害の規定因子 —血中 von Willebrand factor による検討—

荏尾 七臣^{1)~3)} 星出 聡¹⁾ 松尾 武文⁴⁾ 島田 和幸¹⁾

〈要 約〉 血中 vWF は内皮細胞傷害マーカーとして広く用いられている。今回、我々は、最近開発された vWF に対するモノクローナル抗体を用いた Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) を用いて血中 vWF を測定し、高齢者高血圧における内皮細胞障害の規定因子を検討した。血中 vWF レベルは正常血圧者において、若年者 (39名) に比し高齢者 (42名) で著明な増加を認め (127 vs 88%, $p<.0001$)、高血圧高齢者 (68名) では更に増加した (148%, $p<.05$ vs 正常血圧高齢者)。若年正常血圧群においては、body mass index が ($r=0.41, p<.01$)、高齢者正常血圧群においては収縮期血圧レベルが ($r=0.41, p<.01$)、高齢者高血圧群においては年齢 ($r=0.44, p<.001$) とフィブリノーゲンレベル ($r=0.37, p<.01$) がそれぞれ血中 vWF レベルと有意な正相関を認めた。また、血中 vWF レベルは診察室収縮期血圧レベル ($r=0.33, p<.0001$) と24時間平均収縮期血圧 ($r=0.41, p<.0001$) とともに有意の正相関を認め、特に後者との相関がより強かった。高齢者において内皮細胞傷害は収縮期血圧の増加にて促進され、高血圧群ではフィブリノーゲンとも相関している。高齢者高血圧にみられる血中 vWF レベルの増加は、血小板凝集・粘着を促進し血栓傾向を示すと考えられる。

Key words : フォンビルブランド因子, 高齢者, 高血圧, 24時間血圧モニターリング, 内皮細胞傷害

(日老医誌 2000; 37: 393—397)

緒 言

加齢は心筋梗塞や脳卒中をはじめとする動脈血栓症の最大の危険因子である。血栓症発症は、血流速度、液性因子および血管状態の3因子により主に決定されるが、加齢は、血液粘度の上昇により微小循環血流の低下、血小板機能亢進、凝固亢進状態、線溶系低下状態などの液性因子異常および動脈硬化の進行に基づく血管傷害の3因子すべてを増悪させる¹⁾。すなわち、高齢者ではストレスなど何らかの誘因が加わった場合、容易に血栓症に至る血栓準備状態にあるといえる。

また、高血圧は加齢による血管傷害を促進する。血管内皮細胞傷害のみならず、血管自体の硬度を増加させ、さらに高齢者の収縮期高血圧を促進し、拡張期血圧を低下させ脈圧を増加させる。高血圧および脈圧の増加は収縮期の血流増加による血管内皮へのシェアストレスを増加させ、内皮細胞傷害をさらに促進する。

これまでのところ、内皮細胞傷害の確定検査法はない

が²⁾、近年、内皮細胞由来の分子マーカーが流血中で測定可能になり、内皮細胞傷害マーカーとして用いられ始めている^{3,4)}。vWF は血管内皮細胞および骨髄巨核球内で産生される巨大分子糖蛋白で、その重要な機能は一次止血機構において血小板と傷害血管内皮下組織との橋渡しをすることにある。血漿中 vWF の75~85%は血管内皮細胞由来で、血管内皮細胞内の Weibel-Palade 体で貯蔵され、血中に分泌される。iv vitro でも、in vivo でも vWF レベルの増加が内皮細胞刺激・傷害程度と平行する。血中 vWF レベルは ABO 血液型⁵⁾や炎症の影響を受けるが²⁾、再現性は比較的良好で (3年間の期間後のサンプルの再現性の検討では、相関係数が0.65—未発表データ)、内皮細胞傷害マーカーとして広く用いられている。今回、我々は、最近開発された vWF に対するモノクローナル抗体を用いた Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) を用いて血中 vWF を測定し、高齢者高血圧における内皮細胞傷害の規定因子を検討した。

対象と方法

対象：検診受診者の中から随時血圧レベルが140/90 mmHg 未満の55歳未満の若年者男性39名と65歳以上高齢者男性110名 (正常血圧者42名、高血圧者68名) を対象とした。また、2週間以上降圧剤を服用していない WHO ステージ I と II の高齢者高血圧者で、携帯型自動

1) K. Kario, S. Hoshida, K. Shimada: 自治医科大学循環器内科

2) K. Kario: コーネル大学医学部・心血管センター

3) K. Kario: ロックフェラー医科大学

4) T. Matsuo: 兵庫県立淡路病院

受付日: 1999. 7. 26, 採用日: 2000. 2. 1

血圧計 ABPM-630 (日本コーリン) にて一日血圧モニタリングが試行可能であった150名 (男性48名, 女性102名) も対象とした。一日血圧モニタリングの条件は既報⁶⁾ に準じた。

血中 vWF レベルの測定: 早朝空腹時, 2 シリンジ法にてクエン酸加真空管にて採血した検体を分離し, -80°C にて凍結保存していた血漿を用いた。血中 vWF の測定は新規に開発された vWF に対するモノクローナル抗体を用いた Shield 社の ELISA を用いた (TFB 社, 東京)。本抗体は血小板リッチの血漿においてリストセチン惹起の凝集を中和し, 高流速下の血小板粘着を阻害することが報告されている⁷⁾。血漿の20倍または100倍希釈検体100 μL を, モノクローナル抗体を固相したマイクロウェルで反応させ, 洗浄後, 酵素標識抗体を添加し第2反応を行い, 洗浄後, 発色反応による発色を測定した。測定時間は約2時間強である。また, 血中 vWF の測定はウサギポリクローナル抗体の F(ab')₂ 分画をもちいた従来法の ELISA (Stago 社) キットも, 比較としてもちいた。いずれも, Behring 社 (Marburg, Germany) の Standard Human Plasma (lot no. 502562) を100%とした。フィブリノーゲンは凝固一段法測定キットにて測定した⁸⁾。

結 果

vWF 従来法との相関: Fig. 1 に若年正常血圧男性39名の新法による vWF と従来法の vWF の散布図を示す。新法による血中 vWF レベルは従来法のもとの良い相関であった。

加齢と高血圧の影響: Table 1 に正常血圧若年男性と高齢者男性 (正常血圧者と高血圧患者) の心血管リスク

Fig. 1 Correlation of plasma vWF levels between the new method using monoclonal antibody and the conventional method in younger normotensive men.

ファクターと vWF レベルを示す。加齢にて, 血中 vWF とフィブリノーゲンレベルの著明な増加を認める。高血圧の合併によりフィブリノーゲンレベルに変化はないが, vWF レベルの有意の増加を認める。

血中 vWF レベルと心血管リスクファクターの関連: Table 2 に正常血圧高齢者と心血管リスクファクターと vWF レベルを示す。若年正常血圧男性群においては, body mass index が, 高齢者正常血圧男性群においては収縮期血圧レベルが, 高齢者高血圧男性群においては年齢とフィブリノーゲンレベルがそれぞれ血中 vWF レベルと有意の正相関を認めた。

高齢者高血圧患者の血圧レベルと血中 vWF: Fig. 2 に24時間血圧モニターを施行した高齢者高血圧患者150

Table 1 Characteristics of cardiovascular risk factors in younger normotensive men and elderly men

	Younger normotensive men n = 39	Elderly normotensive men n = 42	Elderly hypertensive men n = 68
Age, years	47 (7.1)	71 (9.5) **	71 (9.0) **
body mass index, kg/m ²	22.6 (2.0)	23.9 (2.8)	23.7 (2.8)
Smoker, %	38	43	46
Clinic systolic BP, mmHg	113 (12)	122 (9.6) *	165 (19) **††
Clinic diastolic BP, mmHg	72 (9.2)	72 (11)	93 (15) **††
Total cholesterol, mg/dL	175 (34)	187 (28)	191 (30) *
Triglyceride, mg/dL	124 (67)	141 (98)	151 (100)
HDL-cholesterol, mg/dL	48 (12)	46 (11)	46 (13)
Fibrinogen, mg/dL	210 (40)	261 (56) **	260 (55) **
vWF, %	88 (37)	127 (32) **	148 (41) **†

Data are shown as the mean (SD). * p < .05, *** p < .001, vs younger normotensive group; † p < .05,

†† p < .001, BP = blood pressure, vWF = von Willebrand factor

Table 2 Correlations of plasma von Willebrand factor level with cardiovascular risk factors

	Younger normotensive men n = 39	Elderly normotensive men n = 42	Elderly hypertensive men n = 68
Age	0.27	0.12	0.44 **
Body mass index	0.41 *	0.23	- 0.03
Clinic systolic BP	0.07	0.41 *	0.21
Clinic diastolic BP	- 0.04	0.03	- 0.04
Total cholesterol	- 0.12	- 0.18	0.18
Triglyceride	0.05	- 0.01	- 0.10
HDL-cholesterol	- 0.23	- 0.14	0.09
Fibrinogen	0.15	- 0.07	0.37 *

Pearson's correlation coefficients are shown in each group. * $p < .01$, ** $p < .001$, BP = blood pressure

Fig. 2 Relationships of plasma level of vWF and blood pressure in hypertensive elderly subjects.

名の血中 vWF レベルと血圧レベル（診察室収縮期血圧レベルと24時間平均収縮期血圧）の散布図を示す。血中 vWF レベルは診察室収縮期血圧レベルと24時間平均収縮期血圧ともに有意の正相関を認め、特に後者との相関がより強かった。

考 察

今回、我々は、最近開発された vWF に対するモノクローナル抗体を用いた ELISA を用いて血中 vWF を測定し、高齢者高血圧における内皮細胞傷害の規定因子を検討した。血中 vWF レベルは加齢と高血圧の合併により増加した。

140/90mmHg 未満の正常血圧者においても加齢により血中 vWF レベルの増加がみられ、そのレベルは収縮期血圧レベルと正相関を認めた。また、高血圧高齢者においては診察室血圧よりも24時間平均収縮期血圧とより強い正相関を認めた。これらの結果は、高齢者において、収縮期血圧レベルが高血圧患者においてのみならず、正

常血圧範囲内においても 血管内皮細胞傷害の大きな規定因子であることを示している。若年者ではその関連は認められていないことから、血圧の内皮細胞傷害への影響には加齢変化が加わって、初めて明らかになる可能性がある。同様に40～65歳の健常男性を対象にしたドイツの The Prospective Cardiovascular Munster (PRO-CAM) Study でも、高血圧者と正常血圧者に血中 vWF レベルに差を認めていない⁹⁾。また、高齢者において、高血圧患者で vWF は年齢と相関を認めており、正常血圧者ではこの関連は低い。従って、65歳以上の高齢者においても高血圧自体が加齢による内皮細胞傷害を加速するものと考えられる。

また、高齢者高血圧群では vWF はフィブリノーゲンとも相関していた。フィブリノーゲンと vWF はともに急性反応蛋白で、炎症および急性心筋梗塞や脳梗塞などの組織傷害によっても増加する。高齢者高血圧患者で認められる vWF とフィブリノーゲンとの正相関は、両者が臓器傷害を反映している可能性もある。フィブリノー

ゲンの増加は血小板凝集能を亢進させ、心血管リスクとなることが知られていることより¹⁰⁾、高齢者高血圧にみられる血中 vWF レベルの増加はフィブリノーゲン増加に伴い、さらに血小板凝集を促進し血栓傾向を引き起こすと考えられる。

若年者では vWF は Body mass index と関連していたことから、インスリン抵抗性症候群との関連が強い可能性もある。これまでに、インスリン抵抗性と血中 vWF レベルの関連が報告されている¹¹⁾。

これまで、血中 vWF レベルの増加する病態としては、糖尿病、腎不全などの内皮細胞傷害が予想される動脈硬化性疾患で増加していることが報告されている¹²⁾¹³⁾。また、大震災のような強烈なストレス時にも増加する¹⁴⁾。微量アルブミン尿症をとまなう高血圧や糖尿病でもその血中レベルが増加しており⁴⁾¹³⁾¹⁵⁾、降圧療法により低下する¹⁶⁾。高脂血症患者でも血中 vWF レベルが増加しているが、コレステロールレベルを低下させることにより、3カ月以内に血中レベルが低下する¹⁷⁾。また、不安定狭心症、心筋梗塞患者や血栓症患者において血中 vWF レベル高値が、再梗塞および死亡のリスクになるとの報告もある³⁾¹⁸⁾¹⁹⁾。また、血中 vWF レベルの高値の高齢者高血圧患者では、無症候性脳血管障害、特に、多発性脳梗塞の頻度が高い²⁰⁾。また、アンギオテンシン変換酵素 Insertion/Deletion (I/D) 多型では、DD 型の vWF レベルが高値を示している²¹⁾。

血中 vWF は、単に全身の内皮細胞傷害を反映した心血管リスクマーカーのみならず、動脈血栓症発症の病態に関与する心血管リスクファクターとなる可能性がある。vWF の重要な機能として血小板と傷害血管内皮下組織との橋渡しをするが、その際に活性化され、血小板止血血栓形成に関与する。従って、vWF の増加は血小板凝集・粘着を促進し、動脈血栓形成を促進し、その上昇自体が心血管リスクファクターとなる可能性が高い。

本研究で用いた ELISA で測定した血中 vWF レベルは、従来法で測定した vWF レベルと良好な相関を示した。使用したモノクローナル抗体は、リストセチン凝集を中和し、高流下における血小板の粘着を阻害することから、vWF 上の functional epitope を認識していると考えられる。従って、今回測定した vWF は、従来法で測定した vWF と比較して、よりの確に心血管系疾患を予測する可能性があるが、プロスペクティブな臨床研究による実証が必用である。

結 論

vWF の血中レベルは加齢および高血圧で増加し、特

に24時間収縮期血圧レベルと相関関係があった。血中 vWF の臨床的意義に関しては、個々の無症候性動脈硬化性疾患の内皮細胞傷害程度を反映し、将来の心血管系疾患のリスクファクターとなりうる可能性がある。

文 献

- 1) 菊尾七臣：加齢と血栓症。血液・腫瘍科 1999;38:302—310.
- 2) Mannucci PM: von Willebrand factor: a marker of endothelial damage? Arterioscler Thromb Vasc Biol 1998; 18: 1359—1362.
- 3) Jansson JH, Nilsson TK, Johnson O: von Willebrand factor in plasma: a novel risk factor for recurrent myocardial infarction and death. Br Heart J 1991; 66: 351—355.
- 4) Pedrinelli R, Giampietro O, Carmassi F, Melillo E, Dell'Omo G, Catapano G, et al.: Microalbuminuria and endothelial dysfunction in essential hypertension. Lancet 1994; 344: 14—18.
- 5) Shima M, Fujimura Y, Nishiyama T, Tsujiuchi T, Narita N, Matsui T, et al.: ABO blood genotype and plasma von Willebrand factor in normal individuals. Vox Sang 1995; 68: 236—240.
- 6) Kario K, Matsuo T, Kobayashi H, Imiya M, Matsuo M, Shimada K: Relation between nocturnal fall of blood pressure and silent cerebrovascular damage in elderly hypertensives: advanced silent cerebrovascular damage in extreme-dippers. Hypertension 1996; 27: 130—135.
- 7) Goodall AH, Jarvis J, Chand S, Rawlings E, O'Brien DP, McGraw A, et al.: An immunoradiometric assay for human factor VIII/von Willebrand factor (VIII: vWF) using a monoclonal antibody that defines a functional epitope. Br J Haematol 1985; 59: 565—577.
- 8) Kario K, Matsuo T, Nakao K: Factor VII hyperactivity in the elderly. Thromb Haemost 1991; 65: 25—27.
- 9) Junker R, Heinrich J, Schulte H, Erren M, Assmann G: Hemostasis in normotensive and hypertensive men: results of the PROCAM study. The prospective cardiovascular Munster study. J Hypertens 1998; 16: 917—923.
- 10) Ernst E: Fibrinogen: an important risk factor for atherothrombotic disease. Ann Med 1994; 26: 15—22.
- 11) Mansfield MW, Heywood DM, Grant PJ: Circulating levels of factor VII, fibrinogen, and von Willebrand factor and features of insulin resistance in first-degree relatives of patients with NIDDM. Circulation 1996; 94: 2171—2176.
- 12) Holvoet P, Donck J, Landeloos M, Brouwers E, Luijckens K, Arnout J, et al.: Correlation between oxidized low density lipoproteins and von Willebrand factor in chronic renal failure. Thromb Haemost 1996; 76: 663—669.
- 13) Kario K, Matsuo T, Kobayashi H, Matsuo M, Sakata T,

- Miyata T: Activation of tissue factor-induced coagulation and endothelial cell dysfunction in non-insulin-dependent diabetic patients with microalbuminuria. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1995; 15: 1114—1120.
- 14) Kario K, Matsuo T, Kobayashi H, Yamamoto K, Shimada K: Earthquake-induced potentiation of acute risk factors in hypertensive elderly patients: possible triggering of cardiovascular events after a major earthquake. *J Am Coll Cardiol* 1997; 29: 926—933.
 - 15) Kario K, Matsuo T, Kobayashi H, Matsuo M, Sakata T, Miyata T, et al.: Factor VII hyperactivity and endothelial cell damage are found in elderly hypertensives only when concomitant with microalbuminuria. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1996; 16: 455—461.
 - 16) Taylor JE, Belch JJ, McLaren M, Stewart WK: Effect of nifedipine on changes in fibrinogen and von Willebrand factor in haemodialysis patients treated with recombinant human erythropoietin. *Blood Coagul Fibrinolysis* 1995; 6: 100—104.
 - 17) Kario K, Matsuo T, Hoshide S, Kobayashi H, Sakata T, Mizuno O, et al.: Lipid-lowering therapy correct endothelial cell dysfunction in a short time but does not affect hypercoagulable state even after long-term use in hyperlipidemic patients. *Blood Coagul Fibrinol* 1999; 10: 269—277.
 - 18) Brannstrom M, Jansson JH, Boman K, Nilsson TK: Endothelial haemostatic factors may be associated with mortality in patients on long-term anticoagulant treatment. *Thromb Haemost* 1995; 74: 612—615.
 - 19) Montalescot G, Philippe F, Ankri A, Vicaute E, Bearez E, Poulard JE, et al.: Early increase of von Willebrand factor predicts adverse outcome in unstable coronary artery disease: beneficial effects of enoxaparin. French Investigators of the ESSENCE Trial. *Circulation* 1998; 98: 294—299.
 - 20) Kario K, Matsuo T, Kobayashi H, Asada R, Matsuo M: 'Silent' cerebral infarction is associated with hypercoagulability, endothelial cell damage, and high Lp (a) levels in elderly Japanese. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1996; 16: 734—741.
 - 21) Kario K, Matsuo T, Kobayashi H, Kanai N, Hoshide S, Mitsuhashi T, et al.: Endothelial cell damage and angiotensin-converting enzyme insertion/deletion genotype in elderly hypertensive patients. *J Am Coll Cardiol* 1998; 32: 444—450.

Abstract

**Determinants of Endothelial Cell Damage in the Elderly Hypertension :
Assessment by Plasma von Willebrand Factor**

Kazuomi Kario^{1)~3)}, Satoshi Hoshide¹⁾, Takefumi Matsuo⁴⁾ and Kazuyuki Shimada¹⁾

To investigate the determinants of endothelial cell damage in hypertensive elderly patients, we measured the plasma von Willebrand factor (vWF) levels by a recently developed enzyme-linked immunosorbent assay using monoclonal antibody for the functional epitope. Plasma vWF level was markedly increased in the elderly normotensive subjects (n = 42) than in younger normotensive subjects (n = 39) (127 vs 88%, $p < .0001$), and was further increased in elderly hypertensive subjects (n = 68) (148%, $p < .05$ vs elderly normotensives). The vWF level was positively correlated with body mass index in younger normotensive subjects ($r = 0.41$, $p < .01$), with systolic blood pressure (BP) in elderly normotensive subjects ($r = 0.41$, $p < .01$), and with age ($r = 0.44$, $p < .001$) and fibrinogen level ($r = 0.37$, $p < .01$) in elderly hypertensive subjects. In elderly hypertensive subjects (n = 150), vWF level had a stronger positive correlation with 24-hr systolic BP measured ($r = 0.41$, $p < .0001$) by ambulatory BP monitoring than with clinic systolic BP ($r = 0.33$, $p < .0001$). In conclusion, in hypertensive elderly patients, endothelial cell damage increases with systolic BP and fibrinogen levels, indicating a prethrombotic condition.

Key words : *von Willebrand factor, Elderly, Hypertension, Ambulatory blood pressure, Endothelial cell damage*
(*Jpn J Geriatr* 2000; 37: 393—397)

1) Department of Cardiology, Jichi Medical School, Tochigi, Japan

2) Cardiovascular Center, Cornell University Medical College, 1300 York Avenue, New York, NY, 10021. Tel: +1-212-746-2280 (direct); FAX: +1-212-746-2685, E-mail: kak2012@mail.med.cornell.edu

3) Guest Investigator, Rockefeller University, 1230 York Avenue, New York, NY 10021.

4) Department of Internal Medicine, Hyogo Prefectural Awaji Hospital