シンポジウム2動脈硬化症と血小板・凝固・線溶

動脈血栓形成とフォンビルブランド因子依存性血小板凝集1

川野晃一・村田満3

緒言

血小板は凝固因子と並んで血栓形成に関与する重要な因子であり、生理的・病的条件下での血小板凝集能の解析は生体内の血栓形成を理解するうえで重要である。Bornらの開発した血小板凝集計は凝集における血小板膜糖蛋白(GPIb/IX, GPIIb/IIIaなど)とリガンド(フィブリノゲン,フォンビルブランド因子など)の関与を明らかにし、また、血小板機能異常症の診断、分類に寄与してきた。特に血小板凝集におけるGPIIb/IIIaとフィブリノゲンの相互作用を検討するには簡便で有用な検査であり、現在も広く用いられている。しかし、この方法は血小板浮遊液にアゴニスト(非生理的物質を含む)を混合して攪拌するという非生理的条件下での凝集を観察するものであり、生体内での血小板凝集を十分に反映しているとはいえないと考えられる。さらに近年、GPIIb/IIIaとフィブリノゲンに代わって動脈血栓形成におけるGPIb/IXとフォンビルブランド因子の重要性を示唆する報告が増加しつつある。たとえばGPIb/IXとフォンビルブランド因子の結合を阻害する種々の物質(aurintricarboxylic acid¹⁾、モノクローナル抗体²⁾、フォンビルブランド因子フラグメント³⁾)は動物モデルにおける動脈血栓形成を抑制することが報告されている。また、臨床研究では血漿フォンビルブランド因子高値が虚血性心疾患の危険因子である可能性が示された⁴⁾⁻⁶⁾。

以上の点を考慮すると、動脈血栓形成における血小板の関与を解明するには、より生理的な条件下でGPIb/IXとフォンビルブランド因子の相互作用を検討する装置が必要であることが理解される。この目的で、われわれはコーンプレート型ずり応力惹起血小板凝集計を開発した。この装置は凝集にアゴニストを必要とせず、また、ずり応力を考慮に入れていることから、動脈狭窄部位での血小板凝集をよりin vivoに近い状態で反映していると考えられる。

1. ずり応力惹起血小板凝集(shear-induced platelet aggregation)の機序

Fig. 1に装置の概略を示した⁷⁾⁻⁹⁾。モーターに接続したコーンと透明なプレートの間に400 μ lのplatelet-rich plasmaを入れ、モーターをコンピューター制御で回転させることにより任意のずり応力をplatelet-rich plasma中の血小板に一樣に加えることができる。同時に633nmのヘリウム/ネオンレーザー光をプレートに水平に照射し、その透過光量を測定し凝集率を経時的に記録する。Fig. 2に標準的なずり応力惹起血小板凝集曲線を示した¹⁰⁾。ここでずり

1996年11月、平成8年度日本動脈硬化学会冬季大会(金沢)において発表

2杏林大学医学部二内科

3慶應義塾大学医学部内科

Arterial thrombus Formation and von Willebrand factor-dependent platelet aggregation.

2 Koichi Kawano: Second Department of Internal Medicine, Kyorin University School of Medicine, Tokyo, Japan

3 Mitsuru Murata: Department of Internal Medicine, Keio University School of Medicine, Tokyo, Japan

Key words: Shear-induced platelet aggregation, von Willebrand factor, Glycoprotein Ib/IX

原稿受取日:1997年10月6日

Fig. 1 Schematic representation of shear-induced platelet aggregometer. Platelet-rich plasma on the plate is exposed to varying shear stress generated by a rotating cone. Platelet aggregation is monitored continuously by recording the intensity of the helium-neon laser light transmitted through the platelet-rich plasma. (reprinted from ref. 9)

Fig. 2 Platelet aggregation induced by varying shear stress. Citrated platelet-rich plasma was exposed to a gradient of 6–108 dynes/cm² over a 5-min period. The broken line indicates the gradient of shear stress. The first aggregation reached its peak approximately at 12 dynes/cm² and was reversed at 68 dynes/cm². The second aggregation, which initiated at 81 dynes/cm², was larger than the first one and irreversible. (reprinted from ref. 10)

り応力は 6 dynes/cm² より開始し徐々に 12 dynes/cm² まで増加させたのち、108 dynes/cm² まで急速に上昇させ、以後はこの値を維持するように設定した。このずり応力負荷に伴い血小板は二相性の凝集を示した。すなわち、12 dynes/cm² 付近の低ずり応力下で軽度可逆的に凝集した後、ずり応力の増加に伴い一度解離し、108 dynes/cm² の高ずり応力下で高度に非可逆的に凝集した。両者の凝集の相違は走査型電子顕微鏡写真で確認されており、低ずり応力下では血小板が粗に結合した凝集塊が、高ずり応力下では血小板が密に結合した凝集塊が観察される。この 2 種類の凝集に必要なリガンドおよび膜糖蛋白を同定するために、種々の疾患のずり応力惹起血小板凝集を測定した¹⁰⁾ (Fig. 3)。低ずり応力下では、血小板膜糖蛋白 GPIIb/IIIa を先天性に欠如する血小板無力症 thrombasthenia と、血漿フィブリノゲンを欠如する無フィブリノゲン血症 afibrinogenemia において凝集が惹起されないことから、低ずり応力惹起血小板凝集には、リガンドとしてフィブリノゲン、膜糖蛋白として GPIIb/IIIa が必要であると結論された。次に、高ずり応力下では、血小板無力症、血小板膜糖蛋白 GPIb/IX を欠如する Bernard-Soulier 症候群、血漿フォンビルブランド因子を欠如する重症型 von Willebrand 病でそれぞれ凝集が惹起されないことから、高ずり応力惹起血小板凝集には、リガンドとしてフォンビルブランド因子、膜糖蛋白として GPIb/IX および GPIIb/IIIa が必要であると結論された。

Fig. 3 Shear-induced platelet aggregation in patients with various diseases. N indicates platelet-rich plasma derived from normal individuals and P indicates patients' platelet-rich plasma. Aggregation was absent in thrombasthenia and afibrinogenemia at low shear stress, while aggregation was absent in thrombasthenia, Bernard-Soulier syndrome and severe von Willebrand disease at high shear stress. (reprinted from ref. 10)

ここで、採血のさいに抗凝固剤としてクエン酸ではなくヒルジンをういて血漿カルシウムイオンを生理的濃度に維持すると、低ずり応力下の血小板凝集はほとんど消失することから、低ずり応力惹起血小板凝集に対応する凝集は生体内では実際には惹起されていないと考えられる¹⁰⁾。以上から、生体内での動脈血栓形成に関与するのは高ずり応力惹起血小板凝集であると推論され、本稿ではこれ以後は高ずり応力惹起血小板凝集についてのみ考察することにする。以上の結果に Indo-1 AM をういて細胞内カルシウムイオン濃度を測定することによって得られた結果を加えると、高ずり応力惹起血小板凝集の機序を Fig. 4 のように図示で

Fig. 4 Schematic representation of a proposed mechanism of shear-induced platelet aggregation. The binding of von Willebrand factor to GP Ib/IX causes Ca^{2+} ion influx, which leads to activation of GP IIb/IIIa and platelet aggregation mediated by the interaction between activated GP IIb/IIIa and von Willebrand factor. (reprinted from ref. 8)

きる⁹⁾。すなわち、高ずり応力が加えられるとなんらかの変化がフォンビルブランド因子または GPIb/IX のいずれかに生じ、両者が結合する。これがカルシウムイオンの細胞内への流入をひきおこし、細胞内カルシウムイオンの上昇が GPIIb/IIIa を活性化し、血小板が凝集する。

狭窄動脈内に生ずるずり応力は百～数百 dynes/cm² と計算され、高ずり応力によって惹起されるフォンビルブランド因子依存性血小板凝集が実際に動脈狭窄部位での血栓形成に関与している可能性は十分にあると考えられる。

II. ずり応力惹起血小板凝集測定の臨床的意義

種々の血栓性疾患についてずり応力惹起血小板凝集を測定することは、生体内の病的血栓形成におけるフォンビルブランド因子依存性血小板凝集の関与を明らかにするうえで重要と考えられる。ここでは、脳血管障害と血栓性血小板減少性紫斑病 thrombotic thrombocytopenic purpura に

についての結果を紹介する。内山ら⁹⁾は75例の脳虚血を atherothrombotic stroke, cardioembolic stroke, lacunar stroke, transient ischemic attack に分類し、各々のずり応力惹起血小板凝集能を測定した。その結果、atherothrombotic stroke, transient ischemic attack では高ずり応力惹起血小板凝集が有意に亢進していたが、cardioembolic stroke, lacunar stroke では亢進が認められなかった (Table 1)。この亢進の原因について検討するため、Table 2 に示す種々のパラメーターとの相関を調べたところ、ずり応力惹起血小板凝集能は血小板数、Born らの血小板凝集計によるアゴニスト誘発血小板凝集能、血漿フィブリノゲン濃度、血漿 β トロンボグロブリン濃度のいずれとも相関しなかった。血漿総フォンビルブランド因子濃度とも相関しなかったが、フォンビルブランド因子 larger multimer 濃度と正の相関を示し、larger multimer 濃度が高いほどずり応力惹起血小板凝集が亢進するという結果が得られた (Fig. 5)。以上から、atherothrombotic stroke, transient ischemic attack においてフォンビルブランド因子 larger multimer がなんらかの機序により増加しており、これが、ずり応力惹起血小板凝集能を亢進させ血栓形成に関与している可能性があると考えられた。内山らは、さらに脳虚血患者にアセチルサリチル酸およびチクロピジンを投与し、ずり応力惹起血小板凝集能に与える影響について検討した。その結果、アセチルサリチル酸少量投与 (81 mg/day) はずり応力惹起血小板凝集を抑制

Table 1 Shear-Induced Platelet Aggregation in Subtypes of Cerebral Ischemia. (reprinted from ref. 9)

Subgroup	n	SIPA, % (Mean $\pm$ SD)	
Atherothrombotic stroke	21	57.9 $\pm$ 10.4	
Cardioembolic stroke	11	48.3 $\pm$ 11.8	
Lacunar stroke	31	49.2 $\pm$ 8.1	
Transient ischemic attack	12	57.5 $\pm$ 8.6	
Patient control	12	46.3 $\pm$ 10.3	
Normal control	14	44.9 $\pm$ 2.7	

* $P < .05$, † $P < .01$, ‡ $P < .001$ (ANOVA).

Table 2 Correlation Between Shear-Induced Platelet Aggregation and Other Hemostatic Parameters in Patients With Cerebral Ischemia. (reprinted from ref. 9)

Hemostatic Parameters	n	Range	Mean $\pm$ SD	Correlation Coefficient	P
Platelet count, $\times 10^4/\text{mm}^3$	66	11.4–54.6	31.9 $\pm$ 10.4	.228	.097
Platelet aggregation, %					
Induced by ADP	45	5–82	49 $\pm$ 21	.203	.242
Induced by AA	45	2–86	69 $\pm$ 14	.239	.168
Induced by PAF	45	3–85	42 $\pm$ 26	.170	.330
Fibrinogen, mg/dL	29	127–726	335 $\pm$ 159	.121	.533
β -Thromboglobulin, ng/mL	27	14–360	65 $\pm$ 79	.112	.578
vWF antigen, U	26	0.06–2.18	1.32 $\pm$ 0.49	.079	.707

AA indicates arachidonic acid; PAF, platelet-activating factor.

Fig. 5 Correlation between the extent of shear-induced platelet aggregation and plasma level of larger von Willebrand factor multimers in patients with cerebral ischemia. (reprinted from ref. 9)

しなかったが、チクロピジン (200 mg/day) はこれを抑制することが示され、atherothrombotic stroke, transient ischemic attack の治療, 再発予防には, アセチルサリチル酸少量投与よりもチクロピジン投与の方が有効であり得る可能性が示唆された (Fig. 6).

次に血栓性血小板減少性紫斑病について検討した¹¹⁾. この疾患の病態は確定していないが, なんらかの原因で障害

Fig. 6 Shear-induced platelet aggregation in patients with cerebral ischemia before and after administration of aspirin (acetylsalicylic acid) (81 mg/day) and ticlopidine (200 mg/day). Ticlopidine, not aspirin (acetylsalicylic acid), suppressed platelet aggregation significantly. (reprinted from ref. 9)

された血管内皮細胞上で血小板凝集が生ずると考えられる. この疾患では血小板数が低値であり, 患者由来の多血小板血漿では測定に必要な血小板数を得られないことが多いため, ここでは, 健常人由来の多血小板血漿に同量の患者由来の乏血小板血漿を混合する方法で測定した. 健常人由来の多血小板血漿に患者由来の乏血小板血漿を混合すると, ずり応力惹起血小板凝集は亢進した (Fig. 7). このずり応力惹起血小板凝集は抗フォンビルブランド因子モノクローナル抗体 NMC-4 により抑制されることから, フォンビルブランド因子依存性であることが示された. 次に, 直径 $0.45 \mu\text{m}$ のフィルターを用いて患者血漿中のフォンビルブランド因子 larger multimer を除去すると, ずり応力惹起血小板凝集は減弱した (Fig. 8). 以上から, 血栓性血小板減少性紫斑病において血漿フォンビルブランド因子 larger multimer の増加に伴うずり応力惹起血小板凝集亢進が病態に関与すると考えられた. このことは, 患者に対し同様のフィルターを組み入れた体外循環を施行し血漿濾過を行うと, 患者由来血漿のもつずり応力惹起血小板凝集亢進作用が減弱するという臨床データにより確認された (Fig. 9).

その他の疾患のずり応力惹起血小板凝集を測定した結果, ずり応力惹起血小板凝集の亢進する疾患には, 一部のフォンビルブランド病 (type IIB および platelet type)¹²⁾, 虚血性心疾患¹³⁾があり, 一方, ずり応力惹起血小板凝集の減弱する疾患には, 骨髓増殖性疾患, 尿毒症¹⁴⁾があることが確かめられた.

Fig. 7 Shear-induced platelet aggregation was increased in a mixture of normal platelet-rich plasma (normal PRP) with platelet-poor plasma from a patient with thrombotic thrombocytopenic purpura (TTP PPP). The platelet aggregation was inhibited by NMC-4, a monoclonal antibody to von Willebrand factor.

Fig. 8 Shear-induced platelet aggregation in a mixture of normal platelet-rich plasma with normal platelet-poor plasma (curve 1: normal ppp), with platelet-poor plasma from a patient with thrombotic thrombocytopenic purpura (curve 3: TTP PPP) or with platelet-poor plasma from the patient after filtration with a filter (curve 2: filtered TTP ppp; $0.45\ \mu\text{m}$ pore size). Filtration normalized the platelet aggregation.

Fig. 9 Shear-induced platelet aggregation before and after filtration using an extracorporeal circulation system. The left figure shows platelet aggregation using blood obtained from the filtration system. The right figure shows platelet aggregation using blood obtained from a patient with TTP. curve A; post-filtration curve B; pre-filtration curve C; control curve using normal plasma.

Plasma prepared from blood in the extracorporeal circulation system showed increased platelet aggregation before filtration (curve B in the left figure) and decreased platelet aggregation after filtration (curve A in the left figure). After returning the filtered plasma to the patient, the patient's plasma supported an increased platelet aggregation (curve A in the right figure) as compared to the normal plasma (curve C in the right figure), but the aggregation was smaller than curve B (before filtration).

結 語

ずり応力惹起血小板凝集は、ずり応力下でのフォンビルブランド因子と GPIb/IX の相互作用を検討するうえで有用な検査である。今後、動脈血栓形成における血小板の役割の解明、血小板血栓形成を抑制する薬剤の開発などに寄与することが期待される。

本研究は以下の研究者との共同研究によるものである。

東京女子医科大学附属脳神経センター：内山真一郎，東レ株式会社基礎研究所：福山真弓 板垣一郎，杏林大学医学部高齢医学：徳植純也 林潤一 秦葭哉，Vanderbilt University Medical Center：Raymond M. Hakim，早稲田大学理工学部：河上桂子 酒井清孝，東京都臨床医学総合研究所：鈴木英紀 田上憲次郎，Scripps Research Institute：Zaverio M. Ruggeri

文 献

- 1) Strony J, Phillips M, Brands D, Moake J, and Adelman B: Aurintricarboxylic acid in a canine model of coronary artery thrombosis. *Circulation*, 81: 1106-1114, 1990
- 2) Badimon L, Badimon JJ, Chesebro JH, and Fuster V: Inhibition of thrombus formation: Blockade of adhesive glycoprotein mechanisms versus blockade of the cyclooxygenase pathway. *J Am Coll Cardiol*, 11: 30A, 1988
- 3) Yao SK, Ober JC, Garfinkel LI, Hagay Y, Ezov N, Ferguson JJ, Anderson HV, Panet A, Gorecki M, Buja LM, and Willerson JT: Blockade of platelet membrane glycoprotein Ib receptors delays intracoronary thrombogenesis, enhances thrombolysis, and delays coronary artery reocclusion in dogs. *Circulation*, 89: 2822-2828, 1994
- 4) Jansson JH, Nilsson TK, and Johnson O: von Willebrand factor in plasma: a novel risk factor for recurrent myocardial infarction and death. *Br Heart J*, 66: 351-355, 1991
- 5) Thompson SG, Kienast J, Pyke SDM, Haverkate F, and van de Loo JCW: Hemostatic factors and the risk of myocardial infarction or sudden death in patients with angina pectoris. *N Engl J Med*, 332: 635-641, 1995
- 6) Ikeda Y, Murata M, and Goto S: von Willebrand factor-dependent shear-induced platelet aggregation: Basic mechanisms and clinical implications. *Ann NY Acad Sci*, 811: 325-336, 1997
- 7) Fukuyama M, Sakai K, Itagaki I, Kawano K, Murata M, Kawai Y, Watanabe K, Handa M, and Ikeda Y: Continuous measurement of shear-induced platelet aggregation. *Thromb Res*, 54: 253-260, 1989
- 8) Ikeda Y, Handa M, Kamata T, Kawano K, Kawai Y, Watanabe K, Kawakami K, Sakai K, Fukuyama M, Itagaki I, Yoshioka A, and Ruggeri ZM: Transmembrane calcium influx associated with von Willebrand

factor binding to GP Ib in the initiation of shear-induced platelet aggregation. *Thromb Haemost*, 69: 496-502, 1993

9) Uchiyama S, Yamazaki M, Maruyama S, Handa M, Ikeda Y, Fukuyama M, and Itagaki I: Shear-induced platelet aggregation in cerebral ischemia. *Stroke* 25: 1547-1551, 1994

10) Ikeda Y, Handa M, Kawano K, Kamata T, Murata M, Araki Y, Anbo H, Kawai Y, Watanabe K, Itagaki I, Sakai K, and Ruggeri ZM: The role of von Willebrand factor and fibrinogen in platelet aggregation under varying shear stress. *J Clin Invest*, 87: 1234-1240, 1991

11) Murata M, Itagaki I, and Ikeda Y: von Willebrand factor-dependent shear-induced platelet aggregation. Basic mechanisms and clinical implications. Proceedings for Hirosaki conference on von Willebrand factor,

1995

12) Murata M, Fukuyama M, Satoh K, Fujimura Y, Yoshioka A, Takahashi H, Handa M, Kawai Y, Watanabe K, and Ikeda Y: Low shear stress can initiate von Willebrand factor-dependent platelet aggregation in patients with type IIB and platelet-type von Willebrand disease. *J Clin Invest*, 92: 1555-1558, 1993

13) Tokunue J, Hayashi J, Hata Y, Nakahara K, and Ikeda Y: Enhanced platelet aggregability under high shear stress after Treadmill exercise in patients with effort angina. *Thromb Haemost*, 75: 833-837, 1996

14) Sreedhara R, Itagaki I, and Hakim RM: Uremic patients have decreased shear-induced platelet aggregation mediated by decreased availability of glycoprotein IIb-IIIa receptors. *Am J Kidney Dis*, 27: 355-364, 1996