

2021年度 北陸大学特別研究助成【 若手・女性研究 】 報告書

代表者	所属	医療保健学部	職位	助手	氏名	藤井 義也
-----	----	--------	----	----	----	-------

研究課題名	バスキュラーアクセスに伴う後天性フォン・ヴィレブランド症候群 (AVWS) の新規検査診断法の開発
-------	---

交付額	1,000,000 円
-----	-------------

研究成果の概要

バスキュラーアクセス (VA)内ずり応力による後天性フォン・ヴィレブランド症候群 (AVWS)を疑い、解析を行った。研究方法は、① *in vitro* ずり応力負荷試験、②血液透析患者検体のVWF:Ag、VWF:Rco、ADAMTS13活性測定、③VWF multimer解析の3つの実験を行った。*in vitro* ずり応力負荷試験から、VA内ずり応力によってAVWSが発症する可能性が伺えた。血液透析患者のVWF:Ag、VWF:Rcoは高値を、ADAMTS13活性は低値を示しており、血栓傾向にあることが示唆された。VWF multimer解析では、一部の症例でVWF multimer Indexが低下しており、AVWSが疑われたが、出血の臨床症状は認められなかった。VWF:Agの上昇はVA関連血栓症(VAT)のリスク因子であるため、VA内で発生しているずり応力によりVAT発症を抑制している可能性が示唆された。

研究目的

フォン・ヴィレブランド因子 (VWF) は血漿中に存在する止血因子であり(1)、血小板の粘着と凝集を媒介することで、一次止血における重要な役割を果たしている。血管内皮細胞および巨核球でモノマーが直鎖状に連なった巨大多量体 (マルチマー) として産生され、その特殊なマルチマー構造のため、ずり応力存在下で血小板粘着・凝集活性を發揮する。また、血小板粘着・凝集活性は高分子量多量体ほど高く、ずり応力依存的にVWF特異的切断酵素であるADAMTS13による切断を受けて、止血に適切な大きさに調整されている(2)。一方で、過剰なずり応力条件下ではADAMTS13によるVWFの切断亢進が生じ、高分子量多量体が欠損することで、出血性疾患である後天性フォン・ヴィレブランド症候群 (AVWS) を発症する(3)。すでに循環器疾患 (大動脈弁狭窄症など) やECMOなどの補助循環装置に伴うAVWSが報告されている。

バスキュラーアクセス(VA)は、透析治療において必要不可欠なものであり、自己血管内シャント (AVF)、人工血管内シャント (AVG)、動脈表在化、長期留置カテーテルなどがある。この中でも自己血管の動静脈を短絡して作製するAVFでは、吻合部や狭窄部直近で非生理的な高ずり応力が発生している(4)。

血液透析患者は様々な基礎疾患や透析治療の影響で出血傾向を示し、脳出血リスクは健常者の5~10倍と高く、さらに、通常の脳出血と比べて血腫のサイズが大きいことや、死亡率が健常者の2倍との報告がある(5)。出血の原因として、高血圧、透析治療による抗凝固剤の使用、水分貯留による血液希釈、粘稠度の低下などが挙げられるが、消化管出血など説明のつかない出血病態も頻発する。前述の通り、VA内では生理的な血管に比べると高いずり応力が発生しており、これらの出血傾向はVAに伴うAVWSの可能性がある。

本研究では、血液透析患者の出血傾向の要因の1つとしてVAに伴うAVWSの可能性を疑い、解析を行う。また、VAに伴うAVWSを臨床現場で日常的に行われているシャントエコーから簡易的にスクリーニングできる新規検査指標を開発する。

研究の方法

・研究対象

医療法人社団瑞穂会みずほ病院および神應透析クリニックで血液透析を施行している患者168名を対象とした。VAはAVF、AVGを対象とし、動脈表在化およびVA不明例は除外した。また、血漿分離後にフィブリン析出した検体も解析から除外した。除外後の解析対象者数は147名であった。

・採血

採血は透析治療の定期採血と同時に行い、みずほ病院は2020年8月、神應透析クリニックは2021年6月に実施した。採血方法は3.2%クエン酸Na加真空採血管を使用し、透析直前に血液透析用穿刺針より行った。採取した血液は速やかに室温にて1,500G、10分の条件で遠心分離し、血漿を測定まで-80℃で保存した。

VAに伴うAVWSの解析のため、以下3つの実験を行った。

1. *in vitro* ずり応力負荷試験
2. 血液透析患者検体のVWF:Ag、VWF:Rco、ADAMTS13活性測定
3. VWF multimer解析

研究成果

in vitro ずり応力負荷試験では、人為的にずり応力負荷をかけた検体のVWF:Ag、VWF:RCoの測定、およびVWF multimer解析を行った。90Paまでの負荷ではVWF multimer Index (Index)の低下を認めなかったが、180Paの負荷でIndexが大きく低下していた。Indexの低下に伴ってVWF:RCoも低下を認め、VWF比活性も低下していた。以上のことから、VWFはある一定以上のずり応力負荷から急激にADAMTS13による切断の亢進が起こることが示唆された。また、VA作製初期の吻合部近傍には180Pa以上のずり応力が生じているとの報告があり(4)、この実験結果からVAに随伴するAVWSの可能性が伺えた。

続いて、血液透析患者および対照健常者のVWF:Ag、VWF:RCo、ADAMTS13活性の測定を行った。血液透析患者のVWF:Ag、VWF:RCoは共に健常者と比して有意に高値を示していた。ADAMTS13活性は大きく低下していたが、血栓性血小板減少性紫斑病 (TTP) の診断基準である10%未満を示す症例は認められなかった。ADAMTS13とVWF:Ag、VWF:RCoは共に弱い負の相関を認めた($r=-0.923$, $r=-0.346$)。先行研究では、ADAMTS13活性の低下、VWF:Agの上昇はバスキュラーアクセス関連血栓症(VAT)の発症リスクであると報告があり(7)、本研究対象の血液透析患者もVATのリスクが高いことが示唆された。

また本研究では、VWF比活性0.7未満の検体についてVWF multimer解析を行った。*in vitro*ずり応力負荷試験結果から分かる通り、VWF比活性低下検体ではIndexが低下している可能性がある。血液透析患者147例中10例でVWF比活性0.7未満であった。このうち、7例でIndexの低下 (80%未満) を認め、AVWSが疑われた。しかし、Indexが低下していたすべての症例でAVWS様の臨床症状は認められず、VAに随伴するAVWSを発症している可能性は極めて低いと考えられた。Indexが低下していた症例のVWF:RCoは84.9%~263.9% (基準範囲 : 75~150%) と十分に保たれていたことから、血液透析患者の中にはIndexが減少する症例が存在することは確認できたが、AVWSを発症するまでには至らないと推察された。

血液透析患者は透析治療による血小板や血管内皮細胞の活性化によってVWF:Agが高値傾向となっている(8)。本研究結果では特に、VWF比活性0.7以下の10症例のVWF:Agの平均が264.2% (基準範囲 : 50~160%) と非常に高値を示しており、対象血液透析患者のVATのリスクが高いことがわかる。しかし、VWF:RCoは平均で147.8%と高値を示しておらず、バスキュラーアクセス内で発生するずり応力によるVWFの切断亢進は、VWF活性を抑制し、むしろVATのリスクを軽減している可能性がある。

<引用文献>

1. Springer TA: von Willebrand factor, Jedi knight of the bloodstream. *Blood* 124:1412-1425,2014.
2. Soejima K, Mimura N, Hiroshima M, et al.: A Novel Human Metalloprotease Synthesized in the Liver and Secreted into the Blood: Possibly, the von Willebrand Factor—Cleaving Protease? *J Biochem* 130:475-480,2001.
3. Tamura T, Horiuchi H, Imai M, et al.: Unexpectedly high prevalence of acquired von Willebrand syndrome in patients with severe aortic stenosis as evaluated with a novel large multimer index. *J Atheroscler Thromb* 22:1115-1123,2015.
4. He Y, Terry CM, Nguyen C, et al.: Serial analysis of lumen geometry and hemodynamics in human arteriovenous fistula for hemodialysis using magnetic resonance imaging and computational fluid dynamics. *J Biomech* 46:165-169,2013.
5. 日本脳卒中学会. 脳卒中治療ガイドライン2015 [追補2017] p82-83
6. 堀内久徳 編集.モデル動物の作製と利用-循環器疾患2021 <上巻> :エル・アイ・シー:p 192-229,2021.
7. Elzorkany,KMA, Montaser,BAM, El-Hefnawy,SM: Plasma von willebrand factor and a disintegrin and metalloproteinase with eight thrombospondin-type 1 motif levels in hemodialysis patients: Relation to vascular access thrombosis. *Indian J Nephrol* 28:278-282,2018.
8. Danyelle R.A.Rios, Maria G.Carvalho, et al.: ADAMTS13 and Von Willebrand factor in patients undergoing hemodialysis. *J Thromb Thrombolysis* 34(1):73-8, 2012.

主な発表論文等

・学会発表

第16回石川県臨床工学会「バスキュラーアクセス内ずり応力によるフォン・ヴィレブランド因子の変化」

第67回日本透析医学会学術集会・総会 「バスキュラーアクセスに随伴する後天性フォン・ヴィレブランド症候群の可能性」

The 17th Congress of Asian Society of Clinical Pathology and Laboratory Medicine (ASCPaLM)

「Pathophysiological analysis of thrombophilia in hemodialysis patients」

・論文

論文作成予定 (現在追加実験中)

組織				
分担・協力者	氏名	所属	職位	役割
分担者	森下 英理子	金沢大学医学系研究科保健学専攻病態検査学	教授	自動血液凝固分析装置CS5100の使用と血栓止血学的解析および研究指導
分担者	長屋 聡美	金沢大学医学系研究科保健学専攻病態検査学	助教	自動血液凝固分析装置CS5100の使用
分担者	山田 真也	奈良県立医科大学輸血部	医員	ADAMTS13活性測定
協力者	神應 太郎	神應透析クリニック	副院長	透析・VA治療における臨床診断と臨床情報管理
協力者	越野 慶隆	みずほ病院	理事長	透析・VA治療における臨床診断と臨床情報管理