

- Histochemical and ultrastructural studies. *Am. J. Clin. Pathol.*, **80**: 529~533, 1983.
- 6) 神山隆一, 石川雄一, 北川昌伸: 血液疾患と脾臓. *病理と臨床*, **6**: 1423~1431, 1988.
- 7) **Kamiyama, R., Matsuya, S., Muto, Y., Yamaguchi, H. and Tsukada, T.**: Platelet phagocytosis by macrophages in the bone marrow of patients with idiopathic thrombocytopenic purpura as a predictive factor in the effectiveness of splenectomy. *Acta Haematol. Jpn.*, **51**: 797~807, 1988.

4) 慢性骨髄増殖性疾患における von Willebrand 因子異常

新潟第一内科 帯刀 亘・高橋 芳右
柴田 昭

Abnormalities of Plasma von Willebrand Factor in Patients with Chronic Myeloproliferative Disorders

Wataru TATEWAKI, Hoyu TAKAHASHI
and Akira SHIBATA

*1st Department of Internal Medicine,
Niigata University School of Medicine*

In chronic myeloproliferative disorders (CMPD) hemorrhagic complications are relatively common, in association with thrombocytosis. We studied the multimeric composition of plasma von Willebrand factor (vWf) in CMPD and investigated the possibilities of in vivo or ex vivo proteolysis. The relative amount of large multimers in patients with CMPD was significantly decreased in relation to platelet count as compared with normal subjects. It correlated negatively with platelet count, and positively with the ristocetin cofactor/vWf antigen ratio. All patients with primary myelofibrosis who had normal or subnormal platelet counts showed an almost normal multimeric pattern. The vWf abnormalities normalized with decreasing platelet counts after starting chemotherapy or when blast crisis occurred with decreased platelet counts. These abnormalities would be caused by in vivo proteolysis, because they were not corrected even when blood was obtained in the presence of protease inhibitors. The relative amount of large multimers of vWf did not correlate with plasma concentration of plasmin or elastase. Thus neither plasmin nor elastase appear to be the

Reprint requests to: Wataru TATEWAKI,
1st Department of Internal Medicine,
Niigata University School of Medicine,
Asahimachi-dori 1, Niigata City, 951,
JAPAN.

別刷請求先: 〒951 新潟市旭町通1番町
新潟大学第一内科

帯刀 亘

enzymes responsible for in vivo proteolysis.

Key words: von Willebrand factor, chronic myeloproliferative disorders, in vivo proteolysis

von Willebrand 因子, 慢性骨髓増殖性疾患, 生体内蛋白分解

はじめに

慢性骨髓増殖性疾患 (CMPD) では, 特に血小板増加状態においてはしばしば出血症状を伴うことが知られている。これまでに種々の血小板機能異常が問題にされてきたが, 近年フォン・ウィルブラント因子 (vWf) のマルチマー構造の異常が指摘されるようになり, 後天性フォン・ウィルブラント症候群として報告されてきた。vWf は血管内皮細胞および骨髓巨核球で産生され, その過程で重合化がおり, 血漿中では分子量約50万から2000万の広範囲に不連続に分布するマルチマーからなっており, より高分子のマルチマーが一次止血に重要な役

割を担っている。CMPD ではしばしばこの高分子マルチマーが減少しやすいことが報告されている。我々は多数例の CMPD において, 血漿 vWf のマルチマー解析を行い, その異常の頻度および機序について検討した。

対象と方法

慢性骨髓性白血病 (CML) 慢性期 21 例, 真性多血症 (PV) 15 例, 本態性血小板血症 (ET) 16 例, 原発性骨髓線維症 (PMF) 9 例の計 61 症例を対象とし, 第 VIII 因子活性, vWf 抗原およびリストセチン・コファクター活性 (RCof) の測定, vWf のマルチマー解析を行った。マルチマー解析は不連続 SDS-アガロースゲル電気泳動

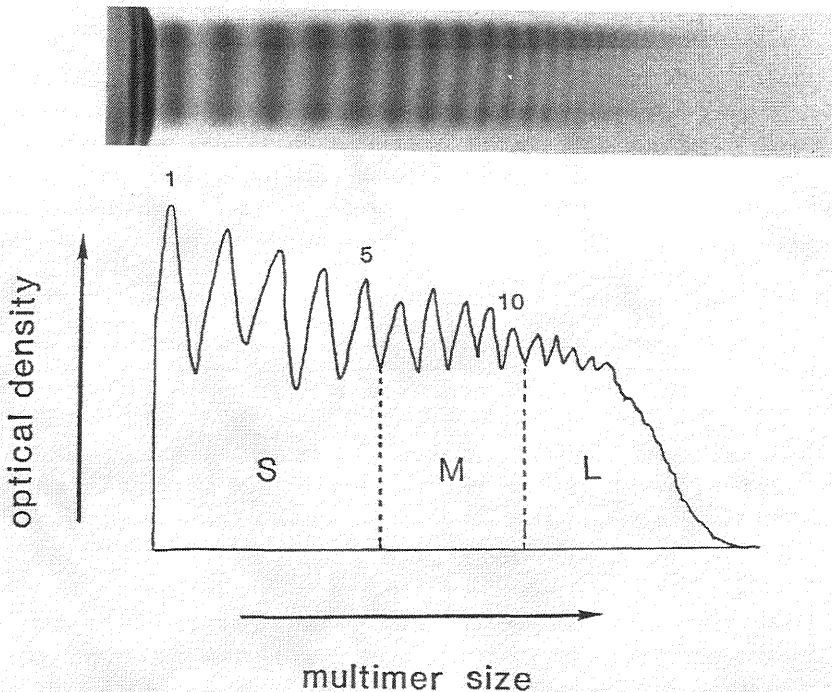


図 1 正常例の vWf マルチマーのデンスチトメータースキャン図
S, M, L はそれぞれ small, medium-sized, large multimer を表わす。

後、免疫ペルオキシダーゼ法にて染色し乾燥後、デントメーターにてスキャンし、マルチマーバンド1~5をsmall (S), 6~10を medium-sized (M), 11以上を large multimer (L) とし、その相対面積 (濃度) を求めて行った (図 1)¹⁾。

さらに ex vivo proteolysis の可能性について検討するため、CMPD (18例) 同一症例よりプロテアーゼ・インヒビター (終濃度でロイペプチン 0.4 mM, N-エルトマレイミド 6 mM, EDTA Na₂ 5 mM) を含むクエン酸血漿 (A群) と含まないクエン酸血漿 (B群) を sampling し、vWf 抗原, RCof, vWf のマルチマー構造について比較検討した。

結果および考案

表 1 に患者背景と結果を示す。白血球数は CML で著増、血小板数は PMF を除く 3 群で増加しており、PMF では著増例は無かった。第Ⅷ因子活性はほぼ正常、vWf 抗原は増加傾向にあるが、生物活性を表わす RCof との比はむしろ、とくに CML, ET において低下していた。vWf マルチマー量では PMF を除いては、small multimer の増加、medium-sized および large multimer の減少が認められた。マルチマーでは、3 群での large multimer の減少が著明で、先の RCof と抗原との比の低下と同様の意味があると思われる。large multimer が 10% 以下に低下していた症例は、CML 67%, PV 47%, ET 63% で、PMF 0% であった。CMPD 全体において、血小板数と large multimer 量の間には逆

相関関係が認められ、各疾患群別に見ても、PMF を除いては逆相関した (図 2)。

データの提示は省略するが、CML の慢性期と急転時の large multimer を比較すると、明らかに慢性期には減少しており、血小板数の減少した急転時にはほぼ正常化した。血小板数の増加したままの症例では、急転時でも large multimer は減少したままだった。また治療により血小板数が正常化すると減少していた large multimer が増加ないしは正常化することが確認された。一方 large multimer は RCof と vWf 抗原との比と正相関しており、このことは、より高分子のマルチマーが生物活性の主役をなしている所見と考えられる。CMPD において vWf のマルチマー異常をきたしやすい理由として、増加した血小板により高分子のマルチマーが結合して消費される可能性も考えられるが、Budde²⁾ や Lopez-Fernandez^ら³⁾ は正常では出てこない fragment bands が存在することより、責任酵素は不明であるが、in vivo proteolysis の存在を示唆している。我々は vWf に影響を与えやすいプラスミンや CMPD で増加するエラスターゼによる分解作用の可能性についてそれぞれ血漿中の複合体濃度との相関をみることにより検討したが、large multimer とはいずれも相関せず、これらは責任酵素の可能性は少ないものと考えられた。次に、ex vivo proteolysis の可能性について A, B 両群について検討した。結果は CMPD 症例も正常対照も vWf 抗原, RCof, vWf マルチマー量いずれも A, B 群で有意差はなく、得られた所見は ex vivo proteolysis によるも

表 1 Clinical and laboratory data of patients with chronic myeloproliferative disorders (CMPD: divided into 4 groups, CML, PV, ET and PMF) and normal subjects. Results are given as mean values ± standard deviations.

| Subjects | Age | WBC (×10 ⁹ /l) | PLT (×10 ⁹ /l) | Ⅷ:C (%) | vWf:Ag (%) | RCof (%) | RCof vWf:Ag | vWf multimers (%) | | |
|---------------|---------------|------------------------------|------------------------------|------------|---------------|-------------|----------------|-------------------|--------------|--------------|
| | | | | | | | | small | medium | large |
| CML (n=21) | 38.0 ±12.9 | 89.6 ±102.0 | 790 ±640 | 96 ±37 | 146 ±65 | 89 ±45 | 0.63 ±0.20 | 68.6 ±10.5 | 23.5 ±6.0 | 7.9 ±5.1 |
| PV (n=15) | 59.9 ±7.2 | 16.8 ±10.1 | 738 ±607 | 89 ±22 | 118 ±28 | 100 ±36 | 0.84 ±0.24 | 64.3 ±13.1 | 25.3 ±6.4 | 8.3 ±7.9 |
| ET (n=16) | 60.4 ±17.0 | 9.3 ±3.1 | 1129 ±526 | 88 ±23 | 116 ±84 | 107 ±88 | 0.74 ±0.43 | 67.5 ±10.6 | 24.5 ±6.4 | 8.0 ±4.9 |
| PMF (n=9) | 59.1 ±3.1 | 16.2 ±16.4 | 227 ±155 | 115 ±63 | 146 ±46 | 130 ±57 | 0.90 ±0.37 | 53.5 ±5.9 | 27.0 ±3.6 | 19.4 ±6.4 |
| normal | | 6.4 ±1.2 | 272 ±59 | 99 ±27 | 98 ±33 | 96 ±22 | 1.04 ±0.14 | 52.5 ±6.3 | 30.6 ±4.2 | 16.9 ±4.0 |

WBC: white blood cell count, PLT: platelet count

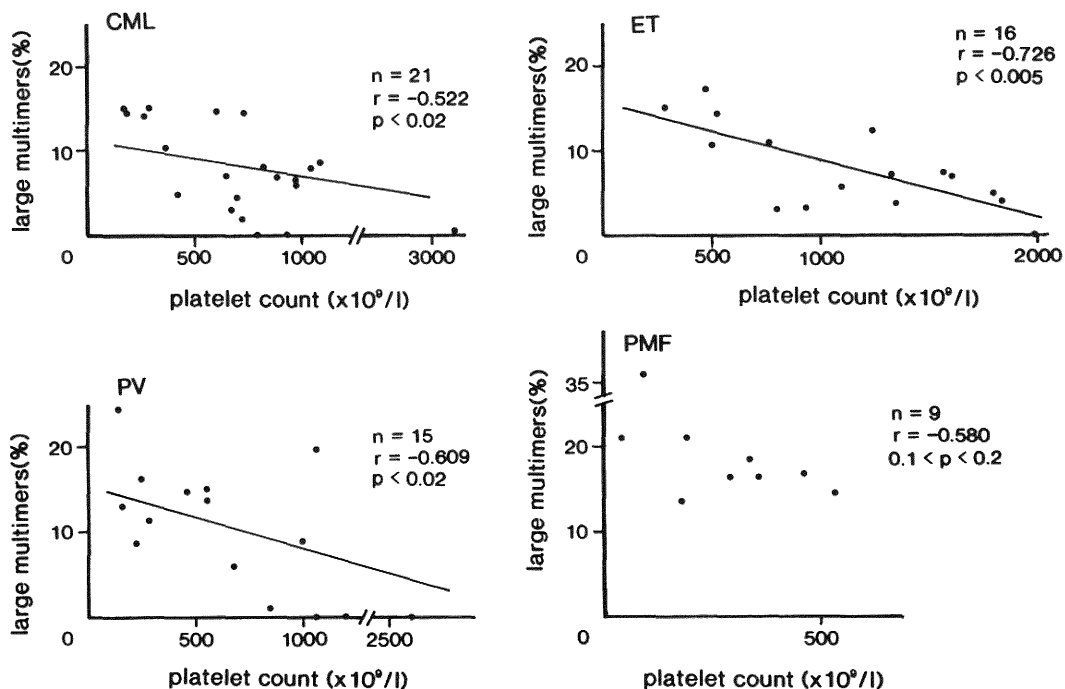


図 2 CMPD の各疾患群における large multimer 量と血小板数との相関関係

のではないと考えられた。

結 語

PMF を除く CMPD では血小板が増加する症例が多く、vWf マルチマーの異常をきたしやすい。この所見はカルパインなどのシステイン・プロテアーゼに対するインヒビターを用いた検討でも変化なく、少なくともシステイン・プロテアーゼによる *ex vivo* proteolysis の可能性はないものと考えられた。今後、セリン・プロテアーゼなどの他の酵素の関与について検討したい。この現象は *in vivo* proteolysis による可能性が高いが、プラスミンやエラスターゼによる作用は否定的で現時点では責任酵素は不明である。

謝 辞

本研究の一部は文部省科学研究費 (No. 63637003, 01637003, 02219103), 厚生省特定疾患血液凝固異常症調査研究費, 新潟県医師会学術奨励金の助成を受けた。

参 考 文 献

- 1) Tatewaki, W., Takahashi, H., Hanano, M. and Shibata, A.: Multimeric composition of plasma von Willebrand factor in chronic myelocytic leukemia. *Thromb. Res.*, 52: 23~32, 1986.
- 2) Budde, U., Dent, J.A., Berkowits, S.D., Ruggeri, Z.M. and Zimmerman, T.S.: Subunit composition of plasma von Willebrand factor in patients with the myeloproliferative syndrome. *Blood*, 68: 1213~1217, 1986.
- 3) Lopez-Fernandez, M.F., Lopez-Berges, C., Martin, R., Pardo, A., Ramos, F.J. and Batlle, J.: Abnormal structure of von Willebrand factor in myeloproliferative syndrome is associated to either thrombotic or bleeding diathesis. *Thromb. Haemostas.*, 58: 753~757, 1987.