

慢性関節リウマチにおける血証と血中フォン・ウィルブランド因子の関連

小野 孝彦,*^{a)} 松本 克彦^{a)} 新井 喜正^{b)} 吉田 光範^{b)} 西本 隆^{b)}
長瀬 千秋^{b)} 田川 和光^{a)} 藤岡 晨宏^{b)}

^{a)}兵庫県立東洋医学研究所, ^{b)}兵庫県立尼崎病院東洋医学科

Relationship between symptom-complex of oriental medicine, Ketsu-shoh (Xue Zheng) and plasma level of von Willebrand factor in Rheumatoid Arthritis

Takahiko ONO,*^{a)} Katsuhiko MATUMOTO^{a)} Yoshimasa ARAI^{b)} Mitsunori YOSHIDA^{b)} Takashi NISHIMOTO^{b)}
Chiaki NAGASE^{b)} Kazumitsu TAGAWA^{a)} and Akihiro FUJIOKA^{b)}

^{a)}Institute for Oriental Medicine, Hyogo

^{b)}Department of Oriental Medicine, Amagasaki Hospital

(Received February 13, 1990. Accepted October 16, 1990.)

Abstract

Thirty-five patients with rheumatoid arthritis (RA) were studied regarding the relationship between the symptom-complex in traditional Chinese medicine and the plasma level of von Willebrand factor (vWF). vWF was higher in the patient group than in the healthy volunteers significantly ($p < 0.01$). Furthermore, patients were divided in two groups according to the symptom-complex Ketsu-shoh (Xue Zheng). A pair of opposing groups consisted of 20 patients of Ketsu-shoh and 15 of non-Ketsu-shoh. The value of vWF was significantly higher in the Ketsu-shoh group than in the non-Ketsu-shoh group ($p < 0.05$). The present data suggest that vWF is related to the symptom-complex of Ketsu-shoh and to the endothelial perturbation in RA patients.

Key words rheumatoid arthritis, von Willebrand factor, factor VIII-related antigen.

Abbreviations RA, rheumatoid arthritis; vWF, von Willebrand factor; Ketsu-shoh (Xue Zheng), 血証.

緒 言

フォン・ウィルブランド因子 (von Willebrand factor, vWF) は内皮細胞や巨核球で合成され^{1,4)} 血漿中で multimer を形成して循環している巨大糖蛋白である^{5,6)}。そして血管が障害された際に血小板の内皮下組織への粘着に関与し⁷⁾、また血液凝固第8因子の carrier protein として働くことが知られ⁸⁾、かつては第8因子関連抗原 (factor VIII-related antigen) と呼ばれていた⁹⁾。

フォン・ウィルブランド病では、vWF の量的な

減少や質的な異常が知られているが^{5,6,10)}、逆に増加する疾患として肝疾患¹¹⁾や腎疾患、ことにネフローゼ^{12,13)}が知られている。さらに膠原病のうちで、特に血管炎を伴うものが高値を呈することが報告されている¹⁴⁾。また vWF の測定が血管内皮機能の指標として有用であることも指摘されている¹⁵⁾。

前報¹⁶⁾において我々は、病態に対する東洋医学の概念である証と血中免疫複合体 (CIC) の関連を慢性関節リウマチ (RA) 患者で検討し、血証群において CIC が有意に上昇していることを報告した。今回は、RA 患者における vWF と血証との関連について検討した。

*〒660 尼崎市東大物町1-1-1
1-1-1 Higashidaimotsu-cho, Amagasaki City,
Hyogo 660, Japan

対象と方法

(1) **対象**：兵庫県立尼崎病院東洋医学科ならびに兵庫県立東洋医学研究所に通院中または入院中で、アメリカリウマチ協会の診断基準（1958）において definite 以上の RA 患者、男 7 例、女 28 例の合計 35 例（年齢 32～71 歳、平均 53 歳）であり、健常者として男 9 例、女 3 例の合計 12 例（年齢 23～37 歳、平均 31 歳）についても対照として比較した。東洋医学的分類として前報¹⁶⁾と同様に、熱、寒、陰虚、水湿、血虚、瘀血、気虚、気滞の項目に分類し、中医学ならびに日本の漢方医学の教科書的記載^{17,18)}に基づき、東洋医学担当医師の四診により証の弁別を行った。そして、あらかじめ採血時にこれらの項目に相当するものを 3 個以内で選択した。同時に血液、生化学、血清学的検査を実施するとともに、血漿の一部を -70℃ にて保存した。また健常者の血漿も同様にして保存した。採血にあたっては、前腕の皮静脈において、駆血帯を使用後、速やかに採血を実施した。なお、血漿の保存期間が 1 年 6 カ月を越えたもののなかには抗原としての活性が減じるものが認められたので、今回の検討では保存期間が 1 年 6 カ月以内の症例に限った。また対象とした患者群からは、明らかな肝、腎機能の異常所見を伴うものは除外した。

(2) **方法**：全検体の vWF の測定は後日、酵素免疫法 (ELISA) により同一時に行った。測定の原理としては、いわゆるサンドイッチ法¹⁹⁾に相当するものである。すなわち、96 穴のマイクロタイタートレイの各ウェルに、pH 9.6 の炭酸緩衝液で 50 倍に希釈した抗ヒト vWF 血清（ヘキスト社）を 100 μ l 加え、4℃ 22 時間で付着させた。0.05 M ホウ酸緩衝液 (pH 7.4) / 0.15 M 食塩水 - 0.05% Tween (BBS-Tween) で 3 回洗浄ののち、BBS-Tween BSA (3%) で 4℃ 3 ブロック。吸引ののち、被検血漿を BBS-Tween で 80 倍に希釈して加えた。Incubation, 洗浄ののち、ペルオキシダーゼで標識した抗ヒト vWF 抗体の IgG-F(ab')₂ 分画を BBS-Tween で希釈して反応させた。37℃ 3 時間 incubation, 3 回洗浄ののち、0.05 M クエン酸-リン酸緩衝液 (pH 6.0) に溶解したオルトフェニレンジアミン (2 mg/ml), 35% H₂O₂ (0.43 μ l/ml) にて 60 分間の incubation で発色させ、492 nm における吸光度を Titertek Multiskan にて測定した。標識抗体の作製にあたっては、抗ヒト vWF 血清（ヘキスト社）をペプシンで 37℃, 16 時間分解し、

ACA 34 (LKB 社) を用いてゲル濾過し、F(ab')₂ を分離した。続いて horseradish peroxidase をメタ過ヨウ素酸を用いて標識し、ゲル濾過により精製した。標準曲線は、あらかじめプールしておいた標準正常血漿を、BBS-Tween で、10, 20, 40, 80, 160, 320 倍に希釈し、被検血漿の代わりに上述の方法で測定して得た値を用いて描いた (Fig. 1)。

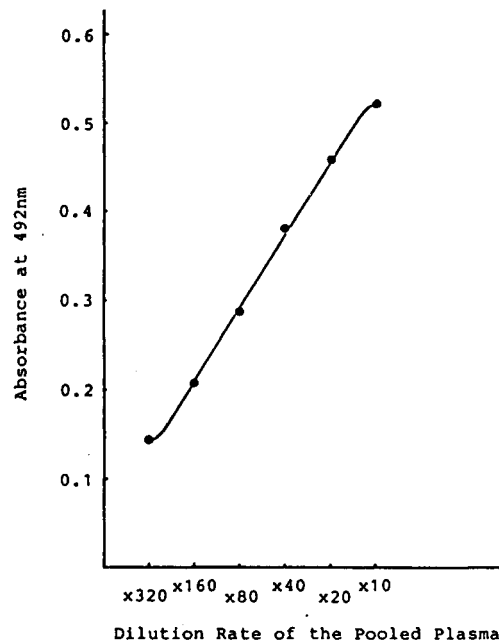


Fig. 1 Standard curve between the dilution rate of the pooled healthy plasma and the absorbance at 492 nm.

そして 80 倍希釈の標準正常血漿中 vWF を 100% と定義し、被検血漿中の濃度を表現した。再現性については、患者および健常者の保存血漿を用いて実施し、良好であった。測定に用いた抗ヒト vWF 抗体の特異性については、すでに Ono T. ら²⁰⁾によって報告されているように、vWF 欠乏血漿 (George King Bio-Medical) を用いて健常者の血漿との反応性の違いにより確認している。

(3) **統計学的検討**：気虚と気滞、血虚と瘀血、陰虚と水湿はそれぞれ対応する概念であるが、単独ないしは、時として両者が同一患者において認められることもしばしばであるので、今回の検討では血証として血虚 and/or 瘀血の項目の群とし、non 血証として血虚や瘀血の項目を 1 つも含まない群とした。そして血証群と non 血証群を比較した。統計学的検討は Wilcoxon の順位和検定を用いた。

結 果

35例のRA患者群全体では、12例の健常者群に比べて、vWF値が有意に高かった ($p < 0.01$, Fig. 2)。35例のRA患者群は、20例の血証群と15例の

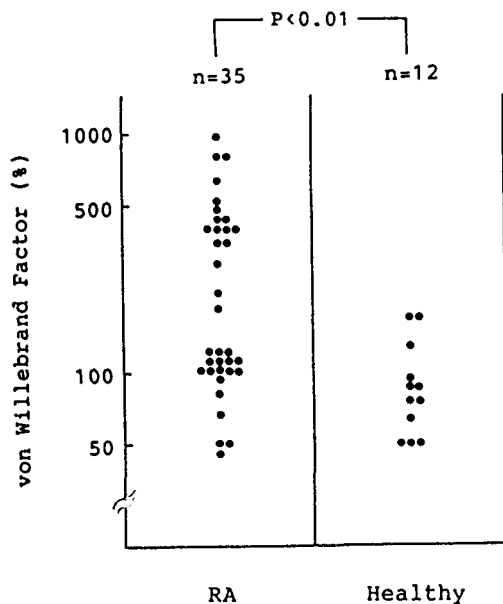


Fig. 2 Plasma levels of von Willebrand factor both in patients and healthy volunteers. The value in the patients group is significantly higher than that of the control group ($p < 0.01$). RA : rheumatoid arthritis.

non血証群に分類された。なお血証群は男5例、女15例、平均年齢54歳、平均のヘマトクリット37.4%、ヘモグロビン12.0 g/dl、総蛋白7.8 g/dl、アルブミン3.6 g/dlであり、RAテストは3例で陰性、17例で陽性であった。Stageについては記載のあった18例においてI, II, III, IVがそれぞれ2, 6, 3, 7例であった。またclassは1, 2, 3, 4がそれぞれ1, 6, 5, 6例であった。さらにnon血証群は男2例、女13例、平均年齢51歳、平均のヘマトクリット35.6%、ヘモグロビン11.5 g/dl、総蛋白7.8 g/dl、アルブミン3.6 g/dlであり、RAテストは1例で陰性、14例で陽性であった。Stageについては記載のあった13例においてI, II, III, IVがそれぞれ3, 2, 3, 4例であった。またclassは1, 2, 3, 4がそれぞれ0, 4, 5, 4例であった。ヘマトクリット、ヘモグロビン値など貧血の程度、およびアルブミン値でみた栄養状態の指標については、両群ともやや低下して

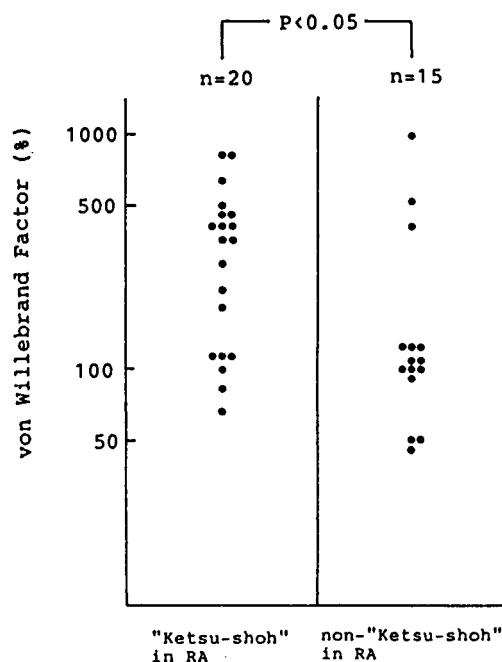


Fig. 3 Comparison of von Willebrand factor between Ketsu-shoh group and non-Ketsu-shoh group. The value in Ketsu-shoh group is significantly higher than that of the non-Ketsu-shoh group ($p < 0.05$). RA : rheumatoid arthritis.

いたが、両群間では特に差は認められなかった。またstage, classについても特に差は認められなかった。

これに対して血証群とnon血証群の間でvWF値を比較すると、血証群ではnon血証群より有意に高値であった ($p < 0.05$, Fig. 3)。6カ月から1年の治療期間の間にvWFの変動を観察できた3症例においては、1例が治療開始時に282%の高値を呈し、治療とともに低下するのが認められた。

考 察

vWFは内皮細胞で合成され¹⁻³⁾、膠原病のうちでは特に全身的な血管炎を伴うものが高値を呈することが報告されている¹⁴⁾。また小林¹⁵⁾によれば、脳血栓症患者、心筋梗塞患者の静脈血中のvWFを5分間うっ血前後で測定し、うっ血により内皮を刺激すると健常者群に比し有意に上昇したことから、vWFの測定が血管内皮機能の指標として有用であると述べている。

一方、vWFの血小板に対する役割⁷⁾や、vWFが

第8因子のcarrier proteinとして働くこと⁸⁾などから、vWFが高値を呈する症例では各種の血栓症をきたし易くなることが考えられる。このことに一致する局所的所見として、Ono T.ら^{20,21)}はある種の腎疾患(膜性腎症)の腎糸球体毛細血管の内皮において、vWFとフィブリン関連抗原が有意に増加していることを免疫電顕によって認めている。

前報告¹⁶⁾において我々は、血証群においてCICが有意に上昇していることを報告した。血証の病態を発現するメカニズムの可能性として、血中のCICが増加するとともに、血管系や血液凝固系に影響を及ぼす可能性が考えられた。そこで今回は、証とvWFの関連について検討した。

なお、証の弁別にあたっては、中医学ならびに日本の漢方医学の教科書の記載^{17,18)}に基づき、東洋医学担当医師の四診により行った。血証の臨床上的特徴として、動悸、眩暈、手足の冷えまたはほてり感、月経の異常、筋痙攣、臍傍の圧痛、皮膚の細絡(毛細血管の部分的拡張)、舌色が帯紫色あるいは瘀点を混じえる等の症状があるが、これらを総合して血証であるかnon血証であるかを採血時に決定した。

その結果、RA患者群全体でも健常者群に比べてvWF値が有意に高く($p<0.01$)、さらに血証群とnon血証群の間の比較でも血証群ではnon血証群より有意に高値であった($p<0.05$)。これに対して血液中のヘモグロビン値は舌や皮膚の色に影響する可能性があるが、今回の検討では両群間で差は認められなかった。またアルブミンやstage, class, その他性別、年齢等でも差はなかった。

vWFは主として血管内皮細胞で合成されることから、¹⁻³⁾vWF高値の症例では内皮の機能が何等かの刺激により亢進しているものと考えられる。逆に血証を呈するRA患者やvWFが異常に高値を呈しているRA患者は、血管炎を伴うRAとして知られている悪性関節リウマチ(malignant RA)の準備状態を呈しているとも考えられ、臨床RAの病態を考える上で注意が必要であると思われる。

vWFの測定法としてはこれまで免疫電気泳動法(ローレル法)が知られているが、今回我々はELISAにより、いわゆるサンドイッチ法¹⁹⁾を用いて行ったが、同様の測定法を高瀬²²⁾が紹介しており、vWFの測定法として適当であると思われる。ただし、血漿の保存期間が1年6カ月を越えたもののなかには抗原としての活性が減じるものがみとめられたので、保存期間が長期になる検体は除外する必要があると思われる。

従来の瘀血に関する報告では、寺沢らにより瘀血病態の一面が全血粘度の亢進状態であるという報告²³⁾や瘀血状態が血小板におけるアラキドン酸代謝に関連しているという報告²⁴⁾がある。今回の我々の検討では、血中のvWFが増加していたことから、血証では血管内皮細胞が刺激を受けて、vWFの産生、放出が亢進していることが示唆された。またvWFの血小板や第8因子への働きも増加している可能性がある。こういったvWFの機能により血液粘度に影響を及ぼす要因も考えられる。

一方、血管内皮細胞が産生する凝固・線溶系に関連した因子としては、vWFの他にtissue-plasminogen activatorやPAI-1等、種々のものが知られている。²⁵⁾今回の検討ではvWFを血管内皮の機能を推測する目安として、瘀血病態と比較検討した。

今回はvWFの保存期間を限定したために、CIC値とvWF値の両者が比較できた症例数が少なく、統計学的に相関を検討することができなかった。治療期間との関連では、3例においてvWFの変動を観察でき、1例が治療開始時に高値を呈し、治療とともに正常化するの認められた。今後さらに漢方治療による証の変動、さらにそれに伴うCICやvWFの挙動との関連、あるいはさらに、血小板機能や凝固・線溶能等についても症例を重ねて検討を行う必要がある。

結 論

①vWFはRA患者群では健常者群よりも有意に高く、さらにRA患者の血証群においてはnon血証群よりも有意に高かった。

②RAにおける東洋医学的な血証の病態とvWFとの関連が示唆され、また血証を呈するRAにおいてはnon血証のRAよりも、血管内皮細胞がより強い刺激を受けている可能性が考えられた。

文 献

- 1) Jaffe, E.A., Hoyer, L.W. and Nachman, R.L.: Synthesis of von Willebrand factor by cultured human endothelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 71, 1906-1909, 1974.
- 2) Lynch, D.C., Williams, R., Zimmerman, T.S., Kirby, E.P. and Livingston, D.M.: Biosynthesis of the subunits of factor VIII by bovine aortic endothelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80, 2738-2742, 1983.
- 3) Wagner, D.D. and Marder, V.J.: Biosynthesis of von

- Willebrand protein by human endothelial cells. *J. Biol. Chem.* **258**, 2065-2067, 1983.
- 4) Nachman, R., Levine, R. and Jaffe, E.A. : Synthesis of factor VIII antigen by cultured guinea pig megakaryocytes. *J. Clin. Invest.* **60**, 914-921, 1977.
 - 5) Hoyer, L.W. : The factor VIII complex : structure and function. *Blood* **58**, 1-13, 1981.
 - 6) Zimmerman, T.S. and Ruggeri, Z.M. : von Willebrand's disease. *Clin. Haematol.* **12**, 175-200, 1983.
 - 7) Sakariassen, K.S., Bolhuis, P.A. and Sixma, J.J. : Human blood platelet adhesion to artery subendothelium is mediated by factor VIII-von Willebrand factor bound to the subendothelium. *Nature (Lond.)* **279**, 636-638, 1979.
 - 8) Weiss, H.J., Sussman, I.I. and Hoyer, L.W. : Stabilization of factor VIII in plasma by the von Willebrand factor. *J. Clin. Invest.* **60**, 390-404, 1979.
 - 9) Zimmerman, T.S., Hoyer, L.W., Dickson, L. and Edgington, T.S. : Determination of the von Willebrand's disease antigen (factor VIII-related antigen) in plasma by quantitative immuno-electrophoresis. *J. Lab. Clin. Med.* **86**, 152-159, 1975.
 - 10) Bloom, A.L. : The von Willebrand syndrome. *Semin. Hematol.* **17**, 215-227, 1980.
 - 11) 久藤 真, 小西正昭, 田中十糸子, 金児大二, 山口哲郎, 別府 恒, 楠瀬 桂, 出口克巳, 井土熊野, 山田外春 : 肝疾患における凝固線溶異常について. *血液と脈管* **8**, 99-104, 1977.
 - 12) Coppola, R., Guerra, L., Ruggeri, Z.M., Tarantino, A., Mannucci, P.M. and Ponticelli, C. : Factor VIII/von Willebrand factor in glomerular nephropathies. *Clin. Nephrol.* **16**, 217-222, 1981.
 - 13) Bennet, A. and Cameron, J.S. : Platelet hyperaggregability in the nephrotic syndrome which is not dependent on arachidonic acid metabolism or on plasma albumin concentration. *Clin. Nephrol.* **27**, 182-188, 1987.
 - 14) Woolf, A.D., Wakerley, G., Wallington, T.B., Scott, D.G.I. and Dieppe, P.A. : Factor VIII related antigen in the assessment of vasculitis. *Ann. Rheum. Dis.* **46**, 441-447, 1987.
 - 15) 小林紀夫 : 血管・血小板相互反応と血管病変. *最新医学* **40**, 2011-2020, 1985.
 - 16) 小野孝彦, 松本克彦, 新井喜正, 吉田光範, 西本 隆, 長瀬千秋, 田川和光, 藤岡晨宏 : 慢性関節リウマチにおける証と血中免疫複合体の関連について. *和漢医薬学会誌* **6**, 177-181, 1989.
 - 17) “中医学基礎” (上海中医学院編, 神戸中医学研究会訳), 療原書店, 東京, pp. 46-58, 205-214, 255-275, 1977.
 - 18) 藤平 健, 小倉重成 : “漢方概論,” 創元社, 大阪, pp. 84-100, 1979.
 - 19) 宮井 潔 : 測定系の種類. “酵素免疫測定法” (石川榮治, 河合 忠, 宮井 潔編), 医学書院, 東京, pp. 30-49, 1978.
 - 20) Ono, T., Kanatsu, K., Doi, T., Sekita, K., Onoe, C., Nagai, H., Muso, E., Yoshida, H., Tamura, T. and Kawai, C. : Ultrastructural distribution of von Willebrand factor in human glomerular diseases. *Nephron* **53**, 311-316, 1989.
 - 21) Ono, T., Kanatsu, K., Doi, T., Sekita, K., Nagai, H., Muso, E., Yoshida, H., Tamura, T. and Kawai, C. : Immunoelectron microscopic localization of fibrin-related antigen in human glomerular diseases. *Nephron* **52**, 238-243, 1989.
 - 22) 高瀬俊夫 : フォン・ウィルブランド因子の測定法 2. フォン・ウィルブランド因子抗原の測定. *検査と技術* **15**, 1283-1287, 1987.
 - 23) 寺沢捷年, 今田屋章, 土佐寛順, 三浦忠道, 伊藤 隆, 坂東みゆ紀 : 駆瘀血剤の血液学的研究—全血粘度に対する効果—. *和漢薬シンポジウム* **16**, 119-125, 1983.
 - 24) Terasawa, T., Toriizuka, K., Bandou, M., Imadaya, A., and Tosa, H. : Effects of medicinal plants on the metabolism of platelet arachidonic acid —Studies on “oketsu” syndrome, platelet aggregation and changes in malondialdehyde values—. *J. Med. Pharm. Soc. WAKAN-YAKU* **2**, 310-316, 1985.
 - 25) 出口克巳, 白川 茂 : 血管内皮細胞機能とその測定. *血液と脈管* **19**, 111-121, 1988.