

後天性血友病XIIIについてのメールアンケート 主治医回答のまとめ(1回目)

2012.1.19 13:00現在

No.	(1)出血するF13活性レベル()%	(2)止血するF13活性レベル()%	(3)トランサミン(あるいはアプロチニン)が止血に効果があったか	(4)他の有効な止血治療があったか ある場合、具体的に;	(5)その他(検査、診断、治療についての御考え、疑問等を具体的に;)
1	10%	20%	有	無	
2	55% 私の症例では2ヶ所目の出血(血圧低下を伴う)で初めて疑って計った結果が52%	わからない	使っていない	無	論文でも、急速に活性が低下していき、結果を待っていると診断が遅れて致命的になる症例があるということは強調したい
3	50%未満	60%以上	有 トランサミン	無	やはりFXIII活性測定の普及が大事
4	10%	20% ただし、ここまで行かなくてもフィブロガミンを投与すると止血することがあるので、必ずしもここまで必要ではないと思う	有	有 フィブロガミンの投与以外にはない。あとは安静	架橋反応を見る検査がないと、実際の臨床には有用ではない(現行の検査による活性では、治療や診断のメルクマールにならない)。後天性のF13欠乏には、リツキサン投与が最も有効と考えますので、使用については早期に認可されるべき
5	50%以下	60%以上	無	有 フィブロガミンP	現在、XIII因子活性の測定法として行われているペリク ロームFXIIIが、凝固反応に影響する活性として判断して良いかどうか分らない。
6	10%	?	有	無 F13大量投与?	抗体価が不明なので、F13が上昇することでしか免疫抑制療法の効果を判定できない(抗体価の低下が分かれば免疫抑制療法の量を調整しやすい)
7	10%	30%? まだ効果はわかりません。	有 多少あり	無	F13製剤補充は、抗体活性化をきたすのか、出血を助長した印象
8	60%	40%	無	無	
9	10-20%	20-30%	多少あり?	無 しかし、FFPを併用した	
10	50%	70%	有	無	フィブロガミンPの適正投与量および投与間隔
11	該当なし	該当なし	該当なし	該当なし	予期せぬ出血の場合、その診断を迅速に行える体制の確立の重要性を痛感
12	20%	30%	当科では出血経験なく不明	当科では出血経験なく不明	当院では凝固因子は外注検査で結果判明に時間がかかるので、結果が速くわかったら良いと思う。
13	50%くらい	わからない	使っていない	有 フィブロガミンは有効	13因子のインヒビターを直ぐ測定できるようにして欲しい
14	3%	10%	無	無	ミキシング試験がどの程度診断に有効か教えていただきたい
15	20%	30%	無	有 フィブロガミンP、ステロイド	問題点…F13活性・抗原の測定に時間がかかること、F13に対するインヒビターの測定が一般化されていないこと、外注検査では抗原と活性の間に乖離があること。また、大学での測定値とSRLでの測定値に大きく乖離があり、正確な評価が難しいこと。 診断…F13活性・抗原の低下。軽微な外力ででの止血しがたい巨大な血腫。圧迫止血を試みても、ほとんど血餅ができず、DICに似た出血がみられる。筋肉内の血腫は、ブルーベリー状で、一部血餅はできるが、不完全な血餅。繰り返す出血。 治療…出血時には、まずフィブロガミンPを使用しての止血が必要。インヒビターが確認されてからは、免疫抑制も必要。
16					
17					
18					

後天性血友病XIIIについてのメールアンケート 主治医回答のまとめ(2回目)

No.	(6)本疾患の止血治療におけるF13濃縮製剤投与の量と期間	(7)本疾患の止血治療における抗線溶薬投与量と期間	(8)抗F13自己抗体に対する免疫抑制薬の投与と期間
1			
2	<p>血漿交換について TTPや肝不全にしろインヒビターや免疫関連タンパクの除去目的で行うが、おおむね置換量=FFP投与=体重(kg)×50uとなるので、本症例では3200ml(40単位)行った。 肝不全の場合では凝固能の上昇などを見て回数・期間を決定するが、おおむね2-3回行う。本症例では4/6に1回行ったが、出血によるvolume lossが進行し2回目を行えないまま死亡となった。</p>		
3			
4	<p>(フィブロガミンP; 1440)単位/日 期間(止血が確認できるまで最低3~5日程度、その後は出血部位に応じて様子を見ながら延長)</p>	<p>(トランサミン; 1500)mg/日 期間(制限なし/濃縮製剤投与、免疫抑制剤投与の治療後も一番最後まで継続する)</p>	<p>(プレドニゾロン)の場合、(1)mg/日 期間(28)日以後漸減 (エンドキサン)の場合、(100)mg/日 期間(28)日 (リツキサン)の場合、(375)mg/m2/回 期間(8)回</p>
5			
6			
7			
8			
9			
10			
11			
12			
13	<p>(人工股関節置換術)出血の場合、(フィブロガミン; 1440)単位/日 期間(5)日</p>		
14			
15	<p>(フィブロガミンP; 1200)単位/日 期間(1/19-21の3日間) (フィブロガミンP; 1440)単位/日 期間(1/24-31,2/9-22の20日間)</p>	<p>(トランサミン; 1000)mg/日 期間(1/13, 1/15-18, 1/27-28の7日間)</p>	<p>(デカドロン)の場合、(33)mg/日 期間(3/10-12の3日間) (プレドニゾロン)の場合、(70)mg/日 期間(3/13-24の12日間) (プレドニゾロン)の場合、(50)mg/日 期間(3/25-31の7日間) (プレドニゾロン)の場合、(40)mg/日 期間(4/1-7の7日間) (プレドニゾロン)の場合、(20)mg/日 期間(4/8-14の7日間) (プレドニゾロン)の場合、(15)mg/日 期間(4/15-21の7日間) (プレドニゾロン)の場合、(10)mg/日 期間(4/22-28の7日間) (プレドニゾロン)の場合、(7.5)mg/日 期間(4/29-5/12の14日間) (プレドニゾロン)の場合、(5)mg/日 期間(5/13-26の14日間) (プレドニゾロン)の場合、(2.5)mg/日 期間(5/27の1日) 計76日間</p>
16			
17			
18			

単位…V=vial=4ml=60u/ml

後天性血友病XIIIについてのメールアンケート 主治医回答のまとめ(3回目)

No.	(9) ①凝固XIII(13)因子活性測定(交叉混合試験)②凝固XIII(13)因子抗原量測定③アルファ2PI活性測定 経理処理が 自己負担になる場合、検査の実施が可能か否か、費用を誰が負担するのか。	(10)インヒビターの可能性がある場合、山形大学(あるいは他の施設)で精査する必要がありますが、検体を冷凍で送付することが可能か否か、費用を誰が負担するのか。(送料は発送者払い。)
1		
2		
3	実施する;具体的なコメント 実施する が本人だけにしたい 検査費用を誰が負担するのか; 施設の研究者負担かと思う。	可能 検査費用を誰が負担するのか; 施設の研究者か。
4	実施する 検査費用を誰が負担するのか; 患者本人に負担してもらう。	可能 検査費用を誰が負担するのか; これは病院で負担
5		
6		
7		
8	実施しない;具体的なコメント 研究費がない。	可能 検査費用を誰が負担するのか; 送料費くらいなら当方で負担
9	実施する 検査費用を誰が負担するのか; 自分の研究費で負担	可能 検査費用を誰が負担するのか; 自分の研究費で負担
10	実施する 検査費用を誰が負担するのか; 当科の研究助成金で負担	可能 検査費用を誰が負担するのか; 当科の研究助成金で負担
11	実施する 検査費用を誰が負担するのか; 私の研究費などから出費 もし、該当する患者がおられましたら、是非診断を付けたいので、検査は実施したい。 費用については、ある程度このような診断しがたい難治性疾患の研究に使用できる受託研究費等あるので、私の研究費などから出費させていただくこととなる。	可能 検査費用を誰が負担するのか; 私の研究費などから出費
12	実施する 検査費用を誰が負担するのか; 病院負担	可能 検査費用を誰が負担するのか; 病院負担
13	実施する 検査費用を誰が負担するのか; 医局費	可能 検査費用を誰が負担するのか; 医局費
14		
15		
16	実施する・実施しない;具体的なコメント 凝固XIII(13)因子活性測定と凝固XIII(13)因子抗原量測定は施行しますが、アルファ2PI活性測定は施行しない。 検査費用を誰が負担するのか; 混合診療が禁止されているので、講座負担で検査	可能 検査費用を誰が負担するのか; 講座が負担
17	実施しない;具体的なコメント ただし、保険適用ある場合は病名を付けて検査する	可能 検査費用を誰が負担するのか; できれば山形大学で
18	実施する 検査費用を誰が負担するのか; 出血疾患であれば、保険診療で1回はXIII因子、アルファ2PI活性測定は可能です。XIII因子については、活性測定か、抗原測定のいずれかになるが、病院の契約上当院では、抗原測定なので(院内測定)、混合試験を含めた活性測定に関しては、研究者負担。(試薬購入してあるが高価なことがマイナスポイント。測定機器の問題からXIII因子活性測定は、簡単ではないが、当院では実施可能。機器の検討も行い、S Journalに報告した。検査を行う場合には、まとめて測定することとなる。)アルファ2PI活性測定に関しても、数種のを測定する場合は、研究者負担となる。(試薬は価格が高いが、機器は汎用機など どの測定機でも可能であるため、どこでも試薬さえあれば検査可能。当院ではルーチンでは外注だが、試薬を購入	可能; 最近Y運輸では、血液などを搬送する際に拒否されることがある。Yバックでは、それらのクレームもなく、送付可能。院内の中のY局に連絡すると、ドライアイスも持ってきてくれる。 検査費用を誰が負担するのか; 簡単に搬送できるが、送料は研究者負担。

(別添様式)

未承認薬・適応外薬の要望

1. 要望内容に関連する事項

要望者 (該当するものにチェックする。)	<input checked="" type="checkbox"/> 学会 (学会名 ; 「後天性血友病 XIII の実態調査、発症機序の解明と治療方法の開発」研究班) <input type="checkbox"/> 患者団体 (患者団体名 ;) <input type="checkbox"/> 個人 (氏名 ;)	
優先順位	1 位 (全 1 要望中)	
要望する医薬品	成分名 (一般名)	ヒト血液凝固第 XIII 因子
	販売名	フィブロガミン P 静注用
	会社名	CSL ベーリング
	国内関連学会	日本血栓止血学会 (選定理由) 止血学を専門領域とする我が国で唯一の学術団体である。
	未承認薬・適応外薬の分類 (該当するものにチェックする。)	<input type="checkbox"/> 未承認薬 <input checked="" type="checkbox"/> 適応外薬
要望内容	効能・効果 (要望する効能・効果について記載する。)	後天性血液凝固第 XIII 因子欠乏症による出血傾向
	用法・用量 (要望する用法・用量について記載する。)	1 日量 4~20mL を緩徐に静脈内投与する。なお、年齢、症状、欠乏の原因 (インヒビターなど) により適宜増減する。
	備考 (該当する場合はチェックする。)	<input type="checkbox"/> 小児に関する要望 (特記事項等)
「医療上の必要性に係る基準」への該当性	1. 適応疾病の重篤性 <input checked="" type="checkbox"/> ア 生命に重大な影響がある疾患 (致死的な疾患) <input type="checkbox"/> イ 病気の進行が不可逆的で、日常生活に著しい影響を及ぼす疾患 <input type="checkbox"/> ウ その他日常生活に著しい影響を及ぼす疾患 (上記の基準に該当すると考えた根拠)	

Ⅲ. 分担研究報告

分担課題：後天性血友病 XIII(13)症例にみられる FXIII インヒビターの生化学的特徴

研究分担者 惣宇利 正善 山形大学医学部 講師

研究要旨

今年度、新たに 2 例の後天性血友病 XIII(13)患者を同定した。これまでに同定された凝固第 XIII 因子 (FXIII) インヒビター 16 例について、ベセスダ法にて力価を測定した。活性化 FXIII のアミン取込み活性について、2 例の FXIII インヒビターは強い阻害 (62%, 85%阻害) を認めた一方、多くのインヒビターは 40%以下の弱い阻害を示し、全く阻害しないものも認められた。トロンビン依存性の A サブユニット (FXIII-A) からの B サブユニット (FXIII-B) の解離については、13 例の抗 FXIII-A 抗体症例で阻害が確認された。さらに、13 例の抗 FXIII-A 抗体は異種四量体形成を強く阻害した。

A. 研究目的

後天性血友病 XIII(13) [Autoimmune/acquired hemorrhaphilia-13 (AH-13)] は、凝固第 XIII 因子 (FXIII) の酵素部位である A サブユニット (FXIII-A) もしくは血漿中での FXIII-A の安定化に働く B サブユニット (FXIII-B) いずれかに対する自己抗体 (インヒビター) を生じた結果、出血性素因を呈する後天性 FXIII 欠乏症である。昨年度までに 15 例の AH-13 症例を同定し、13 例に抗 FXIII-A 抗体、2 例に抗 FXIII-B 抗体が存在すること、患者血漿において FXIII-A 抗原の有無にかかわらずアミン取込み活性および異種四量体量が著しく低下していること、11 例の抗 FXIII-A 抗体がトロンビンによる活性化ペプチドの切断ならびにフィブリン架橋反応を強く阻害することを明らかにしている。また、1 例の抗 FXIII-A 抗体について、異種四量体形成不全を引き起こすことを見出している。

今年度は後天性 FXIII 欠乏症 13 例を精査し、2 例の AH-13 患者を同定した。計 17 例のうち、血漿が残存する 16 例の FXIII インヒビターに

ついて、それぞれの力価を比較した。また、活性化のみならず、活性化後のトランスグルタミナーゼ活性をインヒビターが阻害するか、検討した。さらに、AH-13 血漿中の異種四量体量が著減していることから、異種四量体形成への FXIII インヒビターの影響についても解析した。

B. 研究方法

AH-13 患者の同定 組換え体 FXIII-A (rFXIII-A) と組換え体 FXIII-B (rFXIII-B) およびペルオキシダーゼ標識抗ヒトイムノグロブリン抗体を用いたドットブロッキングにより、抗 FXIII-A もしくは抗 FXIII-B 抗体を検出した。インヒビターの力価 ベセスダ法に則り、患者血漿を段階的に FXIII 欠乏血漿で希釈し、健常血漿と混合し 2 時間インキュベートした後、モノダシルカダベリン (MDC) および N,N-ジメチルカゼイン (dmC) を基質としてアミン取込み活性を測定した。

活性化 FXIII 触媒活性への阻害効果 rFXIII-A をトロンビンと反応させた後、ヘパリンを添加して活性化 FXIII (rFXIII-A') 標品とした。rFXIII-A'

を患者血漿とインキュベートした後、MDC-dmCアミン取込み活性を測定した。

トロンビン依存性 FXIII-B 解離への影響 rFXIII-A と rFXIII-B を 1 : 1 で混合し、異種四量体 (rA₂B₂) を調製した。rA₂B₂ を患者血漿とインキュベート後、CaCl₂ とともにトロンビンを反応させた。抗 FXIII-A 抗体を固相化した ELISA プレートおよび抗 FXIII-B 抗体を用いて、rFXIII-A と結合している rFXIII-B の量を測定した。

異種四量体形成への影響 rFXIII-A (もしくは rFXIII-B) を患者血漿とインキュベート後、rFXIII-B (もしくは rFXIII-A) を添加して 30 分間反応させた。抗 FXIII-A 抗体を固相化した ELISA プレートおよび抗 FXIII-B 抗体を用いて、rFXIII-A と結合している rFXIII-B の量を測定した。

(倫理面への配慮)

本研究では、重篤な出血症状を呈する症例の検体を使用して、各種の検査やタンパク質化学的実験を行うので、21 年度に山形大学の倫理委員会の承認を得ており、各主治医が症例あるいはその家族から文書による同意を得た。

また、22、23 年度に動物における実験を実施した。各種の KO マウスを使用するため、本学の遺伝子組換え実験安全委員会の許可を得ている。

倫理規定の遵守：新 GCP の倫理規定 (1997) を遵守し施行した。作成された統一の研究計画書の内容に関し各施設ごとで倫理委員会の承認を得た。

臨床研究参加における任意性の確保：本臨床試験への自発的意志に基づき同意が得られた症例のみを対象とした。なお、研究過程の如何なる時点における離脱も許容され、そのことにより診療上不利益を受ける事の無い旨明記した。

個人情報漏洩に対する防御：得られた情報は分類番号を付し個人が同定されないようにし一意の者が厳重に管理している。

個人情報秘匿の担保：本研究で得られた成果の取り扱い個人情報保護法に準拠した。

検体使用目的に関する制限：検体の売買あるいは検体の本研究目的以外の使用は一切行っていない。

情報開示義務：本研究で得られた情報は対象者が希望する場合、結果が得られているものについては知見解釈を含めて原則全面開示としている。

実験動物の取り扱い：「動物の愛護及び管理に関する法律」及び「カルタヘナ議定書趣旨」に準拠

している。

C. 研究結果

1. AH-13 患者の同定 13 例の AH-13 疑い症例を精査したところ、2 例に抗 FXIII-A 抗体が検出された。2 例共に血漿中の FXIII-A 抗原が正常の 50~60% 存在するにもかかわらず、アミン取込み活性は 25% 以下であり、A₂B₂ は検出されなかった。また、混合試験において強いアミン取込み活性の阻害パターンを示し、フィブリン架橋反応にも著しい遅延が認められた。

2. インヒビターの力価 アミン取込み活性によりインヒビターの力価を測定したところ、抗 FXIII-A 抗体陽性 (AH-13A) の 14 症例では 0.03~9.75 BU/mL と、症例間で大きく力価が異なっていた。抗 FXIII-B 抗体陽性 (AH-13B) の 2 例では活性の阻害は認められなかった。

3. 活性化 FXIII 触媒活性への阻害効果 AH-13A 症例 8 と 15 に強い阻害 (62, 85%) が認められ、症例 1, 5, 17 にやや強い阻害 (35, 29, 41%) が検出された。

4. トロンビン依存性 FXIII-B 解離への影響 トロンビンにより FXIII-A の活性化ペプチドが切断されると、Ca イオン存在下で FXIII-B が FXIII-A から解離する。症例 15 を除く AH-13A 症例の FXIII インヒビターは、トロンビン依存性 FXIII-B の解離を阻害した。症例 11 ではトロンビンに対するインヒビターを併発しているため、FXIII-B の解離がほとんど認められなかった。一方、AH-13B のインヒビターによる阻害は検出されなかった。

5. 異種四量体形成への影響 FXIII-A (あるいは FXIII-B) 欠乏血漿に rFXIII-A (もしくは rFXIII-B) を添加した場合、内在および添加した FXIII-B (もしくは FXIII-A) と異種四量体を形成することを確認した。症例 8, 15 を除く AH-13A 症例において、あらかじめ血漿と rFXIII-A を反応させた後に rFXIII-B を添加しても、異種四量体は検出されなかった。一方、症例 8, 15 および AH-13B 症例の血漿においては、異種四量体の形成は阻害されなかった。

D. 考察

FXIII インヒビターは、FXIII の活性化を阻害する I 型、活性化した FXIII のトランスグルタミナーゼ活性を阻害する II 型、およびフィブリン基質に直接結合して架橋反応を阻害する III 型に分類されている (Lorand, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 202: 6-30, 1972)。昨年度までの結果から、症例 8 と 15 を除く AH-13A 症例は、ト

ロンビンによる活性化ペプチドの切断を阻害する I 型インヒビターを保有することが判明している。今年度の解析から、I 型インヒビターはまた、異種四量体形成を強く阻害することが新たに判明した。FXIII-A と FXIII-B は異なる細胞で産生され、血液中で異種四量体を形成する故、症例の血漿に残存している FXIII-A は、FXIII-B とではなくインヒビター (IgG) と複合体を形成していることをゲル濾過解析にて確認している。単球/マクロファージ、巨核球/血小板等の細胞内では FXIII-A が FXIII-B とは独立して存在していることから、何らかの病的なきっかけでこれらの細胞から放出された FXIII-A に対して抗体が産生されたものと推測される。

活性化 FXIII のアミン取込み活性阻害の程度が軽度であるにもかかわらず、フィブリン架橋反応 (γ 鎖間架橋反応) を著しく遅延させることから、I 型インヒビターは、FXIII-A と結合することで、高分子量なタンパク質 (トロンビン、フィブリンおよび FXIII-B) との結合を妨害することが強く示唆される。なお、I 型インヒビターによるトロンビン依存性 FXIII-B 解離の阻害は、活性化ペプチド切断の阻害を反映したものと考えられる。

本年度はまた、症例 8 および 15 が保有する FXIII インヒビターが、活性化 FXIII のトランスグルタミナーゼ活性を阻害する II 型であることを確定した。II 型インヒビター症例において、フィブリン α 鎖間の架橋反応の遅延は認められるものの、 γ 鎖間の架橋は正常と同様であることは興味深い。 γ 鎖間の架橋結合は 1~2 分で完了するのに対して、 α 鎖の架橋反応は時間単位で進行することから、FXIII の酵素反応における、 γ 鎖と α 鎖との反応様式 (酵素—基質複合体形成様式) の違いが予想される。

II 型インヒビター症例の確定から、AH-13 の診断における酵素活性測定法の問題点が浮き彫りにされた。初期検査に用いられたアンモニア放出法では、混合試験において阻害が検出されていなかったにもかかわらず、アミン取込み法では著しい阻害が検出された。一方、I 型インヒビター症例では、アンモニア放出法では強い阻害が報告されたのに対してアミン取込み法では阻害が認められなかった症例も存在した。現段階では、フィブリン架橋反応の測定を一般的に行なうことは困難であり、アンモニア放出法とアミン取込み法の併用が望ましい。

E. 結論

新たに 2 例の AH-13 症例を同定した。I 型 FXIII インヒビターはトロンビンによる活性化ペプチドの切断のみならず、異種四量体の形成を阻害することを見出した。また、2 例の FXIII インヒビターについて、活性化 FXIII のトランスグルタミナーゼ活性を阻害する II 型であることを確定した。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- (1) Fujii N, Souri M, Ichinose A. A short half-life of the administered factor XIII (FXIII) concentrates after the first replacement therapy in a newborn with severe congenital FXIII deficiency. *Thromb Haemost.* 2011; in press. [Epub ahead of print]
- (2) Ichinose A, Souri M. Reduced difference of a(2)-plasmin inhibitor levels between plasma and serum in patients with severe factor XIII deficiency, including autoimmune hemorrhaphilia due to anti-factor XIII antibodies. *Int J Hematol.* 2012;95(1):47-50.
- (3) Ichinose A, Souri M; Japanese collaborative research group on "Acquired haemorrhaphilia due to factor XIII deficiency". As many as 12 cases with haemorrhagic acquired factor XIII deficiency due to its inhibitors were recently found in Japan. *Thromb Haemost.* 2011;105(5):925-7.
- (4) 菅原宏文, 鈴木宗三, 惣宇利正善, 小嶋哲人, 一瀬白帝: 東北地方における血友病インヒビター調査のまとめ. *山形医学*, 2011; 29(2): 37-44.

2. 学会発表

(1) 国際学会

- 1) Murata K, Ikeda M, Souri M, Ichinose A: Unexplained post-operational bleeding in a patient with anti-factor XIII B subunit antibody (P-TH-551). XXIII Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis (ISTH2011) and 57th Annual SSC Meeting, July 23-28, 2011,

Kyoto, Japan.

- 2) Kaneko M, Kanno N, Suzuki A, Tanaka R, Souri M, Yatomi Y, Ichinose A. A novel quick point of care test of coagulation factor XIII activity based on clot retraction in humans (P-WE-567). XXIII Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis (ISTH2011) and 57th Annual SSC Meeting, July 23-28, 2011, Kyoto, Japan.
- 3) Fujii N, Souri M, Shima M, Tomoyasu C, Isoda K, Ichinose A. Markedly shortened half-life of the administered factor XIII (FXIII) concentrates during first replacement therapy in a newborn with severe congenital FXIII deficiency (P-TU-206). XXIII Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis (ISTH2011) and 57th Annual SSC Meeting, July 23-28, 2011, Kyoto, Japan.
- 4) Ishida F, Okubo K, Ito T, Okumura N, Souri M, Ichinose A: Discrepancy between activity and antigen levels of factor (F) XIII concentrates in hemorrhagic acquired FXIII deficiency due to its autoantibody (P-MO-204). XXIII Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis (ISTH2011) and 57th Annual SSC Meeting, July 23-28, 2011, Kyoto, Japan.
- 5) Souri M, Iwata H, Zhang WG, Ichinose A: Biochemical characterization of anti-factor XIII autoantibodies in patients with hemorrhagic acquired factor XIII deficiency (O-MO-122). XXIII Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis (ISTH2011) and 57th Annual SSC Meeting, July 23-28, 2011, Kyoto, Japan.

(2) 国内学会

- 1) Ogawa Y, Uchiumi H, Yanagisawa K, Nojima Y, Souri M, Ichinose A : An acquired factor XIII/13 deficiency due to an inhibitor against FXIII/13 B subunit. 第 73 回日本血液学会学術集会, 名古屋 ; 2011 年 10 月 14-16 日 (PS-2-71)
- 2) 惣宇利正善, 一瀬白帝 : 生体内における細胞内凝固 XIII 因子 A サブユニットの新たな

機能. 第 84 回日本生化学会大会シンポジウム [1S14p トランスグルタミナーゼ (タンパク質架橋化酵素) の進化と機能分化], 京都 ; 2011 年 9 月 21-24 日

(3) 研究会

- 1) 惣宇利正善, 一瀬白帝 : 凝固 XIII 因子 A サブユニット欠損マウスにおける血球の分化について. 山形大学医学部実験動物セミナー第 22 回研究成果発表会, 山形 ; 2011 年 12 月 8 日
- 2) 惣宇利正善, 一瀬白帝 : 血球の分化における凝固 XIII 因子 A サブユニットの関与について. 第 19 回山形分子生物学セミナー, 山形 ; 2011 年 11 月 16 日
- 3) 惣宇利正善, 一瀬白帝 : 生体内における細胞内凝固 XIII 因子 A サブユニットの新たな機能. 第 4 回トランスグルタミナーゼ研究会 & 日本ポリアミン学会合同学術集会, 京都 ; 2011 年 9 月 20 日
- 4) 張 偉光, 惣宇利正善, 岩田宏紀, 一瀬白帝 : 妊娠期の止血における凝固第 XIII 因子陽性細胞の存在意義. 第 9 回血液・血管オルビス, 東京 ; 2011 年 8 月 20-21 日

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

特記事項なし。

平成 23 年度 厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
分担研究報告書

分担課題：抗体の病態に及ぼす影響

研究分担者 山本正雅 奥羽大学薬学部生化学分野 准教授

研究要旨

後天性血友病 XIII(13)患者に発生した抗 XIII 因子抗体の性質を知ること、患者由来の抗体を常時・普遍的に使えるようにするためにモノクローナル抗体の作製が考えられる。患者末梢リンパ球を融合パートナー細胞 SPYMEG と融合させモノクローナル抗体として作製する方法は、既にインフルエンザ感染患者から、抗ウイルス抗体が作製されている。本法を用いて、抗 XIII 因子抗体の作製を試行した。本年度は 2 例より血液の提供を受けたが、抗体作製の成功には至らなかった。

A. 研究目的

後天性血友病 XIII(13)患者に発生した抗 XIII 因子抗体の性質を知ること、この患者由来の抗体を常時・普遍的に使えるようにすることは、本病態の解明に役立つと考えられる。ヒトモノクローナル抗体の作製は、その一つの手段である。患者末梢リンパ球を融合パートナー細胞 SPYMEG と融合させたハイブリドーマを作製し、ヒトモノクローナル抗体として作製する方法は、既にインフルエンザ感染患者や後天性血小板無力症患者から、抗ウイルス抗体や抗 GPIIb/IIIa 抗体の作製に成功している。しかし、血友病 A 患者からの抗第 VIII 因子抗体作製は成功に至っていない。本研究では後天性血友病 XIII(13)症例から抗 XIII 抗体作製を試行した。

B. 研究方法

細胞融合が可能であった抗第 13 因子抗体陽性の患者の数は 2 症例であった。患者末梢リンパ球を SPYMEG と融合し、ELISA プレート 2~4 枚に培養し上清の抗 XIII 因子活性をスクリーニングした。融合培養は本大学で行い、抗体活性のスクリーニングは山形大学で行なった。一部の実験には、融合後 Beads にフィブロガミンを吸着させた後、吸着した細胞を培養する方法を試行した。

(倫理面への配慮)

採血前に研究内容を説明しインフォームドコンセントを得た。

C. 研究結果

本年度は 2 症例より血液の提供を受けた 1 症例(山田赤十字病院)の細胞融合を行ったが、モノクローナル抗体の作製には至らなかった。他の 1 症例は東日本大地震当日であったために融合を断念した。

D. 考察

抗体の作製ができなかった理由を考察すると、

- ① リンパ球の回収の効率・融合効率の限界
- ② ハイブリドーマの抗体産生の停止
- ③ 採血から融合までの時間の短縮化の限界
- ④ 末梢血に存在する抗体産生細胞数が少ない

などが上げられる。今後、これらの反省を踏まえ改良を行い、より効率の良い方法で行う必要があると考えられる。

E. 結論

後天性血友病 XIII(13)患者より、抗 XIII 因子抗体の作製は成功しなかった。今後、治療に

貢献できる効率の良い SPYMEG を用いた抗体作製方法に改良し、抗体作製を達成したい。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

2. 学会発表

Khoji Kasahara, Mizuho Kaneda,
Toshiaki Miki, Kazuko Iida, Hidenori
Suzuki, Yuta Hara, Motoyuki
Shimonaka, Morio Arai, Toshihide
Kobayashi, Akitada Ichinose, Naomasa
Yamamoto : Translocation of fibrin and
myosin into platelet membrane rafts is
an important process for clot retraction
via a functional property of GPIIb/IIIa.
Congress of the International Society on
Thrombosis and Haemostasis (Kyoto,
2011/06/23-2011/06/28)

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

2. 実用新案登録

3. その他

平成 23 年度厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
分担研究報告書

分担課題：造血幹細胞移植における第 XIII 因子の変動と病態に関する研究

研究分担者 坂田洋一（自治医科大学医学部分子病態研究部 教授）

研究協力者 窓岩清治（自治医科大学医学部分子病態研究部 講師）

研究要旨：

後天性第 XIII 因子欠乏症の分子病態の解析と止血血栓学的臨床研究を目的として、造血幹細胞移植と第 XIII 因子の動態に関する研究を進めた。自治医科大附属病院血液内科で施行された幹細胞移植患者 53 例（年齢 43.1 ± 13.6 歳、男性 23 例、女性 30 例、基礎疾患：急性骨髄性白血病 25 例、悪性リンパ腫 13 例、骨髄異形成症候群 9 例等、移植方法：血縁者間同種骨髄移植 33 例、末梢血肝細胞移植 11 例、非血縁者間同種骨髄移植 5 例等）について、移植前第 7 病日から移植後第 70 病日まで第 XIII 因子活性および抗原量を経時的に測定した。移植後 1 年以内の死亡群（ $n=19$ ）は、移植後 1 年以上の生存群（ $n=34$ ）に比較して、移植後に低下する第 XIII 因子活性の回復が遅延しており（移植後第 28 病日第 XIII 活性； 64.3 ± 33.8 vs $83.1 \pm 33.1\%$, $p=0.036$ ）、第 XIII 活性と移植後病態が密接に関連することを明らかにした。

A. 研究目的

血液凝固第 XIII 因子（以下第 XIII 因子と略す）は、A サブユニットと B サブユニットからなるヘテロテトラマー（ A_2B_2 ）である。第 XIII 因子は、フィブリン分子間および α_2 -プラスミンインヒビターのフィブリン分子への架橋形成による血栓安定化作用や抗線溶作用を有するとともに、フィブロンectin やコラーゲン分子の架橋反応による創傷治癒にも重要な役割を有する。第 XIII 因子 A サブユニットは、脳以外の細胞で産生されるが、特に骨髄巨核球や単球がその主産生細胞であることから、第 XIII 因子の動態は生体内における造血能と密接に関与する可能性がある。本研究では後天性凝固第 XIII 因子欠乏症の分子病態の解析と止血血栓学的臨床研究を視野に入れ、造血幹細胞移植症例における第 XIII 因子の動態を明らかにすることを目的とする。

B. 研究方法

自治医科大附属病院血液科および輸血細胞

移植部との共同研究により、本学附属病院で 2006 年 6 月から 2008 年 9 月までの期間で実施された造血幹細胞移植症例を対象とした consecutive study に登録された患者 57 例のうち、移植中止例を除く 53 例（年齢 43.1 ± 13.6 歳、男性 23 例、女性 30 例）について、第 XIII 因子活性値および同抗原量を移植前第 7 病日から移植後第 70 病日まで経時的に測定した。

第 XIII 因子活性は合成器質法により、第 XIII 因子抗原量は抗ヒト第 XIII 因子ウサギポリクローナル抗体を用いたラテックス凝集法により定量した。

（倫理面への配慮）

本研究は、「自治医科大学疫学研究倫理審査委員会」で承認された臨床研究である。

C. 研究結果

造血幹細胞移植の基礎疾患は、急性骨髄性白血病 25 例、非ホジキンリンパ腫 13 例、骨髄異形成症候群 9 例、その他 6 例であった。

造血幹細胞移植方法は、非血縁者間同種骨髄移植が 33 例、臍帯血幹細胞移植が 11 例、血縁者間同種骨髄移植が 5 例、末梢血幹細胞移植が 4 例であった。

造血幹細胞移植症例における第 XIII 因子抗原量および活性値は、前処置開始日から移植第 7 病日目まで漸減するものの、幹細胞の生着に伴い徐々に移植前値まで回復した (図 1)。

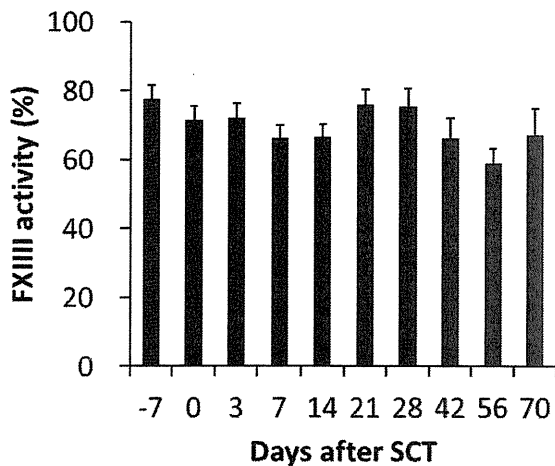


図 1. 造血幹細胞移植後の第 XIII 因子活性値の推移 (n=53)

造血幹細胞移植 1 年後の生命予後を指標に生存群と死亡群に分類すると、移植後 1 年以内の死亡群 (n=19) は移植後 1 年以上の生存群 (n=34) に比較して、移植後の第 XIII 因子活性の回復が有意に遷延していた (移植後第 28 病日第 XIII 活性; 64.3 ± 33.8 vs $83.1 \pm 33.1\%$, $p=0.036$)。

D. 考察

第 XIII 因子活性値は、造血幹細胞移植における移植前処置に伴うレシピエントの残存造血能とともに、ドナー造血幹細胞の生着にともなう新規造血動態と強い関連性を示し、第 XIII 因子活性が骨髄生着の指標となる可能性がある。

造血幹細胞移植後 1 年以内の死亡群は、移植後の第 XIII 因子活性の回復が有意に遷延化していた。第 XIII 因子 B サブユニットが肝細胞で産生されることから、主に単球巨核球において産生される A サブユニットの造血能の低下による影響とともに、第 XIII 因子活性の低下が移植後の生命予後に関わる治療関連毒性、肝中心静脈閉塞症、閉塞移植片宿主病

(graft versus host disease: GVHD)、重症感染症、再発および血栓性微小血管障害などによる産生障害を反映している可能性があり、第 XIII 因子の動態を把握することが造血幹細胞移植医療に極めて重要であることが示唆された。

E. 結論

造血幹細胞移植症例における第 XIII 因子の変動と病態の臨床解析により、第 XIII 活性と移植後病態とが密接に関連することが示された。造血幹細胞移植に伴う第 XIII 因子の動態とその意義をさらに明らかにするために、1) 移植前処置によるレシピエント造血組織の破壊やドナー幹細胞生着過程との関連、2) GVHD および感染症との関連、3) 造血幹細胞移植に伴う免疫応答の変動との関連に着目し、研究を展開する予定である。

F. 健康危険情報

特記事項なし。

G. 研究発表

1. 原著論文

Madoiwa S, Kobayashi E, Kashiwakura Y, et al. Immune response against serial infusion of factor VIII antigen through an implantable venous-access device system in haemophilia A mice. *Haemophilia: the official journal of the World Federation of Hemophilia* 2011.

Ohmori T, Yano Y, Sakata A, et al. Lack of association between serum paraoxonase-1 activity and residual platelet aggregation during dual anti-platelet therapy. *Thrombosis research* 2011.

Madoiwa S, Tanaka H, Nagahama Y, et al. Degradation of cross-linked fibrin by leukocyte elastase as alternative pathway for plasmin-mediated fibrinolysis in sepsis-induced disseminated intravascular coagulation. *Thrombosis research* 2011; 127: 349-55.

Watanabe H, Madoiwa S, Sekiya H, et al. Predictive blood coagulation markers for early diagnosis of venous thromboembolism after total knee joint replacement. *Thrombosis research*

2011;128:e137-43.

Dokai M, Madoiwa S, Yasumoto A, et al. Local regulation of neutrophil elastase activity by endogenous alpha1- antitrypsin in lipopolysaccharide- primed hematological cells. Thrombosis research 2011; 128: 283-92.

Kurosaki H, Hiratsuka M, Imaoka N, et al. Integration-free and stable expression of FVIII using a human artificial chromosome. Journal of human genetics 2011; 56:727-33.

2. 学会発表

Yoichi, Sakata., Hoyu, Takahashi., Hajime, Tsuji., Jun, Mimuro., Yutaka, Eguchi., Isao, Kitajima., Tadashi, Matsusita., Tatsuhiko, Kuroda.: Post marketing surveillance of the safety and effectiveness of thrombomodulin alfa in Japanese patients with DIC. ISTH2011. XXIII Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis.57th Annual SSC Meeting. 2011.7/23-28.京都.

Seiji, Madoiwa., Hideyuki, Tanaka., Yutaka, Nagahama., Atsushi, Yasumoto., Asuka, Sakata., Yuji, Kashiwakura., Tsukasa, Ohmori., Jun, Mimuro., Yoichi, Sakata.: Leukocyte elastase as an alternative pathway for fibrinolysis. 57th Annual SSC Meeting. 2011.7/23-28.京都.

Seiji, Madoiwa., Hideyuki, Tanaka., Yutaka, Nagahama., Yuji, Kashiwakura., Asuka, Sakata., Atsushi, Yasumoto., Tsukasa, Ohmori., Jun, Mimuro., Yoichi, Sakata.: Degradation of cross-linked fibrin by leukocyte elastase as alternative pathway for plasmin-mediated fibrinolysis in sepsis-induced disseminated intravascular coagulation. ISTH2011. XXIII Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis. 57th Annual SSC Meeting. 2011.7/23-28.京都.

Yuji, Kashiwakura., Tsukasa, Ohmori., Jun, Mimuro., Atsushi, Yasumoto., Akira,

Ishiwata., Asuka, Sakata., Seiji, Madoiwa., Makoto, Inoue., Mamoru, Hasegawa., Natsumi, Watanabe., Kohei, Tatsumi., Kazuo, Ohashi., Teruo, Okano., Yoichi, Sakata.: Intra-articular injection of autologous mesenchymal stem cells ameliorates hemophilic arthropathy in factor VIII-deficient mice. ISTH 2011. XXIII Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis. 57th Annual SSC Meeting. 2011.7/23-28.京都.

Seiji Madoiwa Alternative pathway for fibrinolysis: Clinical significance and therapeutic opportunities, leukocyte elastase. ISTH2011. XXIII Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis. 57th Annual SSC Meeting. 2011.7/23-28.京都.

H. 知的財産権の出願・登録状況
(予定を含む。)
特記事項なし。

分担課題：血餅退縮能を用いた血液凝固第 XIII 因子活性測定（迅速簡易測定法の開発と臨床応用）

研究分担者 矢富 裕 東京大学大学院医学系研究科 臨床病態検査医学 教授

研究要旨

後天性血友病 XIII(13)症例の発掘，その分子機序の解明へ貢献するために，迅速に臨床診断や治療モニタリングすることの可能な臨床検査法の確立を本研究の目的とした．平成 22 年度に本研究事業で，血餅退縮検査が FXIII 活性迅速簡易測定法として有用性があることを見いだした．この検査系に寄与する分子的メカニズムを明らかとするために，血小板収縮に関与すると報告のあるカルパインの機能に関して検討したが，血餅退縮に影響を及ぼす作用は認められなかった．またこれら基礎的な研究に加え，既存の第 XIII 因子活性検査試薬を用いた臨床検査的な検討も施行した．各種臨床検査機器で検査試薬を使用することができれば，多くの施設で検査することが可能となる．生化学的な反応を用いた ammonia release assay (Berichrom FXIII®) は，さまざま検査機器での精度よく検査することが明らかとなった．

A. 研究目的

出血症状は緊急に対応すべき病態で，迅速な検査報告が必要であるにもかかわらず，通常の病院では第 XIII 因子 (FXIII) は受託による測定が一般的であり，現状においては診断を下すまでに多くの時間がかかっている．この問題に対して，特別の機器を設置していない病院でも簡易に行うことのできる FXIII 活性測定法を確立することを目標として，平成 22 年度に本研究事業で，血餅退縮検査が FXIII 活性迅速簡易測定法として有用性があることを見いだした．この検査系に寄与する分子的メカニズムを明らかとして，後天性血友病 XIII(13)症例の発掘，その分子機序の病態解明へアプローチすることを目的とした．またこれら基礎的な研究に加え，既存の FXIII 活性検査試薬が多くの施設で検査することが可能となれば，迅速診断に有用であるため臨床検査的な検討も施行した．

B. 研究方法

平成 22 年度に本研究事業で，FXIII 活性迅速簡易測定法として確立した血餅退縮検査

を用いた．FXIII 欠損マウスでは血餅退縮能が欠如する (Blood 115: 1277-9, 2010) するが，ヒトにおいては抗 FXIII 抗体を高濃度用いても血餅退縮反応を阻害することはできない．FXIII と calpain が，インテグリン α IIb β 3 の機能を調節するという報告 (J Biol Chem. 279:30697-706, 2004.)，血小板 FXIII はカルパインにより活性化されている (Biochem Biophys Res Commun. 144:484-90, 1987.) という知見から，calpain を同時に阻害し血餅退縮を行い，どのように影響を受けるか検討した．トランスグルタミナーゼ阻害剤 (1,3-dimethyl-2-[(2-oxopropyl)thio]imidazolium iodide) と抗 FXIII (活性阻害) 抗体に加え，カルパイン阻害剤である Calpeptin, ALLN (N-acetyl-Leu-Leu-Nle-CHO), and E64-d を用いて，血餅退縮に与える影響を確認した．

血餅退縮検査の研究に加えて，FXIII 活性測定試薬 (Berichrom FXIII®) の基礎的検討を行った．本邦では，臨床の現場において FXIII 活性測定を行う際には，主として Berichrom FXIII®を用いた ammonia release assay を行

っている。凝固検査機器の測定波長の問題から、この試薬を用いて FXIII 活性を測定できるものは数多くなく、汎用性が乏しい。しかし、生化学的に測定する試薬であるために、生化学検査自動分析器があれば測定可能である。我々は、試薬さえあればどの病院でも測定できるように生化学検査自動分析器の測定条件設定などに関して基礎検討を行った。

(倫理面への配慮)

本研究は、東京大学大学院医学系研究科・医学部 倫理委員会において承認を受け実施している。

C. 研究結果

血餅退縮検査の検討では、各種カルパイン阻害剤を用いたが、血餅退縮に与える影響は認めなかった。その際に血漿 FXIII 活性測定を Berichrom FXIII®で行ったが変化は認めなかった。カルパイン阻害剤に加え、FXIII 阻害剤を用いたが、血餅退縮に変化は認められず、有意な結果は得られなかった。

Berichrom FXIII®を用いた ammonia release assay は、活性化した FXIII が試薬中の基質と反応し、その色素変化を吸光度の変化で測定することで評価する。一般的に使用されている全自動血液凝固測定装置 CS-2000i (sysmex) のみならず、全自動血液凝固分析装置 COAGTRON-350 (協和キリン)、日立自動分析装置 7180 などでも測定条件さえ適切にすれば、正確に測定できることが明らかとなった。

D. 考察

血餅退縮反応は、血小板収縮が大きく関与しているが、カルパインの関与はないと思われた。どのように血漿 FXIII 活性が関与しているか、今回の検討ではでは説明することは困難であった。

Berichrom FXIII®をさまざまな臨床検査機器に搭載できること明らかとなったが、これにより FXIII 活性低下をどの検査室でも迅速に検知できる可能性が推察された。

E. 結論

血餅退縮検査に関しては、ヒトとマウスとの種の差、他の機序の存在などが、血餅退縮反応に違いを生じさせていると推察しているが、今後、これらの分子がどのように血小板や血餅退縮と関わっているのかその機序の解

明を継続したい。

本検討に用いた臨床検査試薬は、簡便に FXIII をモニターできるものの、価格は高価でありコストの面が問題となる。安価な測定試薬の開発が望まれる。

F. 健康危険情報

この研究において、健康に害を及ぼす事象は発生しなかった。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. 鈴木明子, 菅野信子, 金子誠. 技術講座 血液 血液凝固第 XIII 因子測定法. 検査と技術 39 巻 4 号 Page277-282, 2011.

2. 菅野信子, 金子誠, 鈴木明子, 矢富裕. ベリクロム FXIII(Berichrom FXIII)を用いた血液凝固第 XIII 因子活性測定全自動血液凝固測定装置 CS-2000i での基礎的検討と他機種での比較. Sysmex Journal 34 巻 1 号 Page72-80, 2011.

2. 学会発表

1. 金子 誠, 菅野信子, 鈴木明子, 田中亮子, 惣宇利正善, 矢富裕, 一瀬白帝. 血餅退縮反応を用いた新しい迅速第 XIII 因子活性測定法. 第 11 回 TTM フォーラム. 東京. 2011.3.5.

2. 田邊久美子, 菅野信子, 金子誠, 常名政弘, 横田浩充, 矢富裕. 全自動血液凝固分析装置 COAGTRON-350 における血液凝固第 XIII 因子活性測定の検討. 日本臨床検査自動化学会第 43 回大会 2011.10.7.

(発表誌名巻号・頁・発行年等も記入)

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得

なし。

2. 実用新案登録

なし。

3. その他

なし。

分担課題：トロンビン、F.XIII-HMGB1 の相互作用に関する研究

研究分担者 鹿児島大学大学院医歯学総合研究科システム血栓制御学
(メディポリス 連携医学) 教授 丸山征郎

研究要旨

第 XIII 因子（以下 F.XIII）の欠損の際の出血傾向のプロセスをより明らかにするために、流血下の全血の条件での血栓形成過程をフォローした。使用したのは Total Thrombus Formation Analysis method(T-TAS) である。解析の結果、F.XIII は流血下、全血の状態でも血栓形成に重要な役割を果たすことが示された。

A. 研究目的

F.XIII はフィブリンの γ 鎖同士の間で重合化と γ 鎖と線維芽細胞表面のフィブロネクチンの架橋形成などを介して、強固なフィブリン塊の形成と、形成されたフィブリン塊の線溶に対する安定性、引き続くフィブリン塊を反応の場とした「創傷治癒」などに大きな働きを有することが判明している。しかし生体内では血栓は形成開始されると、一方では溶解、あるいは飛散のベクトルと、増大のベクトルのせめぎあいの動的平衡の上の存在であろうと考えられる。これらの生体内に近いダイナミズムを解明する目的で、我々は全血、フロー下での血栓形成を解析する機器：Total Thrombus Formation Analysis method (T-TAS)を開発した。今回は F.XIII I の全血流血下に置ける血栓形成過程における役割を明らかにするために T-TAS を使用して解析した。

B. 研究方法

1. T-TAS を用いて、血栓形成のダイナミズムを解析した（文献 1、2）。
2. 血液は健康ボランティアの血液を使用した。
3. F.XIII の活性を中和するために、ヒト F.XIII 中和抗体（一瀬白帝教授より供与）を用いた。
(倫理面への配慮)

鹿児島大学大学院医歯学総合研究科の倫理委員会の認可のもとに実験した。

C. 研究結果

1. FXIII 中和抗体の添加で、T-TAS におけるチューブ内閉塞の時間は遅延した。
2. t-PA(tissue Plasminogen activator) の添加でも、T-TAS の閉塞時間は遅延した。

D. 考察

おそらく生体内での血栓は増大するベクトルと物理的にそれを飛散させたり、あるいは溶解縮小するというダイナミズムの上にあるものと考えられるが、F.XIII は血栓の増大・成長にも大きな役割を果たしているものと考えられた。これはフィブリン塊表面のトロンビンによって F.XIII の活性化がおき、これがフィブリンの架橋形成をシークエンシャルに、ダイナミックに行っているためと考えられた。従ってこれまでの F.XIII の役割：「フィブリンの γ 鎖同士の間で架橋形成、フィブリンの γ 鎖と線維芽細胞表面のフィブロネクチンとの架橋形成」というプロセスは、ダイナミックに血栓形成の全てのフェーズで起こり、血栓の増大成長に重要な役割を果たしているものと考えられる。これが F.XIII の欠損（先天的、あるいは後天的）の出血傾向にも大きな役割を果たしているものと想定される。

E. 結論

F.XIII 因子は生体内においては、血栓の増大・成長に大きな役割を果たしているものと考えられ、FXIII の機能制御は止血血栓で大きな標的分子となりうる。

G. 研究発表

1. 論文発表

- (1) Hosokawa K, Ohnishi T, Fukasawa M, Kondo T, Sameshima H, Koide T, Tanaka KA, **Maruyama I**. A microchip flow-chamber system for quantitative assessment of the platelet thrombus formation process. *Microvasc Res.* 2012 Mar;83(2):154-61.
- (2) Hosokawa K, Ohnishi T, Kondo T, Fukasawa M, Koide T, **Maruyama I**, Tanaka KA. A novel automated microchip flow-chamber system to quantitatively evaluate thrombus formation and antithrombotic agents under blood flow conditions. *J Thromb Haemost.* 2011 10.1538-7836.
- (3) T, **Maruyama I**. Thrombomodulin: protectorate God of the vasculature in thrombosis and inflammation. *J Thromb Haemost.* 2011 Jul;9 Suppl 1:168-73

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

特記事項なし。

産科領域における後天性血友病 XIII 実態調査

分担研究者 浜松医療センター 院長 小林 隆夫

研究要旨

後天性血友病 XIII 実態調査として産科領域の調査を実施した。対象患者は、反復する絨毛膜下血腫による流・早産および切迫流・早産症例が 2 例、分娩時異常出血症例（とくに一旦止血後の遅発性出血）が 1 例である。これら 3 例は XIII 因子が異常に低下（36%、24%、48%）していたが、いずれも XIII インヒビターは陰性であり、適切な治療によりその後の異常出血はみられなかった。その他軽度な絨毛膜下血腫症例も含め 13 例に対して合計 15 回第 XIII 因子活性を測定したが、XIII 因子活性値は 49%から 136%の範囲で非常にばらつきがあった。絨毛膜下血腫や分娩周辺期の出血症例では XIII 因子活性は低下していることが明らかになった。今回検討した症例は消費による低下と考えられ、XIII 因子インヒビター陽性例は見つかっていないが、産科領域における異常出血の原因として後天性血友病 XIII の実態が解明されれば、新たな治療法が提言でき、予後向上が期待されるよう。

A. 研究目的

絨毛膜下血腫は、絨毛膜と脱落膜との間に出血が起こる疾患で流・早産の原因となるが、その原因は解明されていない。XIII 因子はフィブリノゲンと同様接着因子として妊娠維持に必須の血液凝固因子であり、その先天性欠損症患者は妊娠初期に必ず流産することが知られている。XIII 因子インヒビターによる後天性血友病 XIII が妊娠中に発症する場合は、絨毛膜と脱落膜との間に接着不良により出血を生じ、流・早産を来すことが推定される。また、分娩周辺期の異常出血、とくに一旦止血後の遅発性出血（いわゆる線溶亢進性出血）を来す場合も後天性血友病 XIII が疑われるため、検索の対象とし、産科領域における後天性血友病 XIII 実態調査を実施する。

B. 研究方法

後天性血友病 XIII 実態調査として産科領域の調査を実施した。対象患者は、反復する絨毛膜下血腫による流・早産および切迫流・早産症例が 2 例、分娩時異常出血症例（とくに一旦止血後の遅発性出血）が 1 例である。その他軽度な絨毛膜下血腫症例も含め 13 例に対して合計

15 回第 XIII 因子活性を測定した。XIII 因子低下例に関してはフィブリノゲン、第 VIII 因子、第 IX 因子、アンチプラスミン、FDP、D-dimer、さらには XIII インヒビターを山形大学で測定した。

（倫理面への配慮）

本研究は、厚生労働省の臨床研究の倫理指針および疫学研究の倫理指針に則り、浜松医療センターの倫理委員会の承認を得ており、検査にあたっては患者の同意を得て行った。

C. 研究結果

症例 1 は、帝王切開後 10 日目の大量出血患者である。来院時 Hb 5.0g/dL と貧血を呈し、XIII 因子活性は 36%と低下、リストセチンコファクターは 167%であった。輸血等の加療にて軽快し、1 か月健診時には Hb 12.3g/dL、第 XIII 因子活性 116%と正常に復した。この時の第 VIII 因子活性 87%、第 IX 因子活性 111%、アンチプラスミン 97%、Fibrinogen 221mg/dL、PIC 0.5 μ g/mL といずれも正常であった。症例 2 は、妊娠初期から絨毛膜下血腫があり、これが吸収されずに妊娠中出血が持続している患

者である。妊娠 34 週 6 日の XIII 因子抗原量は 24% と低下、Fibrinogen 226mg/dL、FDP 24.9 μ g/mL、D-dimer 17.8 μ g/mL と異常値を呈した。その後さらに Fibrinogen が 153 mg/dL と低下、D-dimer が 23.4 μ g/mL と増加したため常位胎盤早期剥離を疑い緊急帝王切開を施行した。術後 3 日の XIII 因子抗原は 35%、Fibrinogen は 226mg/dL に増加、D-dimer は 2.7 μ g/mL まで低下し、その後も順調に経過し退院、1 か月健診も正常であった (Fibrinogen 280mg/dL に増加、D-dimer は 0.7 μ g/mL に低下)。線溶亢進性の遅発性出血はみられなかった。症例 3 は、絨毛膜下血腫既往の経産婦である。今回も妊娠 10 週にて絨毛膜下血腫による出血のため入院。妊娠 23 週にて XIII 因子抗原量 48%、活性 60% と低下していたが、Fibrinogen 281mg/dL、FDP < 2 μ g/mL、D-dimer 1.43 μ g/mL、アンチプラスミン 107%、PIC 0.5 μ g/mL 等は正常であった。妊娠 34 週 6 日、前期破水のため緊急帝王切開施行 (癒着胎盤) した。術後は順調な経過で退院し、1 か月健診も正常であった。これら 3 例は XIII 因子が異常に低下していたが、いずれも XIII インヒビターは陰性であった。その他の 13 症例 (15 検体) では、XIII 因子活性値は 49% から 136% の範囲で非常にばらつきがあった。XIII 因子低下例を含め、いずれも異常出血の継続はみられず、XIII 因子活性も正常で経過した。

D. 考察

まだ症例数が少なく一定の見解を導くことができないが、絨毛膜下血腫や分娩周辺期の異常出血症例では、XIII 因子活性値は低下していることが明らかになった。今回検討した症例は消費による低下と考えられ、XIII 因子インヒビターによる後天性血友病 XIII 患者は見つかっていない。しかし、これらの異常出血症例の中には XIII 因子インヒビターによる後天性血友病 XIII 患者も紛れ込んでいる可能性がある。XIII 因子インヒビターが陽性であれば、通常の治療では対応しきれないことが想定され、母児共に危険な状況に陥ってしまうことが危惧される。今後も可能であれば引き続き症例数を増やして検索したい。

E. 結論

産科領域における異常出血の原因として後天性血友病 XIII の実態が解明されれば、新たな治療法が提言でき、予後向上が期待される。

*絨毛膜下血腫

絨毛膜下血腫は胎囊に接したエコーフリースペースとして観察される。このような所見が認められ、性器出血、下腹痛などの症状が出現すれば、適切な治療を必要とする。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表
なし

H. 知的所有権の出願・取得状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし