

応させた後、希釈した血漿をインキュベートし、活性化 FXIII (A)、A<sub>2</sub>B<sub>2</sub> との反応性をペルオキシダーゼ標識抗ヒト IgG を用いた ELISA 法にて測定した。

アミン取込み活性の測定 モノダンシルカダベリン (MDC) の N,N-ジメチルカゼイン (dmC) への取り込みを測定した。インヒビターの力価は、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、健常血漿と混合して 2 時間インキュベートした後、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。フィブリン架橋反応 血漿にトロンビンと CaCl<sub>2</sub> を添加して生じたクロットを SDS-PAGE にて解析した。

FXIII-A 活性化ペプチド (AP) の切断解析 健常血漿と段階希釈した患者血漿を 37°C で 2 時間インキュベートした後、トロンビンと反応させ、抗 FXIII-A ポリクロナール抗体を用いたウエスタンブロット法により AP 切断の有無を解析した。

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 (rA<sub>2</sub>B<sub>2</sub>) を調製した。rA<sub>2</sub>B<sub>2</sub> を患者血漿とインキュベート後、CaCl<sub>2</sub> 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は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 血漿中の FXIII 抗原量ならびに活性

17 例の AH-13 症例を同定した。15 例に抗 FXIII-A 抗体 (AH-13A)、2 例に抗 FXIII-B 抗体 (AH-13B) を検出した。

AH-13 症例の血漿中の FXIII 各サブユニットの抗原量とアミン取込み活性を、健常人 (n=33) およびインヒビター陰性後天性 FXIII 欠損症 [Acquired F13 deficiency (AF13D), n=22] と比較した。FXIII-A 抗原量は有意な低下傾向を示したものの ( $0.73 \pm 0.75$  U/mL vs 健常人  $0.98 \pm 0.22$  U/mL;  $P=0.008$ )、検出感度以下から健常人の 3 倍近くのものまで大きなばらつきが見られた。FXIII-B 抗原量は健常人と同等量存在していたのに対して、A<sub>2</sub>B<sub>2</sub> 量はほとんどの症例で検出感度以下であった。アミン取込み活性は著しい低下を認め、その比活性 (FXIII-A 抗原量あたりの活性) は AF13D が健常人と同じであるのに対して明確に低値であった。

### 2. 活性化 FXIII-A (FXIII-A')、A<sub>2</sub>B<sub>2</sub> に対する FXIII インヒビターの反応性

AH-13A の FXIII インヒビターについて、FXIII-A' および A<sub>2</sub>B<sub>2</sub> に対する反応性を検討した。検討した症例いずれのインヒビターともに、

FXIII-A'との反応性はFXIII-Aに対するものと変化がなかった(表2)。一方、症例12と15を除き、A<sub>2</sub>B<sub>2</sub>に対する反応性は70%以下に大きく低下した。

### 3. FXIII インヒビターによる活性化への影響

混合試験によるアミン取込み活性阻害の有無を検討した。症例4、10、14を除くAH-13A症例でアミン取込み活性の阻害が確認された。症例4、10、14およびAH-13B症例では阻害は観察されなかった。ベセスダ単位は症例11で最も高く(9.75 BU/mL)、症例5、15、17に高い値が算出されたが(2.47, 6.69, 5.44 BU/mL)、ほとんどは1 BU/mL以下であった。

あらかじめ活性化したFXIIIのアミン取込み活性に対する阻害を調べた。症例8と15で高い阻害効果が確認され(62, 85%)、症例1、4、17にもそれぞれ35、29、41%の比較的強い阻害が検出されたが、その他の症例では20%以下であった。

生理的に重要な反応であるフィブリン架橋反応を検討した。症例8と15をのぞくAH-13A症例では、 $\gamma$ 鎖間架橋の著しい遅延を認め、 $\alpha$ 鎖間架橋は検出されなかった。症例11については、フィブリンの産生も認められなかった。症例8、15およびAH-13B症例では、 $\alpha$ 鎖間架橋のみ遅延が観察された。健常血漿との1:1混合試験において、AH-13A症例では架橋反応の阻害が確認されたが、AH-13Bでは阻害は認められなかった。

### 4. FXIII 活性化への影響

トロンビンによるFXIII-AのAP切断は、症例8と15を除くAH-13A症例でいずれも強く阻害された。一方、症例8、15およびAH-13B症例ではAP切断の阻害は認められなかった。

トロンビン依存性のFXIII-Bの解離は、症例15を除くすべてのAH-13A症例で阻害が観察された。症例11では、FXIII-Bの解離がほぼ完全に阻害された。一方、症例15およびAH-13B症例ではFXIII-B解離の阻害は認められなかった。

### 5. 異種四量体形成への影響

症例8と15を除くAH-13A症例では、血漿中のA<sub>2</sub>B<sub>2</sub>は検出感度以下であり、rFXIII-AとrFXIII-Bとの結合も完全に阻害した。症例8、15およびAH-13Bについては、異種四量体形成への影響は認められなかった。

## 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)。本研究において、13例(症例1~6、9~12、14、16、17)のI型インヒビターと、2例(症例8、15)のII型インヒビターが日本人AH-13症例で同定された。加えて、2例(症例7、13)について、FXIII-Bに対するFXIIIインヒビターが確認された。最近、ハンガリーからFXIII-Bインヒビター症例が報告されている(Ajzner et. al, *Blood* 113: 723-725, 2009)ことから、改めて、FXIIIインヒビターをA(I)型、A(II)型、B型と分類することを提唱する。

A(I)型は、トロンビンによるAPの切断を阻害するため、結果としてFXIII-Bの解離およびトランスグルタミナーゼ活性(アミン取込み活性およびフィブリン架橋反応)を著しく低下させる。活性化したFXIII(FXIII-A')に対する阻害が限定的であることから、AP切断阻害の重大性が理解される。

加えて、本研究において、A(I)型は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。

A(I)型では、アミン取込み活性が比較的高値(0.26~0.61)に検出されながら、フィブリン架橋反応( $\gamma$ 鎖間架橋)が著しく遅延している症例が少なくない。IgGそのものも高分子量タンパク質であることから、A(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ものと想像される。

A(II)型はトロンビンによるAP切断は阻害せず、アミン取込み活性を強く阻害する。おそらくは、活性部位もしくはカルシウム結合部位を塞ぐ位置に結合するものと思われる。しかし、FXIII-Bとの異種四量体形成を阻害しないこと、FXIII-Aとの反応性は活性化しても変わらないことから、少なくともインヒビターの結合部位はA<sub>2</sub>B<sub>2</sub>の表面にあり、活性化に伴う構造変化

を妨害する可能性も考えられる。なお、症例8のA(II)型インヒビターでトロンビン依存性のFXIII-B解離が阻害されることは、構造変化への影響を表すものかもしれない。

A(II)型インヒビター症例において、フィブリン $\alpha$ 鎖間の架橋の遅延は認められるものの、 $\gamma$ 鎖間の架橋は正常と同様であることは興味深い。 $\gamma$ 鎖間の架橋結合は1~2分で完了するのに対して、 $\alpha$ 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、 $\gamma$ 鎖と $\alpha$ 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。

B型インヒビターは、異種四量体形成、活性化、酵素活性いずれにも影響が認められない。FXIII抗原量が低下していることから、血中からのクリアランスを促進するものと考えられる。

AF13Dとの比較において、AH-13Aでは必ずしもFXIII-A抗原量が低下するとは限らないにもかかわらずアミン取込み活性が低く、比活性が大きく減少している点が特徴としてあげられる。また、A(I)型ではA<sub>2</sub>B<sub>2</sub>量が著しく低下する点も特徴的である。一方、AH-13Bは活性低下が抗原量の低下に依存するため、FXIIIの測定だけではAF13Dとの区別が困難であり、抗FXIII抗体の同定が確定診断には欠かせない。

## E. 結論

日本人17例のAH-13症例におけるFXIIIインヒビターは、AP切断および異種四量体形成を阻害するA(I)型、活性化したFXIIIの酵素反応を阻害するA(II)型、およびFXIII-Bと結合しFXIII抗原量を低下させるB型の3群に分類された。

## 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.
- (5) Ishida F, Okubo K, Ito T, Okumura N, Souri M, Ichinose A. Spontaneous regression of the inhibitor against the coagulation factor XIII A subunit in acquired factor XIII deficiency. *Thromb Haemost.* 2010; 104(6): 1284-5.
- (6) Kasahara K, Souri M, Kaneda M, Miki T, Yamamoto N, Ichinose A. Impaired clot retraction in factor XIII A subunit-deficient mice. *Blood.* 2010;115(6):1277-9.

## 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) Nagate Y, Kosugi S, Nakata S, Kotake T, Kida T, Take H, Souri M, Katagiri S, Ichinose A: Successful rituximab-treatment of two patients with acquired hemorrhophilia 13 (hemorrhagic acquired factor 13 deficiency due to its autoantibodies) (P-MO-531). XXIII Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis (ISTH2011) and 57th Annual SSC Meeting, July 23-28, 2011, Kyoto, Japan.
- 5) 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.
- 6) 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) 藤井法子, 惣宇利正善, 嶋 緑倫, 一瀬白帝: 補充した凝固第13因子(F13)製剤の半減期短縮が認められた先天性F13欠損症複合ヘテロ接合体の新生児例. 日本血液学会第165回例会, 東京; 2011年2月5日
- 4) Kaneko M(金子 誠), Suzuki A(鈴木明子), Kanno N(菅野信子), Tanaka R(田中亮子), Ishizaka T(石坂泰三), Souri M(惣宇利正善), Yatomi Y(矢富 裕), Ichinose A(一瀬白帝): A novel quick point of care test of coagulation factor XIII activity based on clot retraction in humans. BMB2010(第33回日本分子生物学会年会・第83回日本生化学会大会 合同年会 Workshop 3W19(血栓形成における凝固系と血小板の相互作用), 神戸; 2010年12月9日
- 5) Kasahara K(笠原浩二), Kaneda M(兼田瑞穂), Miki T(三木俊明), Iida K(飯田和子), Suzuki H(鈴木英紀), Yamamoto N(山本正雅), Arai M(新井盛大), Souri M(惣宇利正善), Ichinose A(一瀬白帝): Factor XIII-Dependent- Clot Retraction (CR) and -Fibrin Translocation to Platelet Rafts: Factor XIII-Crosslinked Fibrin-Glycoprotein (GP) IIb/IIIa Axis. BMB2010(第33回日本分子生物学会年会・第83回日本生化学会大会 合同年会 Workshop 3W19(血栓形成における凝固系と血小板の相互作用), 神戸; 2010年12月9日
- 6) 惣宇利正善, 張 偉光, 岩田宏紀, 一瀬白帝: 妊娠期の止血における凝固XIII因子陽性細胞の存在意義. BMB2010(第33回日本分子生物学会年会・第83回日本生化学会大会 合同年会, 神戸; 2010年12月7-10日
- 7) 金子 誠, 鈴木明子, 菅野信子, 田中亮子, 石坂泰三, 惣宇利正善, 一瀬白帝, 矢富裕: 血餅退縮能を用いた血液凝固第XIII因子活性の迅速簡易測定法の開発と臨床応用. 第72回日本血液学会学術集会, 横浜; 2010年9月24-26日
- 8) 小林達之助, 朝倉英策, 林 朋恵, 前川実生, 門平靖子, 山崎雅英, 森下英理子, 惣宇利正善, 一瀬白帝, 中尾眞二: 皮下血腫と消化管出血を契機に診断された後天性第XIII因子欠乏症. 第33回日本血栓止血学会学術集会, 鹿児島; 2010年4月22-24日
- 9) 笠原浩二, 惣宇利正善, 兼田瑞穂, 三木俊

明, 山本正雅, 一瀬白帝: 凝固 XIII 因子 A サブユニット欠損マウスでは血餅退縮反応が欠如する. 第 33 回日本血栓止血学会学術集会, 鹿児島; 2010 年 4 月 22-24 日

10) 惣宇利正善, 張 偉光, 岩田宏紀, 一瀬白帝: マクロファージのエンドトキシン誘導性組織内浸潤における XIII 因子の関与. 第 33 回日本血栓止血学会学術集会, 鹿児島; 2010 年 4 月 22-24 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 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

5) Ichinose A, Souri M; on behalf of the Japanese collaborative research group on “Acquired haemorrhaphilia due to factor XIII/13 deficiency”. Amounts of cross-linked  $\alpha$ 2-plasmin inhibitor decreased in patients with ‘haemorrhagic acquired factor XIII/13 deficiency’ and ‘acquired hemorrhaphilla XIII/13’. 第 11 回 TTM フォーラム学術集会, 東京; 2011 年 3 月 5 日

6) 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 フォーラム学術集会, 東京; 2011 年 3 月 5 日

7) 張 偉光, 岩田宏紀, 惣宇利正善, 一瀬白帝: 妊娠期の止血における凝固 XIII 因子陽性細胞の存在意義. 山形大学医学部実験動物セミナー 第 21 回研究成果発表会, 山形; 2010 年 12 月 16 日

8) 惣宇利正善, 張 偉光, 岩田宏紀, 一瀬白帝: 異種四量体形成を阻害する凝固 XIII 因子インヒビター. 第 18 回山形分子生物学セミナー, 山形; 2010 年 12 月 1 日

9) 矢富 裕, 金子 誠, 鈴木明子, 菅野信子, 田中亮子, 惣宇利正善, 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 3 回後天性第 XIII(13)因子欠乏症研究会, 横浜; 2010 年 9 月 23 日

10) 石田文宏, 大久保健太郎, 伊藤俊朗, 奥村伸生, 惣宇利正善, 一瀬白帝: インヒビターが自然消退した出血性後天性第 XIII 因子欠乏症. 第 3 回後天性第 XIII(13)因子欠乏症研究会, 横浜; 2010 年 9 月 23 日

11) 笠原浩二, 兼田瑞穂, 三木俊明, 飯田和子, 鈴木英樹, 原 裕太, 下仲基之, 小嶋聡一, 新井盛大, 一瀬白帝, 惣宇利正善, 山本正雅: フィブリンの血小板脂質ラフト移行と血餅退縮における働き. 第 48 回東北止血・血栓研究会, 山形; 2010 年 9 月 4 日

12) 惣宇利正善, 張 偉光, 岩田宏紀, 一瀬白帝: 異種四量体形成を阻害する凝固 XIII 因子インヒビター. 第 48 回東北止血・血栓研究会, 山形; 2010 年 9 月 4 日

13) 惣宇利正善, 一瀬白帝: Molecular basis of acquired hemophilia due to factor XIII(13) (F13) inhibitors (acquired hemophilia 13): A novel antibody against F13-A hinders the association of a F13-A dimer and F13-B dimer. 第 8 回血液・血管オルビス, 東京; 2010 年 8 月 21-22 日

14) 金子 誠, 鈴木明子, 菅野信子, 田中亮子, 石坂泰三, 惣宇利正善, 矢富 裕, 一瀬白帝: A novel quick point of care test of coagulation factor XIII activity based on clot retraction in humans. 第 8 回血液・血管オルビス, 東京; 2010 年 8 月 21-22 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。

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(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 22-23 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。平成 22 年度は、自治医科大学附属病院の造血幹細胞移植患者のうち 5 例（平均年齢 34.0 歳、男性 2 例、女性 3 例）について、第 XIII 因子活性および抗原量を移植前第 7 病日から移植後第 40 病日まで経時的に測定した。移植第 7 病日に第 XIII 因子活性が 20-30% と最も低下し以後漸増すること、第 XIII 因子抗原量は 1 例を除き概ね 50-60% を維持していたことから、移植前後の様々な病態と関連することが示唆された。この結果を受けて平成 23 年度は、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  $43.1 \pm 13.6$  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 因子活性の回復が遷延しており（移植後第 28 病日第 XIII 活性； $64.3 \pm 33.8$  vs  $83.1 \pm 33.1\%$ ,  $p=0.036$ ）、第 XIII 活性と移植後の造血能と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（A2B2）である。第 XIII 因子は、フィブリン分子間および  $\alpha_2$ -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、フィブロネクチン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し臨床解析を遂行した。

#### B. 研究方法

自治医科大附属病院血液科（小澤敬也教授）および輸血細胞移植部（室井一男教授）との共同研究により、2006 年 6 月から 2008 年 9 月まで実施し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、登録順で最初 5 症例（平均年齢 34.0 歳、男性 2 例、女性 3 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 40 病日まで経時的に測定した。

さらに造血幹細胞移植症例を対象患者 57 例のうち、移植中止例を除く 53 例（年齢  $43.1 \pm 13.6$  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 病日まで経時的に解析した。

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。

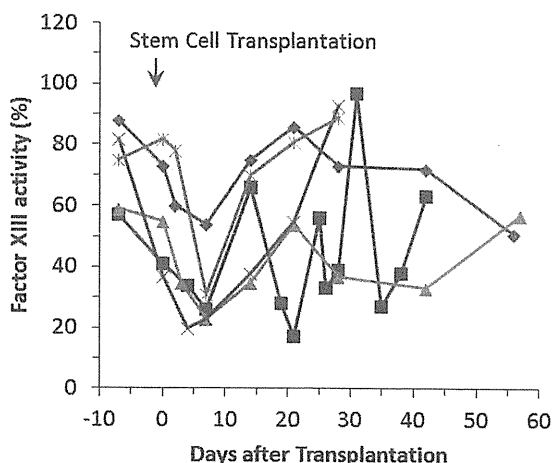
(倫理面への配慮)

本研究は、「自治医科大学疫学研究倫理審査委員会」承認済み臨床研究である。

### C. 研究結果

1) 基礎疾患は急性骨髄性白血病 3 例、被ホジキンリンパ腫 2 例で、同種骨髄移植が 3 例、末梢血幹細胞移植および臍帯血三細胞移植が 1 例ずつであり、5 例のうち 2 例が非寛解での造血幹細胞移植であった。第 XIII 因子活性は、5 症例例全例において前処置開始から漸減し移植第 7 病日目には 20-30% まで低下、以後漸増するものの移植後 40 日目においても 50-60% までの回復に留まっていた。一方第 XIII 因子抗原量は、1 例を除き概ね 50-60% を維持していた。また第 XIII 活性の低下が遷延する症例がみられた (図 1)。図 1. 造血幹細胞移植症例における第 XIII 因子活性の推移 (#1-#5 症例の個別第 XIII 活性値)

2) 全例解析における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。

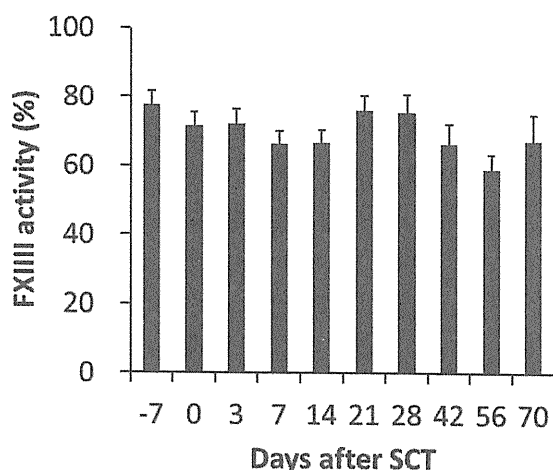
造血幹細胞移植症例における第 XIII 因子抗原量および活性値は、前処置開始日から移植第 7 病日目まで漸減するものの、幹細胞の生着に伴い徐々に移植前値まで回復した (図 2)。

図 2. 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;  $64.3 \pm 33.8$  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、ドナー細胞の生着と新規造血動態と強い



関連性を有する可能性が示された。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。

一方造血幹細胞移植後 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 サブユニットとともに、第 XIII 因子活性の低下が移植後の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、重症感染症、再発および血栓性微小血管障害などの影響を受けているものと考えられる。すなわち第 XIII 因子の動態は、造血幹細胞移植症例における生命予後の極めて重要なマーカーとなる可能性が示された。

### 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

後病態が密接に関連し、移植後の生着および生命予後に重要な指標となる可能性が示された。

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.

Ohmori T, Kashiwakura Y, Ishiwata A, Madoiwa S, Mimuro J, Honda S, Miyata T, Sakata Y.: Vinculin activates inside-out signaling of integrin alphaIIb beta3 in Chinese hamster ovary cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 400(3) 323-328.2010.

Ohmori T, Kashiwakura Y, Ishiwata A, Madoiwa S, Mimuro J, Furukawa Y, Sakata Y.: Vinculin is indispensable for repopulation by hematopoietic stem cells, independent of

integrin function. *J Biol Chem.* 285(41)31763-31773.2010.

Ohmori, T., Madoiwa, S., Mimuro, J., Sakata, Y.:Development of platelet-directed gene modification by lentiviral vector.*Rinsho Ketsueki.* 51(8):625-31. 2010.

Ishiwata A, Mimuro J, Mizukami H, Kashiwakura Y, Yasumoto A, Sakata A, Ohmori T, Madoiwa S, Ono F, Shima M, Yoshioka A, Ozawa K, Sakata Y.:Mutant macaque factor IX T262A:a tool for hemophilia B gene therapy studies in macaques. *Thromb Res.* 125(6):533-537. 2010.

Mimuro J, Mizuta K, Kawano Y, Hishikawa S, Hamano A, Kashiwakura Y, Ishiwata A, Ohmori T, Madoiwa S, Kawarasaki H, Sakata Y.:Impacto of acute cellular rejection on coagulation and fibrinolysis biomarkers within the immediate post-operative period in pediatric liver transplantation. *Pediatr Transplant.* 14(3):369-376. 2010.

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.

Kenji Yokoyama, Tetsuhito Kojima, Yoichi Sakata, Tomio Kawasaki, Hajime Tsuji, Toshiyuki Miyata, Shinichiro Okamoto, Mitsuru Murata: A survey of venous thromboembolism in Japanese patients with inherited anticoagulant deficiency 第72回日本血液学会学術集会 2010.9/24-26 横浜  
窓岩清治、小林英司、石渡 彰、柏倉裕志、大森司、三室 淳、坂田洋一: マイクロポート植え込み成体血友病Aマウスを用いた持続的VIII因子刺激に対する免疫応答能の解析 第72回日本血液学会学術集会 2010.9/24-26 横浜  
Tsukasa Ohmori, Yuji Kashiwakura, Akira Ishiwata, Seiji Madoiwa, Jun Mimuro, Yusuke Furukawa, Yoichi Sakata: Vinculin is indispensable for repopulation by hematopoietic stem cells. 第72回日本血液学会学術集会 2010.9/24-26 横浜

Jun Mimuro, Yoichi Sakata: Hemophilia gene therapy study with mice and non-human primates. 第72回日本血液学会学術集会 2010.9/24-26 横浜

大森 司、窓岩清治、三室 淳、坂田洋一: レンチウイルスベクターを用いた血小板標的遺伝子導入法の開発 (シンポジウム) 第72回日本血液学会学術集会 2010.9/24-26 横浜

Jun Mimuro, Akira Ishiwata, Hiroaki

Mizukami, Yuji Kashiwakura, Katsuhiro Takano, Tsukasa Ohmori, Seiji Madoiwa, Keiya Ozawa, Yoichi Sakata: Liver-restricted expression of the canine factor VIII gene facilitates prevention of inhibitor formation in factor VIII-deficient mice. 第16回日本遺伝子治療学会学術集会 2010.7/1-3 宇都宮  
Tsukasa Ohmori, Yuji Kashiwakura, Akira Ishiwata, Seiji Madoiwa, Eiji Akiba, Mamoru Hasegawa, Jun Mimuro, Keiya Ozawa, Yoichi Sakata: The chicken hypersensitive site-4 chromatin insulator sequence protects clonal dominance of hematopoietic stem cells transduced with a self-inactivating SIV vector in platelet-directed gene therapy. 第16回日本遺伝子治療学会学術集会 2010.7/1-3 宇都宮  
Hiroaki Mizukami, Jun Mimuro, Akira Ishiwata, Hiroya Yagi, Tsukasa Ohmori, Masashi Urabe, Akihiro Kume, Yoichi Sakata, Keiya Ozawa: Successful factor IX expression by IV administration of AAV8 vectors in macaques. 第16回日本遺伝子治療学会学術集会 2010.7/1-3 宇都宮  
Tsukasa Ohmori, Yuji Kashiwakura, Akira Ishiwata, Seiji Madoiwa, Jun Mimuro, Yoichi Sakata: Silencing of A targeted protein in platelets using A lentiviral vector delivering short hairpin RNA sequence. 第16回日本遺伝子治療学会学術集会 2010.7/1-3 宇都宮  
Akihiro Kume, Hiroya Yagi, Hiroaki Mizukami, Masashi Urabe, Tomonori Tsukahara, Akira Ishiwata, Jun Mimuro, Seiji Madoiwa, Tsukasa Ohmori, Yoichi Sakata, Keiya Ozawa: Choice of small-sized promoter for AAV-mediated factor IX expression in skeletal muscle. 第16回日本遺伝子治療学会学術集会 2010.7/1-3 宇都宮  
和田英夫、畑田 剛、岡本好司、内山俊正、川杉和夫、真弓俊彦、丸藤 哲、久志本茂樹、関 義信、窓岩清治: DIC診断における non-overt-DIC診断基準の有用性の検討 第33回日本血栓止血学会学術集会 2010.4/22-24 鹿児島  
柏倉裕志、三室 淳、石渡 彰、安本篤史、坂田飛鳥、大森 司、窓岩清治、水上浩明、小野文子、小澤敬也、坂田洋一: 非ヒト霊長類を用いた血友病A遺伝子治療研究に向けたヒト BDDFVIII 特異的検出法の確立 第33回日本血栓止血学会学術集会 2010.4/22-24 鹿児島  
石渡 彰、三室 淳、水上浩明、小野文子、安本

篤史、坂田飛鳥、柏倉裕志、大森 司、窓岩清治、久米晃啓、保富康宏、小澤敬也、坂田洋一：非ヒト霊長類を用いた血友病 B 遺伝子治療研究：末梢静脈投与 AAV8 ベクターによる第 IX 因子遺伝子導入 第 33 回日本血栓止血学会学術集会

2010.4/22-24 鹿児島

三室 淳、水田耕一、川野陽一、菱川修司、浜野明栄、柏倉裕志、石渡 彰、坂田飛鳥、安本篤史、大森 司、窓岩清治、河原崎秀雄、坂田洋一：

Impact of acute cellular rejection on biomarkers in liver transplantation 第 33 回日本血栓止血学会学術集会 2010.4/22-24 鹿児島

大森 司、柏倉裕志、石渡 彰、坂田飛鳥、安本篤史、窓岩清治、三室 淳、本田繁則、宮田敏行、坂田洋一：Vinculin は巨核球分化と integrin  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 の活性化に関与する 第 33 回日本血栓止血学会学術集会 2010.4/22-24 鹿児島

土海桃子、窓岩清治、柏倉裕志、石渡 彰、大森 司、三室 淳、坂田洋一：肺血症における白血球エラスターゼの造血調節機構の解析 第 33 回日本血栓止血学会学術集会 2010.4/22-24 鹿児島

窓岩清治、大森 司、三室 淳、坂田洋一：第 5 回日本血栓止血学会学術標準化委員会 DIC 部会シンポジウム 敗血症 DIC における白血球エラスターゼによる血栓溶解の臨床的意義

2010.10.30 東京

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が可能である臨床検査法の確立，新しいアプローチ法を開発することを本研究の目的とした．FXIII 活性迅速簡易測定法については，血餅退縮検査を用いた方法を考案し，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て臨床検査的な検討も施行した．生化学的な反応を用いた ammonia release assay (Berichrom FXIII®) は，凝固検査機器のみならず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り，多くの施設で検査することが可能であることが示唆された．

#### 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的に行うことのできる FXIII 活性測定法を確立し，後天性血友病 XIII(13)症例の発掘，診断や治療法へのモニタリング法として臨床診療への貢献，またその分子機序の解明のための新しいアプローチ法として開発することを目的とした．また，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試薬の基礎的検討も施行する．

#### B. 研究方法

平成 22 年度には，FXIII 欠損マウスでは血餅退縮能が欠如する (Blood 115: 1277-9, 2010) という知見から，ヒトにおける簡易 FXIII 活性測定法として血餅退縮反応を応用した検出法の開発・検討を行った．血餅退縮検査

法は，多血小板血漿 (PRP) にトロンビン，カルシウムを添加するだけで簡単に施行ができる．我々は，その血餅の大きさの経時的変化を画像処理・定量評価することにより，血餅退縮反応を評価した．

平成 23 年度には，血餅退縮検査に寄与する分子的メカニズムを明らかとすることを検討した．FXIII 欠損マウスと異なり，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  $\alpha$  IIb  $\beta$  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®) の基礎的検討を施行した。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施行した。

(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

血餅退縮反応は血小板数に依存するため、その数を一定にした (20 万/ $\mu$ L)。健常者 PRP を用いた検討では、血漿中の FXIII 活性をトランスグルタミナーゼ阻害剤もしくは抗 FXIII 抗体を用いて阻害すると、これら試薬の濃度依存性に血餅退縮は阻害された。後天性血友病 XIII(13)症例 (FXIII 因子に対する自己抗体を保有した後天性 FXIII 欠乏症 1 例) (福井三国症例)、先天性 FXIII 欠損症 2 例 (名古屋大、慶応大) においても血餅退縮反応が減弱した。血餅退縮検査に対し、各種カルパイン阻害剤を用いたが、影響は認められなかった。その血漿 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 阻害剤を用いて血餅退縮を観察したが、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

血餅退縮反応により、おおよその血漿 FXIII

活性を推定することが可能と思われた。軽度～中等度の FXIII 活性低下状態では健常対照検体との明確な差を認めなかったが、特に高度 FXIII 活性低下状態では退縮能の有意な低下を示した。特に、後天性血友病 XIII(13)症例では血餅退縮が強く抑制されるため、スクリーニング検査となり得ることが示唆された。

血餅退縮反応は、血小板収縮が大きく関与しているが、本検査系において血小板が収縮する際にはカルパインの関与はないと思われた。また、どのように血漿 FXIII 活性が関与しているか、今回の検討のみ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、試薬さえ準備することができれば FXIII 活性低下をどの検査室でも迅速に検査できると思われた。

#### E. 結論

血餅退縮能検査により、重度の FXIII 活性低下を検知できる可能性が推察された。また、臨床的に重大な出血症状を呈する症例に対し、FXIII 活性低下の診断を簡易的に迅速に行えるスクリーニング検査として有用性が期待された。

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. ベリクローム 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, 鈴木明子, 菅野信子, 田中亮子,  
石坂泰三, 惣宇利正善, 矢富裕, 一瀬白帝.

A novel quick point of care test of  
coagulation factor XIII activity based on  
clot retraction in humans. 第 8 回血液・血  
管オルビス. 東京. 2010.08.21.

2. 矢富 裕, 金子 誠, 鈴木 明子, 菅野 信  
子, 田中 亮子, 惣宇利 正善, 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. 後天性 13 研究会抄録  
2010.09.23.

3. 金子誠, 鈴木明子, 菅野信子, 田中亮子,  
石坂泰三, 惣宇利正善, 矢富裕, 一瀬白帝.  
Novel functional factor XIII assay based  
on clot retraction (血餅退縮能を用いた血  
液凝固第 XIII 因子活性の迅速簡易測定法  
の開発と臨床応用. 第 72 回日本血液学会  
学術集会. 横浜. 2010.09.26.

4. 金子誠, 鈴木明子, 菅野信子, 田中亮子,  
石坂泰三, 惣宇利正善, 矢富裕, 一瀬白帝.  
A novel quick point of care test of  
coagulation factor XIII activity based on  
clot retraction in humans. 第 33 回日本分  
子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大  
会合同大会. 神戸. 2010.12.09.

5. Kaneko M, Yatomi Y, Ichinose A.  
Point-of-care assay of FXIII (13)  
activity by utilizing clot retraction  
reaction in clinical settings.  
Wiesbaden, Germany. 2011.02.16.

6. 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.

7. 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.

1. 特許取得  
なし.
2. 実用新案登録  
なし.
3. その他  
なし.

(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。)

分担課題：FXIII 因子の活性に及ぼす HMGB1 の役割

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）学教授 丸山征郎

#### 研究要旨

HMGB1 (High Mobility Group Box-1 Protein) は代表的な DAMPs (Damaged Associated Molecular Pattern) として、侵襲部位で壊死細胞より細胞外に放出されて、止血、自然免疫、修復に重要な役割を果たす。そこで今回は HMGB1 と F.XIII の相互作用に関して研究した。一つは F.XIII の抗体形成に HMGB1 が関係するか否か、あと一つは HMGB1 が F.XIII の機能に関係するか、である。前者に関しては実験が終了しておらず、結論は得られていない。後者に関しては、F.XIII がトロンビンで活性化される過程、あるいは活性化 F.XIII がフィブリンに作用する仮定のいずれかで、HMGB1 がそのプロセスを阻害するという可能性が浮かび上がってきた。

#### A. 研究目的

F.XIII は当然のことながら、止血に必須の分子であり、侵襲部位でトロンビンによって活性化される。一方、侵襲部位では壊死細胞より HMGB1 も放出される、我々は先に、この HMGB1 がトロンビンの作用を試験管内では阻害するが、生体内では著しくその活性を増強することを報告した。

そこで今回は、F.XIII の活性に及ぼす HMGB1 の作用を検討した。

#### B. 研究方法

1. 純化精製した自家製の HMGB1, F.XIII (一瀬教授より供与) を使用した。
2. F.XIII の測定は測定キットを使用した。

#### C. 研究結果

1. HMGB1 は F.XIII の活性化に対しては、トロンビン-フィブリノゲン/フィブリンの存在の状況により異なるが、生理的に近い条件では濃度異存性に阻害するものと考えられる

2. ヒトフィブリン血栓内にはトロンビン、HMGB-1, F.XIII 因子が染色された。しかし 3 者の分子間の関係について結論を下す段

階には至らなかった。

#### D. 考察

侵襲部位ではトロンビンの生成とフィブリン形成、F.XIII 因子の活性化とこれによるフィブリンの安定化が起こる。一方侵襲部位では HMGB1 も壊死細胞より遊離放出されてくる。HMGB1 はトロンビン・トロンボモジュリンによるプロテイン C の活性化を抑制するが、これは HMGB1 がトロンボモジュリン N 末端レクチン様ドメインに結合するためである。したがってトロンビン-F.XIII-フィブリン-HMGB1 の分子間にはなんらかの相互作用がある者と考えられるが、今回の実験では HMGB1 が F.XIII の機能を抑制するという現象しか把握仕切れなかった。

#### E. 結論

今後、トロンビン-F.XIII-フィブリン-HMGB1 の作用を解析する必要がある。

#### G. 研究発表

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。その他絨毛膜下血腫による流・早産および切迫流・早産症例、不正性器出血症例なども含め 22 例に対して合計 24 回第 XIII 因子活性を測定したが、XIII 因子活性値は 48%から 136%の範囲で非常にばらつきがあった。以上の結果から、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。その他絨毛膜下血腫による流・早産および切迫流・早産症例、不正性器出血症例など 22 症例に対して合計 24 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、PIC0.5μg/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 24.9μg/mL、D-dimer 17.8μg/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 $\mu$ 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 $\mu$ 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 $\mu$ 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 $\mu$ g/mL、D-dimer 1.43 $\mu$ g/mL、アンチプラスミン 107%、PIC 0.5 $\mu$ 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 22 症例 (24 検体) では、XIII 因子活性値は 48% から 136% の範囲で非常にばらつきがあった。この中で活性が 60% 未満の症例は 2 例あったが、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。

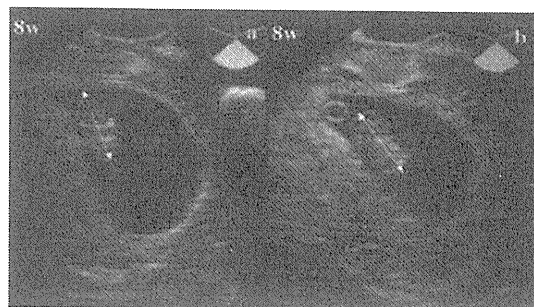
#### E. 結論

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。

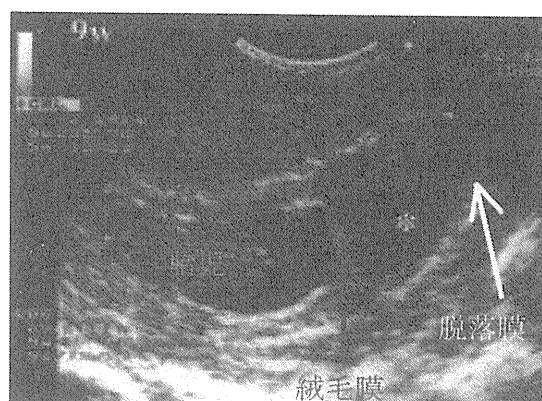
#### \*絨毛膜下血腫

絨毛膜下血腫は胎嚢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。



正常妊娠の胎児画像



絨毛膜下血腫 (\*) の超音波断層像

#### 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

分担課題：後天性血友病 XIII(13)の実態調査、発症機序の解明と治療方法の開発

研究分担者 村田 幸平 吹田市民病院 外科 主任部長

#### 研究要旨

2年間にわたって外科領域における後天性血友病 XIII(13)の実態調査を目的とし、臨床現場にて術後出血症例と創傷治癒症例から XIII 因子活性低下症例をスクリーニングしている。平成 22 年度には術後原因不明出血症例から B サブユニットに対する自己抗体をもつ患者（疑い）が発見された。この症例では、XIII 因子活性は正常範囲内であり、活性のみでは拾い上げられない可能性も示唆された。

#### A. 研究目的

本分担研究は、外科・救急領域における本疾患の実態調査と疾患の一般臨床医への啓蒙を目的としている。

#### B. 研究方法

外科領域における原因不明出血症例および難治性瘻孔等の創傷治癒遅延症例から、後天性血友病 XIII(13)の可能性のある症例を拾い上げ、精密検査を行っている。

具体的には、XIII 因子活性を、患者血漿、正常人血漿、両者の 1 対 1 混合血漿にて測定し、インヒビターの有無をみている。さらに、主任研究者と相談の上、抗体測定等の精密検査を行っている。

（倫理面への配慮）

研究計画は当院 IRB の審査を受け、承認されている。症例の登録に際しては、説明の上、同意文書を得ている。個人情報省き、最小限の採血量、回数で検査を行っている。

#### C. 研究結果

平成 22 年度に経験した 1 例。66 歳女性。右下葉肺癌に対して、2010.5. 26 胸腔鏡下肺葉切除施行。出血量 150g で手術は問題なし。術後 1 日目から胸腔ドレンからの排液が血性となり、術後出血と考え、緊急手術。複数の部位（剥離面等）から woozing があるのみであった。その後数日間微量の出血が持続したが、血小板輸血等で徐々

に止血した。術後 5 日目（消耗時）の XIII 因子活性は 58%。術前の PT85%、APTT30.3 秒と正常であり、出血の既往もなかった。回復期である術後 3 ヶ月にて測定した XIII 因子活性は、患者 114%、健常人 81%、混合血漿 96%。XIII 因子抗原量 121%。

ただし、この時の血液にて XIII 因子 B サブユニットに対する抗体が陽性であった。本患者は肺癌術後のフォローアップを外来にて行っている。患者には結果説明を行い、詳細は不明ながらも出血のリスクがあることを伝えた。その後、本患者は声帯ポリープにて耳鼻科受診したが、担当医がカルテに記載された本結果に気づき、安易な生検を未然に避けている。

平成 23 年度は 22 年度に引き続き、外科領域での原因不明の出血症例の拾い上げを行ってきた。すなわち、通常の止血検査で説明できない術中、術後出血症例を拾い上げ、XIII 因子活性を測定した。

本年度は術後出血例 3 例に行ったが、いずれも 50%以上の活性。

術後の難治性瘻孔症例における XIII 因子活性の測定も 1 例行ったが 50% 以上で、栄養状態の改善とともに活性は回復した。

#### D. 考察

提示した症例は示唆に富む症例である。すなわち、出血傾向を示す所見がなく、既往もない患者で、回復期には 114%という XIII 因子活性

を示していても、抗体が存在していることがある。

このような症例のスクリーニングとしては、XIII 因子活性の測定だけでは不十分であることになる。

XIII 因子 B サブユニットの生理的意義については十分には解明されていないが、B サブユニットに対する自己抗体が、XIII 因子活性に対して、流血中では影響を及ぼさないが、出血部位においては何らかの作用を及ぼしている可能性がある。

また、手術という侵襲で消費が起こると、効率的に XIII 因子が機能しなくなることも類推される。

#### E. 結論

外科領域における原因不明出血例に遭遇した際に、つねに本疾患を念頭において対処していくべきであるが、臨床現場で簡便に施行できるあらたなスクリーニング法の開発が待たれる。

#### 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

Kohei Murata , Masataka Ikeda ,  
Masayoshi Souri, Akitada Ichinose  
Unexplained post-operational bleeding  
in a patient with anti-factor XIII B  
subunit antibody.

XXIII<sup>th</sup> Congress of the International  
Society on Thrombosis and Haemostasis,  
Kyoto, July 23-28, 2011.

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

##### 1. 特許取得

なし

##### 2. 実用新案登録

なし

##### 3. その他

なし