

実験委員会、動物実験委員会の承認を得て行なった。

C. 研究結果

1) 新規AH13患者の同定

本年度、22例の後天性FXIII欠乏症疑い症例を精査し、ドットブロット解析において抗FXIII Ig陽性のAH13症例6例を新たに同定した。6例いずれにもFXIII-Aと反応するIgが検出され、また症例21, 22にはFXIII-Bと反応するIgも確認された。症例22を除き、いずれも異種四量体が著しく低下していること、フィブリン架橋反応が著しく遅延していること、FXIII-A活性化ペプチドの切断が阻害されていることから、Aa型インヒビターと判断された。症例22は、抗FXIII-A、抗FXIII-B Igともに検出量が軽微であり、アミン取込み活性やフィブリン架橋反応の阻害がほとんど認められなかった。

2) 抗FXIII-A自己抗体量の変動

これまでに同定されたAH13症例のうち6例について、FXIII-Aと結合して存在する結合型および単独で存在する遊離型それぞれの抗FXIII-A自己抗体量の変動を測定したところ、以下の傾向が見出された。

- ・遊離型抗FXIII-A IgGが早期に減少し、遅れて結合型抗体が減少した。
- ・出血傾向が長期にわたる症例では長期に結合型抗体が持続していた。
- ・FXIII濃縮製剤投与直後から抗FXIII-A自己抗体がFXIII-Bと置換し、異種四量体の急速な減少を起こしていた。
- ・結合型抗体の減少に伴いFXIII異種四量体が増加し、症状の改善が認められた。

3) フィブリン α 鎖および α_2 PIの架橋反応

Ab型インヒビター症例の血漿におけるフィブリンの架橋反応について、Aa型とともに詳細に解析した。フィブリン γ 鎖間の架橋反応はAa型では著しく遅延していたのに対して、Ab型では正常血漿と同様、2分以内に完了した。 α 鎖多量体化について、抗フィブリノゲン抗体を用いてウエスタンブロット解析したところ、Aa型と同様Ab型でも α 鎖の架橋反応は認められなかった。止血の維持に働く α_2 PIはフィブリン α 鎖と架橋することから、 α_2 PIのフィブリンへの取込みをウエスタンブロット解析したところ、フィブリンへの α_2 PIの取込みはAa型、Ab型いずれにもほとんど検出されなかった。

4) フィブリン架橋反応の分子機序

Aa型とAb型でフィブリン γ 鎖間の架橋反応が異なる理由を探るため、フィブリン架橋反応の分子機序について検討した。正常血漿ではフィブリンが形成される際、FXIII-Aがフィブリン塊に取込まれる。Aa型とAb型の血漿それぞれでフィブリン塊へのFXIII-Aの取込みを調べたところ、Aa型ではほとんど取込まれないのに対して、Ab型では正常と比べて少ない傾向にあるもののフィブリン塊へのFXIII-Aの取込みが確認された。FXIII-Aのフィブリン塊への取込みは、先天性FXIII-B欠損症の血漿でも著しい低下が認められ、FXIII-Bの添加により取込みが促進さ

れることが確認された。また、FXIII-B欠損血漿では、トロンビンによるFXIII-A活性化ペプチド切断の著しい遅延も観察された。抗フィブリノゲン抗体で血漿中のフィブリノゲンを免疫沈降したところ、FXIII-Aが正常血漿ではフィブリノゲンと共沈したのに対して、FXIII-B欠損血漿では十分量のFXIII-Aが存在するにもかかわらず、免疫沈降物には検出されなかった。一方、FXIII-BはFXIII-A欠損血漿から抗フィブリノゲン抗体により沈降回収され、FXIII-Bを介してFXIII-Aがフィブリノゲンと結合することが示された。さらに、正常血漿において、FXIII-Bは形成したフィブリン塊から放出されるが、架橋反応の阻害剤存在下ではフィブリン塊に留まることが示され、 γ 鎖の架橋形成がFXIII-Bとフィブリンとの結合を解消することが強く示唆された。

D. 考察

我々の研究室では本研究で新たに同定した6例を合わせて25例のAH13症例を解析しており、その大半(19例)のFXIIIインヒビターが四量体形成と活性化ペプチド切断を阻害するAa型である。FXIIIインヒビターについて酵素学的な解析をされた報告が少なからずあるが、異種四量体形成や活性化ペプチド切断の阻害を直接示した例がないが故、驚きである。Aa型の症例中少なくとも1例は活性化ペプチドを認識する抗体であることを確認しており、立体構造上活性化ペプチド近傍の領域が抗原提示されやすいものと想像される。

Aa型インヒビターを持つ症例の血漿では、FXIII-AはFXIII-Bと異種四量体を形成しない代わりに、インヒビターとの複合体として存在する。複数例での抗FXIII-A自己抗体量の変動追跡から、一過性に大過剰量の遊離型抗体が産生された後、抗体産生とFXIII-A産生が一定のレベルで平衡するものと疑われ、症例11に認められるように数年にわたって抗体が保持されかねず、寛解に向けた有効かつ確実な対策を考案する必要がある。結合型抗体減少の効果はアミン取込み活性および異種四量体量の増加として現れており、治療経過のモニタとして有効と考えられる。

Aa型インヒビターは、アンモニア放出法により測定される1:1混合血漿でのFXIII活性が極めて低値であり、加えて異種四量体の著しい低下とフィブリン γ 鎖架橋反応の著しい遅延から判断が容易である。一方、Ab型インヒビターはアンモニア放出法では阻害が検出されず、フィブリン γ 鎖架橋反応も正常であるため、見落とす危険がある。我々はこれまでに、血漿と血清それぞれの α_2 PI値の差の割合から α_2 PI架橋能を算出し得ることを報告しており、今回、ウエスタンブロット解析で、Aa型、Ab型いずれのFXIIIインヒビターともに α_2 PI架橋を阻害することを直接的に証明した。 α_2 PI架橋能はAb型を見落とすことなく診断する上で有効な指標と成り得るため、今後、より簡便かつ信頼性の高い測定方法を開発したい。

Ab型ではフィブリン γ 鎖の架橋形成が正常にもかかわらず重篤な止血異常を示すことから、 γ 鎖間の架橋の止血における効果は極めて弱い

ものと考えられ、フィブリン α 鎖多量体化の物理的安定性への寄与、ならびに α_2 PI架橋による早期溶解に対する保護効果の重要性が改めて理解される。

*in vitro*での解析から、FXIII-Bはこれまで血漿中でのFXIII-Aの安定化に寄与し、FXIIIの活性化(化)に対してはむしろ阻害的であるとされてきた。本研究では特にFXIII-B欠損血漿を用いた解析から、FXIII-A活性化ペプチドの切断とフィブリン架橋反応を促進していることが明らかとなった。フィブリンがFXIII-A活性化ペプチドの切断に対して促進効果を持つことは報告されており、FXIII-Bはおそらく、トロンビンおよび γ 鎖架橋部位との関係においてFXIII-Aを適切な位置に配置するものと想像される。フィブリン塊からのFXIII-Bの放出が γ 鎖の架橋結合に依存しており、またFXIII-Bの γ 鎖重型(γ' 鎖)との結合能も報告されていることから、架橋部位近傍にFXIII-Bが結合するものと予想される。今後の結合部位の同定が望まれる。

Ab型インヒビターは常時FXIII-Aと結合しておらず、FXIII-Bとの異種四量体形成を阻害しない。したがって、フィブリン形成時に効率よくフィブリン塊に取込まれ、トロンビンによる活性化ペプチドの切断を受けて速やかに γ 鎖間の架橋結合を形成することができる。その後引き続いて起こるべき α 鎖多量体化と α_2 PI架橋が著しく阻害されていることから、Ab型インヒビターの結合は γ 鎖間の架橋形成終了後に起こると考えられる。Ab型インヒビターの異種四量体との結合能は確認されており、あるいはFXIII-Bが解離することでよりFXIII-Aとの結合が安定する可能性も考えられる。フィブリン塊におけるAb型インヒビターとFXIII-Aとの結合について、より詳細に調べる必要がある。

Aa型インヒビターが異種四量体形成を阻害することから、FXIII-Bとの結合の欠如により間接的にトロンビンやフィブリンとの基質-酵素複合体形成を阻害している可能性も含まれる。活性化ペプチドと結合する抗体はトロンビンとの酵素-基質複合体形成において直接的に妨害するものと考えられ、それぞれの症例の抗体がFXIII-AあるいはFXIII-Bのどの部位を認識しているか、エピトープの同定が望まれる。

E. 結論

FXIIIインヒビターによる α_2 PI架橋の欠如が止血異常をもたらす要因であることが強く示唆された。FXIII-Bとの異種四量体形成はFXIII-Aのトロンビンによる活性化とフィブリン架橋反応の促進に寄与することが見出された。異種四量体形成を阻害するAa型インヒビターは少なくとも日本人のAH13において頻度が高く、 α_2 PI架橋能と異種四量体量がFXIIIインヒビターの有効な指標となる可能性が示された。

G. 研究発表

1. 論文発表

(1) Zhang WG, **Souri M**, Ichinose A. Proteosomal degradation of naturally recurring R260C missense and exon-IV deletion mutants of factor XIII

A-subunit expressed in mammalian cells. Haemophilia in press.

(2) Sugiyama H, Uesugi H, Suzuki S, Tanaka K, **Souri M**, Ichinose A. Aggressive fatal case of autoimmune hemorrhaphilia resulting from anti-Factor XIII antibodies. Blood Coagul Fibrinolysis. 24:85-89, 2013.

(3) Matsuoka M, Majima T, Onodera T, Ieko M, **Souri M**, Ichinose A, Kurita T, Kasahara Y, Inoue M, Takahashi D. Hemorrhagic-acquired factor XIII deficiency associated with tocilizumab for treatment of rheumatoid arthritis. Int J Hematol. 96:781-785, 2012.

(4) Maeda S, Zhang WG, **Souri M**, Yee VC, Ichinose A. Impaired dimer assembly and decreased stability of naturally recurring R260C mutant A subunit for coagulation factor XIII. J Biochem. 152:471-478, 2012.

(5) **Souri M**, Yee VC, Fujii N, Ichinose A. Molecular modeling predicts structural changes in the A subunit of factor XIII caused by two novel mutations identified in a neonate with severe congenital factor XIII deficiency. Thromb Res. 130:506-510, 2012.

(6) Hayashi T, Kadohira Y, Morishita E, Asakura H, **Souri M**, Ichinose A. A case of acquired FXIII deficiency with severe bleeding symptoms. Haemophilia. 18:618-620, 2012.

(7) 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. 107:592-594, 2012.

(8) Ichinose A, **Souri M**. Reduced difference of α_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. 95:47-50, 2012.

2. 学会発表

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 第34回日本血栓止血学会学術集会 6月 東京

惣宇利正善、尾崎司、一瀬白帝 後天性血友病XIII/13における抗XIII因子自己抗体の阻害特性 第85回日本生化学会 12月 福岡

惣宇利正善、尾崎司、一瀬白帝 日本人後天性血友病XIII(13) 21症例における凝固第XIII因子インヒビターの生化学的特徴 東北止血血栓研究会 9月 仙台

分担研究報告書

分担課題：後天性血友病13の診断に有用な抗凝固第XIII因子抗体のエピトープ探索法の開発

研究分担者 尾崎 司 山形大学医学部 助教

研究要旨

後天性/自己免疫性血友病 XIII(AH13)の原因となる凝固第 XIII 因子(FXIII)に対する自己抗体のエピトープ探索法の開発をおこなった。FXIIIは酵素部位の A サブユニット(FXIII-A)とキャリアーである B サブユニット(FXIII-B)からなり、FXIII-A は活性化ペプチド、 β -サンドウィッチ、コア、バレル1および2ドメイン、FXIII-B は10個の寿司ドメインから構成される。FXIII-A に対するモノクローナル抗体(mAb) 3種については組換え FXIII-A(rFXIII-A)のトリプシン消化断片の Western blot と抗体存在下での各種プロテアーゼによる rFXIII-A の断片化パターンの違いを質量分析で解析し、AH13 症例の血漿1例については質量分析による解析のみを行い、エピトープの推定を行った。その結果、3種の mAb はバレル1、バレル2、バレル1あるいは2ドメインを各々1種、AH13 症例血漿は活性化ペプチドおよびバレル2を認識すると推定された。抗 FXIII-B 同種抗体が検出された先天性欠損症例の血漿1例、および FXIII-B に対する mAb 7種については寿司ドメインの数が異なる rFXIII-B に対する交差反応を ELISA および Western blot で解析した。同種抗体と3種の mAb は第5寿司ドメインを、他の mAb は各々1種ずつ、第2-3、第6、第9、第9-10寿司ドメインを認識すると推定された。上記の解析法により、ドメイン単位での抗体認識部位の同定が可能であり、ヒト同種抗体、および実際に AH13 症例の検体の解析にも適応できることが示された。

A. 研究目的

後天性/自己免疫性血友病XIII(AH13)は凝固第XIII因子(FXIII)に対する自己抗体が原因で出血症状を示す。FXIIIは酵素部位のAサブユニット(FXIII-A)とFXIII-Aの安定化に働くBサブユニット(FXIII-B)からなる。現在までに本研究班で25例のAH13症例を同定し、自己抗体の認識するサブユニットと生化学的な阻害様式の違いから3群に分類したが、抗体が認識するエピトープの同定ができていなかったため、詳細な阻害機構は不明であった。本分担研究では、AH13症例の自己抗体が認識するエピトープを同定することを目的として、まず同定手法の確立を行った。また、この手法を用いて、AH13症例の診断に有用なイムノクロマト法開発に用いるマウスモノクローナル抗体(mAb)のエピトープ同定も試みた。

B. 研究方法

1. 抗FXIII-A抗体が認識するエピトープの同定

AH13 症例の血漿(1例)と3種の抗FXIII-A mAb(1TH2-8C4C, 1TH6-2H7F, 1TH6-10E)につ

いて検討を行った。

1-1. トリプシン消化断片の Western blot

組換え FXIII-A(rFXIII-A)をカルシウム存在下でトリプシン消化をおこない、Western blot を行った。マウス抗FXIII-A mAbを検出に用いて、認識部位の推定をおこなった。

1-2. rFXIII-A-抗体複合体の消化ペプチド解析

マウス抗FXIII-A mAbとrFXIII-Aを37°Cで1時間反応させた後、リジルエンドペプチダーゼ、トリプシンで消化した。脱塩操作の後、質量分析装置で解析を行った。 m/z からペプチド断片を予測し、ピークエリアから定量比較を行った。

1-3. rFXIII-A-抗体-プロテインG複合体の消化ペプチド解析

AH13 症例の血漿、あるいはマウス抗FXIII-A mAbとrFXIII-A、プロテインGセファロースを混合し、結合タンパク質をリジル

エンドペプチダーゼ、トリプシン、キモトリプシンで順次消化した。結合ペプチドは 1% TFA で溶出し、上清とともに質量分析装置で解析を行った。

2. 抗 FXIII-B 抗体が認識するエピトープの同定

抗 FXIII-B 同種抗体が検出された先天性欠損症例の血漿 1 例、および FXIII-B に対する mAb7 種(1-3B, 1-3C, 3-3D, 4-2B, 5-6C, 5-11B, 6-5F)について検討を行った。

2-1. 寿司ドメインの数が異なる rFXIII-B に対する Western blot

寿司ドメインの数が異なる rFXIII-B(全長、第 1-9、第 1-8、第 1-6、第 1-5、第 1-4、第 2-10、第 4-10 寿司ドメイン)をバキュロウイルス発現系で発現させ、Western blot を行った。ヒト抗 FXIII-B 同種抗体、およびマウス抗 FXIII-B mAb を検出に用いた。

2-2. 寿司ドメインの数が異なる rFXIII-B に対する ELISA

捕捉用抗体として抗 FXIII-B ウサギポリクローナル抗体を用いた。上述の rFXIII-B を結合した後、ヒト抗 FXIII-B 同種抗体、およびマウス抗 FXIII-B mAb を検出に用いた。

(倫理面への配慮)

本研究は、山形大学の倫理委員会の承認を得ており、検体使用に関しては、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ている。

C. 研究結果

1. 抗 FXIII-A 抗体が認識するエピトープの同定

FXIII-A は活性化ペプチド、 β -サンドウィッチ、コア、バレル 1 および 2 ドメインから構成される。3 種のマウス抗 FXIII-A mAb と AH13 症例の自己抗体について、ドメイン単位での抗体認識部位の同定を行った。

1-1. 抗 FXIII-A mAb のエピトープの同定

Western blot 解析の結果、いずれの mAb を用いた場合もバレル 1+2 を含む断片が検出された。

rFXIII-A-抗体複合体の消化ペプチド解析の結果、抗体がない場合に比べて 1TH2-8C4C ではバレル 1 および 2 ドメイン由来のペプチドが各々 1 箇所、1TH6-2H7F ではバレル 1 ドメイン由来のペプチドが 3 箇所、1TH6-10E ではバレル 1 ドメイン由来のペプチドが 1 箇所減少していた。

rFXIII-A-抗体-プロテイン G 複合体の消化ペプチド解析の結果、1TH2-8C4C に特異的に結合したペプチド断片は検出されなかったが、

1TH6-2H7F にはバレル 1 および 2 ドメイン由来のペプチドが各々 1 断片、1TH6-10E にはバレル 1 ドメイン由来のペプチドが 1 断片検出された。

1-2. AH13 症例の自己抗体のエピトープの同定

AH13 症例の自己抗体は変性 rFXIII-A を認識しないので Western blot 解析には使用しなかった。また、血漿中には多量のアルブミンが含まれており、解析の妨げになるので、rFXIII-A-抗体-プロテイン G 複合体を形成させてアルブミンなどを除去した後、消化解析を行った。その結果、活性化ペプチドおよびバレル 2 由来のペプチド断片が結合画分に回収された。

2. 抗 FXIII-B 抗体が認識するエピトープの同定

上述の rFXIII-B を用いて 7 種のマウス抗 FXIII-A mAb とヒト抗 FXIII-B 同種抗体について、ドメイン単位での抗体認識部位の同定を行った。

2-1. 抗 FXIII-B mAb のエピトープの同定

Western blot および ELISA の結果、1-3B により、第 1-4、第 1-5 寿司ドメインを除く rFXIII-B が検出され、1-3C により、第 4-10 寿司ドメインを除く rFXIII-B が検出され、第 4-10 寿司ドメインも微弱ながら検出された。また、3-3D、4-2B、5-11B を用いた場合、いずれも第 1-4 寿司ドメインを除く rFXIII-B が検出された。5-6C では全長 rFXIII-B が検出され、第 1-9 寿司ドメインも微弱ながら検出された。一方、6-5F では全長および第 1-9 寿司ドメインが検出された。

2-2. 抗 FXIII-B 同種抗体のエピトープの同定

Western blot および ELISA の結果、同種抗体によって、第 1-4 寿司ドメインを除く rFXIII-B が検出された。

D. 考察

現在までに本研究班で 25 例の AH13 症例を同定し、自己抗体の認識するサブユニットと生化学的な阻害様式の違いから 3 群(Aa、Ab、B)に分類した。Aa 型は FXIII-A に対する自己抗体でトロンビンによる FXIII-A 活性化ペプチドの切断を阻害するとともに、FXIII-A と FXIII-B の異種四量体形成を強く阻害する。一方、Ab 型は FXIII-A に対する自己抗体だが、FXIII-A 活性化ペプチドの切断および FXIII-A と FXIII-B の異種四量体形成は阻害しないが、FXIII-A のアミン取り込み活性を強く阻害する。B 型は FXIII-B に対する自己抗体である。今回解析したのは Aa 型の症例で活性化ペプチドおよびバレル 2 を認識していた。Aa 型は

トロンビンによる FXIII-A 活性化ペプトの切断を阻害するので活性化ペプチドを認識する自己抗体が生成しているのは理にかなっている。

また、今回解析を行った抗FXIII-A mAbは変性rFXIII-Aに対する反応性が1桁以上低下していたことから構造認識抗体である可能性が示唆されるが、おもに1TH2-8C4Cはバレル2、1TH6-2H7Fはバレル1あるいは2、1TH6-10Eはバレル1を認識していると考えられる。3種のmAbのエピトープはそれぞれ異なっていることが強く示唆され、現在この内の2種(1TH2-8C4Cと1TH6-2H7F)を用いたイムノクロマトを開発している。

抗FXIII-B mAbの解析では、1-3Cが第2-4寿司ドメイン、3-3D、4-2B、5-11Bは第5寿司ドメイン、1-3Bは第6寿司ドメイン、6-5Fが第9寿司ドメイン、5-6Cは第9-10寿司ドメインを認識していると考えられる。今後、認識部位の異なるmAbの組み合わせで新規にイムノクロマト法による抗F13-B抗体検出法を開発する予定である。

抗FXIII-B同種抗体が検出された先天性欠損症例ではELISAの結果から第5寿司ドメインを認識していることが強く示唆された。実際にヒト検体にも適用できたことからAH13のB型のエピトープ解析にも適用できる可能性は十分ある。

E. 結論

ドメイン単位での抗体認識部位の同定が可能になり、実際にAH13症例の検体および、ヒト同種抗体の解析にも適応できることが示された。今後は、残りのAH13症例検体の自己抗体のエピトープを解析し、より詳細なFXIII機

能阻害のメカニズム解明に繋げていく予定である。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

研究会

1. 尾崎 司, 惣宇利 正善, 曲 泰男, 一瀬 白帝: 後天性血友病 XIII (13) の診断に有用な、抗凝固第 13 因子モノクローナル抗体のエピトープ探索. 第 50 回東北止血・血栓研究会, 仙台; 2012 年 9 月 8 日
2. 尾崎 司, 惣宇利 正善, 杉山 大輔, 曲 泰男, 一瀬 白帝: 凝固 XIII 因子 A サブユニットに対するモノクローナル抗体のエピトープ探索. 第 20 回山形分子生物学セミナー, 鶴岡; 2012 年 11 月 26 日
3. 尾崎 司, 惣宇利 正善, 杉山 大輔, 曲 泰男, 一瀬 白帝: 後天性血友病 13 の診断に有用な抗血漿トランスグルタミナーゼ (凝固第 XIII 因子) 抗体のエピトープ探索法の開発. 第 15 回トランスグルタミナーゼ研究会学術集会, 福岡; 2012 年 12 月 13 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

分担研究報告書

後天性von Willebrand症候群 (AvWS) の発症機序に関する研究

研究分担者 松下 正 名古屋大学医学部附属病院輸血部 教授

研究要旨

当該班に対して相談・登録のあった原因不明の出血傾向を示す症例に対して検討を行った。スクリーニング検査として出血時間、活性部分トロンボプラスチン時間 (APT T)、FVIII : Cにて異常を示し、リストセチンコファクター活性(VWF:RCo)とVWF:Agのいずれかが低値を示した症例であって、出血傾向の家族歴が希薄であるなど先天性VWDとの鑑別診断を要する症例に対して、後天性von Willebrand症候群 (AvWS) の発症要因を明らかにすることを試みた。2症例いずれもIgG1型を主とするIgG抗体が検出され、免疫学的機序による発症であることが示唆されたが、抗体価の強さと臨床症状、VWF:RCoには一定の関係はなく、IgG抗体価のみではAvWSの重症度を予測することは困難であると考えられた。

A. 研究目的

出血性後天性凝固異常症のなかには、一般凝固検査によってスクリーニングが著しく困難なものが存在する。家族歴、既往歴の無い出血性後天性凝固異常症は従来稀であったが、近年の人口の高齢化に伴い次第に増えつつあり、しばしば致命的であり早期診断、早期治療が不可欠である。これらの中で最も高頻度である後天性血友病A(約1.5人/100万人/年; Collinsら, 2007)に対しては近年臨床的な側面からそのmanagementの改革が進み、本邦においても診療ガイドラインが作成されている(田中一郎, ほか 2011)。これに比して後天性フォン・ヴィレブランド症候群(Acquired von Willebrand Syndrome; 以下AvWS)は後天性血友病に次ぐ発症頻度であると考えられるが、未だその病態、臨床実態にはきわめて不明な点が多く、特に日本では本症候群への注目度が低かったため、見逃されていることが多く、実際の発症頻度はもっと高い可能性が考えられる。

1968年にSimoneらが初めて報告(Simone, et al 1968)して以来、本症候群では、基礎疾患があることが特徴的とされてきた(表1)。

表1 AvWSの基礎疾患

リンパ増殖性疾患(37%)
単クローン性蛋白(M蛋白)をともなう疾患
良性単クローン血症
骨髄腫
低悪性度リンパ腫
原発性マクログロブリン血症
慢性リンパ性白血病

その他の悪性リンパ腫
骨髄増殖性疾患(18%)
悪性新生物(5%)
Wilms 腫瘍
自己免疫疾患(5%)
循環器疾患(15%)
その他(薬剤性等) (20%)

本症候群の臨床症状としては皮膚粘膜出血が主体であり、時に消化管毛細血管拡張症を伴う消化管出血を認めることもあり、先天性von Willebrand病(以下VWD)との類似点が多いが、その病態は大きく異なる。

AvWSでは、vWFは骨髄巨核球や血管内皮細胞から正常に分泌されている。発症には大きく分けて①免疫学的機序、②VWFの血小板、組織、腫瘍細胞などへの吸着、③何らかの機序によるADAMTS13の過剰活性の3つが考えられる。このうち、①ではvWFの機能部位を認識する抗体(インヒビター)による機能の阻害とともに、その免疫複合体が網内系への取り込みにより循環血液中より除去されることが考えられる。また、これらの抗体の認識部位は、血小板膜糖蛋白(GP)Ib結合ドメインあるいはコラーゲン結合ドメインであるとの報告もある。

本分担研究では当該班に相談・登録された原因不明の出血傾向を示す症例の中で、スクリーニング検査として出血時間、活性部分トロンボプラスチン時間 (APTT)FVIII : Cにて異常を示し、リストセチンコファクター活性(VWF:RCo)とVWF:Agのいずれかが低値を示した症例であって、出血傾向の家族歴が希薄であるなど先天性VWDとの鑑別診断を要する症例に対して、その発症

要因としての免疫学的機序を明らかにすることを試みた。

B. 研究方法

Microtiter platesを精製ヒトVWFでコートし、4°Cで吸着後、1%BSA-PBSでブロッキング、段階希釈した患者血漿を添加し、1 h at 22°Cでインキュベートした。洗浄後、HRP結合した抗ヒトIgG家兔血清(Dako)または抗ヒトIgM ヤギ血清(Sigma)で1 h 22°Cでインキュベートした。洗浄後OPDにて発色させm 490 nmの吸光度を測定した。各IgG subclassは抗ヒトIgG1, 2, 3 4マウス血清を用いて同様に行った。

(倫理面への配慮)

検体はあらかじめ文書による同意を得たあと静脈血より採取したものを参加施設において連結可能匿名化した後測定を行った。なお、各施設における検体採取・送付に関しては当該施設における倫理審査手続きに従って行った。

C. 研究結果

1 対象症例

	Type 3(インヒビター陽性)	Pt-1	Pt-2
年齢	5	36	42
性別	F	F	F
基礎疾患	なし	パルプロ酸内服中	不明
主な臨床症状	鼻出血・関節内出血	鼻出血・卵巣出血	鼻出血・止血困難
APTT (sec)	72.1	48.2	76.3
APTT 対照 (sec)	35	38.2	ND
FVIII:C (%)	1.8	20	21.1
VWF:Rco (%)	<10	<6	<6
VWF:Ag (%)	<5	23	6

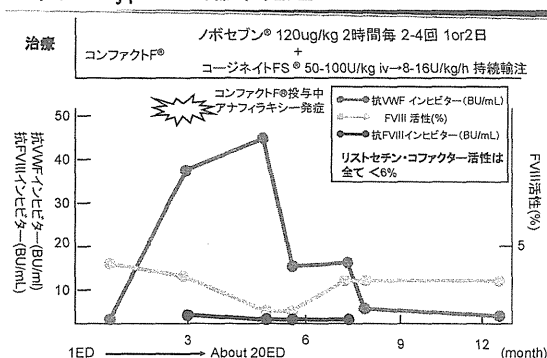
2 症例の経過

Type 3

1歳頃より皮下出血や鼻出血を高頻度に認めていた。予防接種後に止血困難が見られたのを契機に精査を行った所、VWD、VWF マルチマー泳動から、Type3と診断された。粘膜出血が頻回に見られたため、血漿由来第VIII因子製剤(コンファクトF®) 25単位/kgの投与を開始。約20ED後にアナフィラキシー症状が出現し、ベセスダ法により抗VWFインヒビターが確認された。

その後出血時対応としては、活性型第VII因子製剤(ノボセブン®)のポーラス投与と遺伝子組み換え第VIII因子製剤(コージネイトFS®)の持続投与を併用している(図1)。

図1 Type 3: 臨床経過 まとめ



Pt1

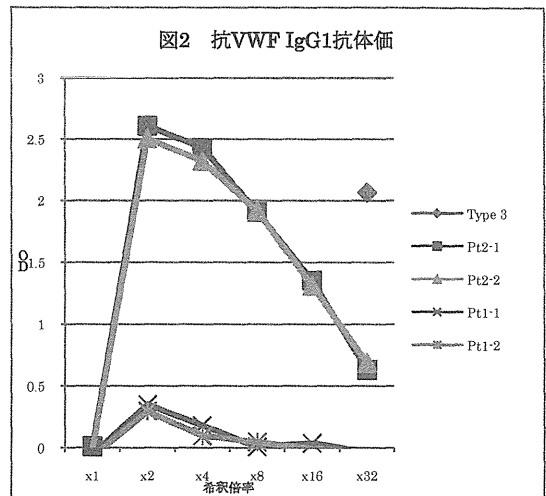
紫斑や粘膜出血の精査にてAvWSが疑われた。一児出産歴あるも出血傾向なし。精査入院中に卵巣出血による急性腹症に対しコンファクトF® 2000単位、1日2回、3日間の投与により改善。7日後、対側卵巣出血による腹痛に対しデスマプレシン20μgの投与により症状軽快した。

Pt2

突然に鼻出血が頻回となり、止血に数時間かかるようになった。血液検査でAPTT延長(60秒台)を指摘された。虫垂炎手術歴、分娩(4回)時等の異常出血のエピソードなし。

3 AvWS発症機序の解析

登録2症例に対して免疫学的機序によるものと考え、抗VWF抗体の検出を試みた(図2)。結果、いずれもIgG1型を主とするIgG抗体が検出され、免疫学的機序による発症であることが示唆された。



D. 考察

AvWSは通常先天性VWDが幼少時の鼻出血を大きな特徴とするのに対して、成人発症の場合は明らかにそれまでに経験したことのないような粘膜出血を経験することが特徴である。

今回の検討の結果、抗体価の強さと臨床症状、VWF:RCoには一定の関係はなく、IgG抗体価のみではAvWSの重症度を予測することは困難であると考えられた。

E. 結論

今年度集積されたAvWS2例を解析し、免疫学的機序を明らかにした。

文献

田中一郎, et al. (2011) 後天性血友病 A診療ガイドライン. 日本血栓止血学会誌, 22, 295-322.

Simone, J.V., et al. (1968) Acquired von Willebrand's syndrome in systemic lupus erythematosus. Blood, 31, 806-812.

G. 研究発表

1. 論文発表

1. A novel ENG mutation causing impaired co-translational processing of endoglin associated with hereditary hemorrhagic telangiectasia. Suzuki A, Nakashima D, Miyawaki Y, Fujita J, Maki A, Fujimori Y, Takagi A, Murate T, Teranishi M, Matsushita T, Saito H, Kojima T. *Thromb Res.* 2012 May;129(5):e200-8. doi: 10.1016/j.thromres.2011.12.030. Epub 2012 Mar 3.

2. Thrombosis from a prothrombin mutation conveying antithrombin resistance. Miyawaki Y, Suzuki A, Fujita J, Maki A, Okuyama E, Murata M, Takagi A, Murate T, Kunishima S, Sakai M, Okamoto K, Matsushita T, Naoe T, Saito H, Kojima T. *N Engl J Med.* 2012 Jun 21;366(25):2390-6.

3. Increased von Willebrand Factor to ADA MTS13 ratio as a predictor of thrombotic complications following a major hepatectomy. Kobayashi S, Yokoyama Y, Matsushita T, Kainuma M, Ebata T, Igami T, Sugawara G, Takahashi Y, Nagino M. *Arch Surg.* 2012 Oct;147(10):909-17. doi: 10.1001/archsurg.2012.998.

4. Comparison of the efficacy of ribavirin plus peginterferon alfa-2b for chronic hepatitis C infection in patients with and without coagulation disorders. Honda T, Katano Y, Kuzuya T, Hayashi K, Ishigami M, Itoh A, Hirooka Y, Nakano I, Ishikawa T, Toyoda H, Kumada T, Yamamoto K, Matsushita T, Kojima T, Takamatsu J, Goto H. *J Med Virol.* 2012 Nov 14.

5. A possible mechanism for Inv22-related F8 large deletions in severe hemophilia A patients with high responding factor VIII inhibitors. Fujita J, Miyawaki Y, Suzuki A, Maki A, Okuyama E, Murata M, Takagi A, Murate T, Suzuki N, Matsushita T, Saito H, Kojima T. *Journal of Thrombosis and Haemostasis.* 2012 10:2099-107

2. 学会発表

口演

1. 抗VWFインヒビター保有 von Willebrand Disease (VWD) Type3症例における製剤選択 鈴木 伸明(名古屋大学医学部附属病院 検査部), 三田 直美, 松下 正, 小嶋 哲人, 山本 晃士, 勝見 章, 林 磨由子, 梶浦 容子, 高津 真由美, 直江 知樹 第60回日本輸血・細胞治療学会総会 2012/5/25 ホテルハマツ

2. 遺伝子組み換えFIX製剤(ベネフィクス)の薬物動態試験と周術期クリアランスの比較検討 鈴木 伸明(名古屋大学医学部附属病院 検査部), 牛島 洋子, 林 磨由子, 松下 正, 直江 知樹 第34回日本血栓止血学会学術集会 2012/6/8 ハイアットリージェンシー東京

3. 簡便クロスミキシングテストを用いた遅延型第VIII因子インヒビターのスクリーニング方法の検討 山本 ゆか子(名古屋大学医学部附属病院 医療技術部臨床検査部門), 梶浦 容子, 柴山 修司, 高津 真由美, 稲垣 恵章, 松本 祐之, 浅野 直子, 松下 正第34回日本血栓止血学

会学術集会 2012/6/8 ハイアットリージェンシー東京

4. 当院の後天性血友病10例の検討 林 磨由子(名古屋大学 大学院医学系研究科血液・腫瘍内科), 鈴木 伸明, 松下 正 第34回日本血栓止血学会学術集会 2012/6/8 ハイアットリージェンシー東京

5. 静脈血栓塞栓症リスク・アンチトロンビン抵抗性とそのスクリーニング検査法 高木 明, 宮脇 由理, 鈴木 敦夫, 藤田 絢子, 牧 明日加, 奥山 恵理子, 村田 萌, 村手 隆, 松下 正, 小嶋 哲人 第34回日本血栓止血学会学術集会 2012/6/8 ハイアットリージェンシー東京

6. 抗ウイルス剤リバビリンは血液凝固第VII因子の新生mRNA合成を促進する 鈴木 敦夫(名古屋大学 大学院医学系研究科医療技術学専攻病態解析学分野), 宮脇 由理, 奥山 恵理子, 村田 萌, 高木 明, 村手 隆, 林 磨由子, 鈴木 伸明, 山本 晃士, 松下 正, 齋藤 英彦, 小嶋 哲人 第34回日本血栓止血学会学術集会 2012/6/9 ハイアットリージェンシー東京

7. 先天性アンチトロンビン欠損症3症例のSERPINC1遺伝子解析 加藤 衣央, 安藤 裕実, 高木 夕希, 奥山 恵理子, 村田 萌, 高木 明, 村手 隆, 松下 正, 中島 忠亮, 小嶋 哲人 第13回日本検査血液学会学術集会 2012/7/28 高槻現代劇場

ポスター

1. 名古屋大学における血友病Bの血液凝固第IX因子遺伝子解析 村田 萌, 奥山 恵理子, 鈴木 敦夫, 宮脇 由理, 高木 明, 村手 隆, 松下 正, 鈴木 伸明, 林 磨由子, 齋藤 英彦, 小嶋 哲人 第34回日本血栓止血学会学術集会 2012/6/8 ハイアットリージェンシー東京

2. Anti-drug antibody formation in haemophilia patients with inhibitors after receiving recombinant activated FVII analogue (vatreptacog alfa) J. MAHLANGU, F. A. KARIM, M. GORSKA-KOSICKA, S. KAICKER, T. MATSUSHITA, M. RECHT, M. SERBAN, S. LENTZ, K. N. WELDINGH, S. EHRENFORTH, ON BEHALF OF THE ADEPTE2 INVESTIGATORS The 6th Annual Congress of the European Association for Haemophilia and Allied Disorders 2012/7/28 Sofitel Warsaw Victoria

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

分担研究報告書

分担課題：グローバル線溶能測定法の開発

研究分担者 浦野 哲盟 浜松医科大学医生理学講座 教授

研究要旨

「診断困難な(原因不明の)出血性後天性凝固異常症の総合的診療指針」に関わる「線溶能測定法の開発」を担当する。一般凝固検査でスクリーニングが困難な後天性線溶異常症、及び後天性フィブリン安定化異常症のスクリーニングのための、グローバル線溶能検査法の確立を目指す。検査法は、Rijken DC 等の方法 (J Thromb Haemost 2008; 6: 151-7.) を基盤とし、これを本目的のために改良する。基本的には、採血後の全血をトロンビン処理後、一定時間反応後に生成された D-dimer 量を測定する方法である。その際アプロチニン添加により線溶系を抑制した検体における D-dimer 量と比較することにより、各検体固有の線溶活性、並びに固有のフィブリン安定化程度を検出することができる。正常ボランティア血漿を用いた検討では、トロンビン処理及び検体に加えて組織因子処理の検体を測定することで、各検体固有の線溶活性、並びに固有のフィブリン安定化程度を検出可能であることが示され、「出血性後天性凝固異常症の総合的診療」に有用であると考えられた。

A. 研究目的

一般凝固検査でスクリーニングが困難な後天性線溶異常症、及び後天性フィブリン安定化異常症のスクリーニングのための、グローバル線溶能検査法の確立を目指す。

B. 研究方法

検査法は、Rijken DC 等の方法 (J Thromb Haemost 2008; 6: 151-7.) を基盤とし、これを本目的のために改良する。基本的には、採血後の全血をトロンビン処理後、一定時間反応後に生成された D-dimer 量を測定する方法である。その際アプロチニン添加により線溶系を抑制した検体における D-dimer 量と比較することにより、各検体固有の線溶活性、並びに固有のフィブリン安定化程度を検出することができる。(倫理面への配慮)

正常ボランティアの検体で検査法の妥当性を確認後、患者検体で検討する。実施は浜松医科大学倫理委員会の承認を得て行い、十分な説明後に書面でのインフォームドコンセントを得た後検体を採取する。

C. 研究結果

全血を既知量のトロンビンで刺激し一定時間内に産生される D-dimer 量を測定する「グローバル線溶能検査法」の基礎的データを集積した。D-dimer 産生量は使用するトロンビン濃度依存性に Bell-shape に変動した。アプロチニン存在下で線溶を抑制した検体との差が最も大

きかった、最終濃度 0.1u/ml を採用することとした。産生量はまた時間依存性であったが、2時間の incubation により十分な産生が認められたため、臨床現場での簡便性も考慮し、これを採用することとした。予想に反し、トロンビンのかわりに組織因子を使用すると、D-dimer の産生は有意に抑制された。検体内での十分な凝固系活性化により得られた FXIIIa によるフィブリンの安定化、あるいは $\alpha 2$ -antiplasmin のフィブリンへの架橋によるものと考えられた。

D. 考察

トロンビン処理及び組織因子処理の両方の検体を測定することで、FXIII や $\alpha 2$ -antiplasmin の機能異常がより明確に検出することが可能であり、各検体固有の線溶活性、並びに固有のフィブリン安定化程度を検出可能であると期待される。

E. 結論

本検査方法は、「出血性後天性凝固異常症の総合的診療」に有用であると考えられた。

F. 健康危険情報

G. 研究発表

1. 論文発表

- Urano T and Suzuki Y. Accelerated fibrinolysis and its propagation on vascular

endothelial cells by secreted and retained tPA. J Biomed Biotechnol, 2012, Article ID 208108.

2. 学会発表

- ・ 浦野哲盟、鈴木優子 シンポジウム「血管病を考える」：血管内皮細胞上の線溶活性発現ポテンシャル維持機構とその破綻 第 17 回日本病態プロテアーゼ学会 浜松 2012 08 10
- ・ Urano T, Suzuki Y. Symposium “Fibrinolysis” Membrane-retained secreted tPA effectively triggers fibrinolysis on vascular endothelial cells. The VIIth congress on Asia-Pacific Thrombosis and Haemostasis, Melbourne 2012 10 27-31

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

IV. 班會議

厚生労働科学研究費補助金
難治性疾患等克服研究事業（難治性疾患克服研究事業）

「診断困難な（原因不明の）出血性後天性凝固異常症の総合的診療指針の作成」

平成 24 年度 第 1 回班会議プログラム

日時： 平成 24 年 6 月 17 日(日) 10:00～15:00

場所： 東京国際フォーラム 会議室 G602（東京都千代田区丸の内 3-5-1）

09:50～10:00	受付	
10:00～12:00	<ul style="list-style-type: none">・ 23 年度までの報告概要(まとめ)・ 22～24 年度の評価の推移と対応・ 24 年度の実施計画(全体)	一瀬 白帝
(12:00～13:00)	昼食	
13:00～14:00	24 年度の実施計画(研究分担者) <ul style="list-style-type: none">・ 惣宇利 正善 先生 (山形大学医学部)・ 尾崎 司 先生 (山形大学医学部)・ 松下 正 先生 (名古屋大学医学部)・ 浦野 哲盟 先生 (浜松医科大学)	
14:00～14:50	症例検討会 (各 10 分) <ul style="list-style-type: none">・ 岡村 孝 先生 (久留米大学医学部)・ 日笠 聡 先生 (兵庫医科大学)・ 家子 正裕 先生 (北海道医療大学歯学部)・ 岡本 好司 先生 (北九州市立八幡病院)・ *臼井 英治 先生 (伊勢赤十字病院)・ *石坂 泰三 先生 (福井・坂井市立三国病院)	*一瀬 *一瀬
14:50～15:00	全体討論	一瀬 白帝

厚生労働科学研究費補助金
難治性疾患等克服研究事業（難治性疾患克服研究事業）

「診断困難な（原因不明の）出血性後天性凝固異常症の総合的診療指針の作成」

平成24年度 第2回班会議プログラム

日時： 平成25年1月13日(日) 10:00～15:00

場所： 山形大学東京サテライト リエゾン509
(東京都港区芝浦3-3-6)

09:50～10:00	受付	
10:00～11:20	24年度の研究成果とまとめ 自己評価 25年度の実施計画(全体)	一瀬 白帝
11:20～12:00	24年度の研究進捗状況と25年度の展望(研究分 担者) ・惣宇利 正善 先生 (山形大学医学部) ・尾崎 司 先生 (山形大学医学部) ・松下 正 先生 (名古屋大学医学部) ・浦野 哲盟 先生 (浜松医科大学)	
(12:00～13:00)	昼食	
13:00～14:00	症例検討会 ・小川 大輔 先生 (長崎県立島原病院) ・浅尾 優 先生 (愛知県・海南病院) ・神谷 悦功 先生 (東名古屋病院) ・小川 孔幸 先生 (群馬大学医学部)	
14:00～15:00	全体討論 その他	一瀬 白帝

V. 研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表レイアウト

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
	なし						

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Sugiyama H, Uesugi H, Suzuki S, Tanaka K, <u>Souri M,</u> <u>Ichinose A.</u>	Aggressive fatal case of autoimmune hemorrhaphilia resulting from anti-Factor XIII antibodies.	Blood Coagul Fibrinolysis.	24(1)	85-9.	2013
Matsuoka M, Majima T, Onodera T, Ieko M, <u>Souri M,</u> <u>Ichinose A,</u> Kurita T, Kasahara Y, Inoue M, Takahashi D.	Hemorrhagic-acquired factor XIII deficiency associated with tocilizumab for treatment of rheumatoid arthritis.	Int J Hematol.	96(6)	781-5.	2012
<u>Souri M,</u> Yee VC, Fujii N, <u>Ichinose A.</u>	Molecular modeling predicts structural changes in the A subunit of factor XIII caused by two novel mutations identified in a neonate with severe congenital factor XIII deficiency.	Thromb Res.	130(3)	506-10.	2012

Hayashi T, Kadohira Y, Morishita E, Asakura H, <u>Souri M,</u> <u>Ichinose A.</u>	A case of acquired FXIII deficiency with severe bleeding symptoms.	Haemophil ia.	18(4)	618-20.	2012
<u>Ichinose A</u>	Factor XIII is a key molecule at the intersection of coagulation and fibrinolysis as well as inflammation and infection control.	Int J Hematol.	95(4)	362-70	2012

Aggressive fatal case of autoimmune hemorrhaphilia resulting from anti-Factor XIII antibodies

Hiroyuki Sugiyama^a, Hiroko Uesugi^a, Satoshi Suzuki^b, Kenji Tanaka^c, Masayoshi Souri^d and Akitada Ichinose^d

Factor XIII (FXIII) is a fibrin-stabilizing factor consisting of catalytic A subunits (FXIII-A) and carrier B subunits (FXIII-B). Congenital FXIII deficiency is a rare bleeding disorder. Acquired FXIII deficiency resulting from FXIII hyposynthesis and/or hyperconsumption is a relatively common disorder in which patients seldom bleed. On the contrary, 'autoimmune/acquired hemorrhaphilia XIII/13 due to anti-FXIII antibodies (AH13)' is a rare but life-threatening bleeding disorder. Through a nationwide survey of AH13, we diagnosed aggressive AH13 in a 66-year-old woman. She consulted our department because of a spontaneous hematoma in her hand. After 1.5 months, she also developed an intramuscular hematoma but retained approximately half (52%) of the normal FXIII activities. The patient's bleeding symptoms were aggravated to catastrophic massive bleedings in the large abdominal muscles and intrapelvic and intraperitoneal spaces. Two months after the bleeding onset, she died despite undergoing plasma exchange, which was performed because we were deeply suspicious of the presence of an anti-FXIII inhibitor. Seven days after her death, extremely low FXIII activity (6%) and positive data on anti-FXIII

inhibitor were reported by a commercial laboratory. Our dot blot assay detected anti-FXIII-A autoantibodies, afterwards. Thus, the diagnosis of aggressive AH13 as early as possible is necessary to save patients' lives. *Blood Coagulation and Fibrinolysis* 23:000–000 © 2012 Wolters Kluwer Health | Lippincott Williams & Wilkins.

Blood Coagulation and Fibrinolysis 2012, 23:000–000

Keywords: autoantibody, autoimmune disease, factor XIII deficiency, fatal bleeding disorder, point-of-care test

^aDepartment of Hematology, ^bDepartment of Emergency and Intensive Care, ^cDepartment of Orthopedics, Saiseikai Noe Hospital, 1-3-25 Furuichi, Joto-ku, Osaka and ^dDepartment of Molecular Patho-Biochemistry and Biology, Yamagata University School of Medicine, 2-2-2 Iida-Nishi, Yamagata, Japan ✓

Correspondence to Akitada Ichinose, MD, PhD, Professor and Chairman, Department of Molecular Patho-Biochemistry and Biology, Yamagata Univ. School of Medicine, 2-2-2 Iida-Nishi, Yamagata, 990-9585 Japan. Tel: +81 23 628 5275; fax: +81 23 628 5280; e-mail: aichinos@med.id.yamagata-u.ac.jp

Received 26 April 2012 Revised 4 July 2012
Accepted 3 August 2012

were rapidly aggravated and she died within 2 months after the onset of the first bleeding.

Patient

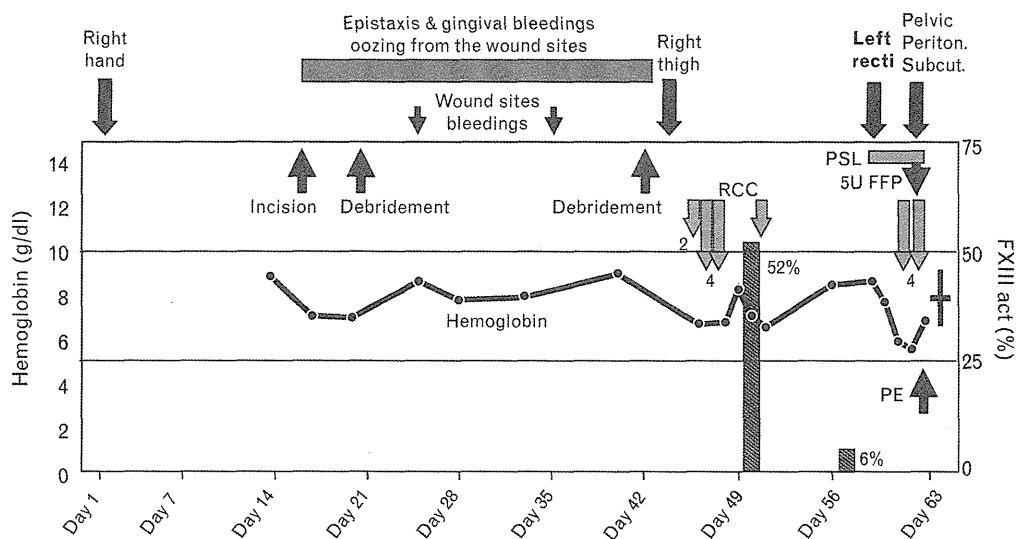
A 66-year-old Japanese woman with a hematoma in her right hand consulted our department in late February 2011 (day 14; Fig. 1). The patient and her family had no history of bleeding tendency. At approximately the age of around 30 years, she underwent gastrectomy for gastric ulcer and a transfusion (unspecified); afterwards, she underwent a hemorrhoidectomy and a caesarean section without any excessive bleeding. She was found to have neurosyphilis in the summer of 2010 and received aceftriaxone (CTRX) infusion. In the middle of January 2011, she was admitted to a hospital owing to a compression fracture of the thoracic vertebra. She then spontaneously developed a subcutaneous hematoma on the back of her right hand at the beginning of February 2011 (day 1; Fig. 1, top). As her right fingers became paralysed as the hematoma expanded, compartment syndrome was suspected. She was transferred to our hospital in the middle of February (day 14), and underwent incision of the hematoma (day 16). The wound oozed continuously from that point forward. She also started to experience epistaxis and gingival bleeding

Introduction

Factor XIII is a fibrin-stabilizing factor, consisting of catalytic A subunits (FXIII-A) and noncatalytic carrier B subunits (FXIII-B) [1,2]. Congenital FXIII deficiency is a rare hemorrhagic disorder. In contrast, acquired FXIII deficiency is a relatively common disorder, frequently caused by a nonautoimmune secondary FXIII reduction resulting from hyposynthesis and/or hyperconsumption of FXIII because of a primary disease(s) [3,4]. An autoimmune disease, 'acquired hemophilia,' results from the presence of autoantibodies directed against coagulation factors, most commonly factor VIII (FVIII) [5]. Recently, recognition of this bleeding disorder is increasing [6]. On the contrary, information on only a small number of cases of 'autoimmune hemorrhaphilia due to anti-FXIII/13 inhibitors (AH13)' has been collected [3,4]. AH13 must be distinguished from regular 'hemorrhagic acquired FXIII deficiency (HAFXIIIdef)' [4], as the former tends to be more severe than regular HAFXIIIdef, and requires immunosuppressive therapy to eradicate autoantibodies.

During our nationwide survey on AH13 [3,7], we diagnosed severe AH13 in a Japanese woman, who developed autoantibodies against FXIII-A. Her bleeding symptoms

Fig. 1



Clinical course of the present case. The patient experienced four bleeding episodes that were progressively aggravated and ultimately led to her death (day 63) only 2 months after the initial bleeding. She received prednisolone (PSL) and underwent plasma exchange (PE) owing to the suspected presence of anti-FXIII antibodies was suspected. Her FXIII activity reduced rapidly from 52 to 6% within 7 days (shaded columns). Red cell concentrates (RCC) were infused at 2 or 4 units when hemoglobin levels dropped significantly. Five units of fresh frozen plasma (FFP) were also given the day before her death. Large downward arrows, major bleeding episodes; small downward arrows, bleedings from the incision/debridement wound sites.

while brushing her teeth. On the fifth day after the transfer (day 18), the patient consulted our hematology department. Routine laboratory tests revealed moderate anemia, renal dysfunction, and a high C-reactive protein level. Her serum was positive for antihepatitis C virus (HCV) antibody (Ab), rapid plasmin regain and *Treponema pallidum* hemagglutination assay result. Although the prothrombin time (PT) and platelet count were normal, the activated partial thromboplastin time (aPTT) was slightly prolonged in the coagulation screening tests. The patient underwent debridement of the necrotic tissues in her right hand (days 21 and 42) and repeated postoperative bleedings since then. The patient developed an intramuscular hematoma in her right thigh 5 days (day 44) after twisting at the waist, and fell into a state of shock (SBP <70 mmHg; day 47). She was then transfused with red cell concentrates (RCC) because of further aggravation of the anemia (Hb 6.5 g/dl). As FXIII deficiency was suspected, her plasma sample was sent to a commercial laboratory (day 50). After 5 days (day 55), the FXIII activity determined by an ammonia release assay was reported to be 52% of the normal activities. As we deeply suspected AH13, further FXIII-related examinations including a cross-mixing test were out-sourced to two commercial laboratories (day 57). All the coagulation test results were within normal or subnormal ranges, except for the mildly decreased FXII/12 activity in her plasma (Suppl. Table 1, <http://www.id.yamagata-u.ac.jp/MolPathoBiochem/MolPathoBiochem.html>). Under growing suspicion of the presence of anti-FXIII inhibitor, she started to receive immunosuppressive therapy

with prednisolone at 20 mg per day (day 58). However, the next day she suddenly developed a painful intramuscular hematoma in her left abdominal rectus and a diffuse subcutaneous hematoma from her right waist to her thigh (Suppl. Figure 1, <http://www.id.yamagata-u.ac.jp/MolPathoBiochem/MolPathoBiochem.html>), and 2 days later (day 61), she was transferred to the ICU because of a shock state (SBP 80 mmHg) again and deteriorated consciousness. The abdominal hemorrhage expanded to the frontal intrapelvic cavity, and intra-peritoneal hemorrhage finally emerged (Suppl. Figure 1, bottom, <http://www.id.yamagata-u.ac.jp/MolPathoBiochem/MolPathoBiochem.html>).

Despite undergoing continuous hemodiafiltration (CHDF) first and subsequent plasma exchange, the patient fell into respiratory failure and was intubated the next day. The patient died on day 63 because of hemorrhagic shock resulting from the massive intra-peritoneal bleeding, within 2 months after the first bleeding episode on her right hand. The results of the FXIII-related examinations were reported by a commercial laboratory on the 14th day after the sample submission, that is, 7 days after her death (Suppl. Table 1, <http://www.id.yamagata-u.ac.jp/MolPathoBiochem/MolPathoBiochem.html>). Her FXIII activity was drastically deteriorated from 52 (day 50) to 6% (day 57) within 7 days. Moreover, a 1:1 cross-mixing test between her plasma and normal control plasma showed 5% as the resulting actual FXIII activity of the mixed plasma, whereas the theoretical value was 51% [(96 + 6 = 102)/

2]. Unfortunately, she received no FXIII replacement therapy because these FXIII-related assay results came back a week after her death.

Methods

This study was approved by the institutional review board of the Yamagata University School of Medicine. All the procedures were conducted in accordance with the Declaration of Helsinki. Informed consent was obtained from all the individuals including the present case and normal healthy controls.

Whole blood was collected into tubes containing a one-tenth volume of 3.8% sodium citrate. The plasma samples were quick-frozen and sent to a commercial laboratory (SRL Ltd., Hachioji, Japan) for analysis of the plasma FXIII activity and a 1:1 cross-mixing test for FXIII activity in the mixed plasma from the patient and a healthy individual.

The cases of suspected AH13 were examined for the presence of anti-FXIII inhibitors using five-step cross-mixing tests by amine incorporation assay for FXIII activity in the mixed plasma from a patient and a healthy individual and a dot blot test for antibodies against recombinant FXIII-A (rFXIII-A) and recombinant FXIII-B (rFXIII-B). We performed a fibrin cross-linking test, an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), and a western blotting assay for FXIII-A and FXIII-B antigens as previously described [8].

In order to estimate an anti-FXIII inhibitory activity, serial dilutions of patient's plasma with FXIII-deficient plasma were mixed with an equal volume of pooled plasma of healthy individuals ($n=26$) and incubated at 37°C for 2 h. Ten microliters of each plasma mixture was measured by amine incorporation assay for FXIII activity. Inhibitory potency was expressed in Bethesda Units/ml.

Results and discussion

Diagnosis of autoimmune/acquired hemorrhaphilia XIII/13 due to anti-FXIII antibodies and detection of anti-FXIII-A autoantibodies

During our recent nationwide survey on the incidence of AH13 [3,7], we identified a new case of AH13. As the results of all the coagulation tests were within normal ranges for the elderly Japanese female patient, various minute examinations related to FXIII were then conducted using residual frozen patient's plasma of day 57, which was an only available sample. The patient's plasma had extremely low levels of FXIII activity: 6 and 4% by the ammonia release assay and the amine incorporation assay, respectively. The result of the fibrin cross-linking test revealed an almost complete absence of γ -dimerization and α -polymerization (Fig. 2a), suggesting essentially no FXIII activity against its physiological substrates as well. The western blotting analysis detected a moderately reduced band of FXIII-A protein (Fig. 2b), a

finding that is consistent with the ELISA results (47% of the normal). In contrast, a normal amount of FXIII-B antigen was confirmed by the western blotting analysis (Fig. 2b) and ELISA (119% of the normal), clearly indicating a primary deficiency of FXIII-A that was not due to the lack of protection by FXIII-B. Moreover, an extremely low specific activity of FXIII ($5/47=0.11$), that is essentially no FXIII activity versus half-normal FXIII antigen) strongly suggests the presence of inactivated FXIII by an anti-FXIII inhibitor(s) in the patient's plasma.

The result of the cross-mixing test (1:1) between the patient's plasma and the normal control plasma via the use of a commercial ammonia release assay showed complete inhibition (Suppl. Table 1, <http://www.id.yamagata-u.ac.jp/MolPathoBiochem/MolPathoBiochem.html>). In addition, the results of the five-step dilution cross-mixing test by using a laboratory amine incorporation assay clearly showed a typical 'inhibitor' pattern due to a large downward deviation (Fig. 2c), which thus indicated a strongly positive result for an anti-FXIII inhibitor (1.1 Bethesda units/ml). Moreover, the dot blot assays using rFXIII-A, rFXIII-B, and their complexes clearly demonstrated the presence of anti-FXIII-A antibodies (Fig. 2d).

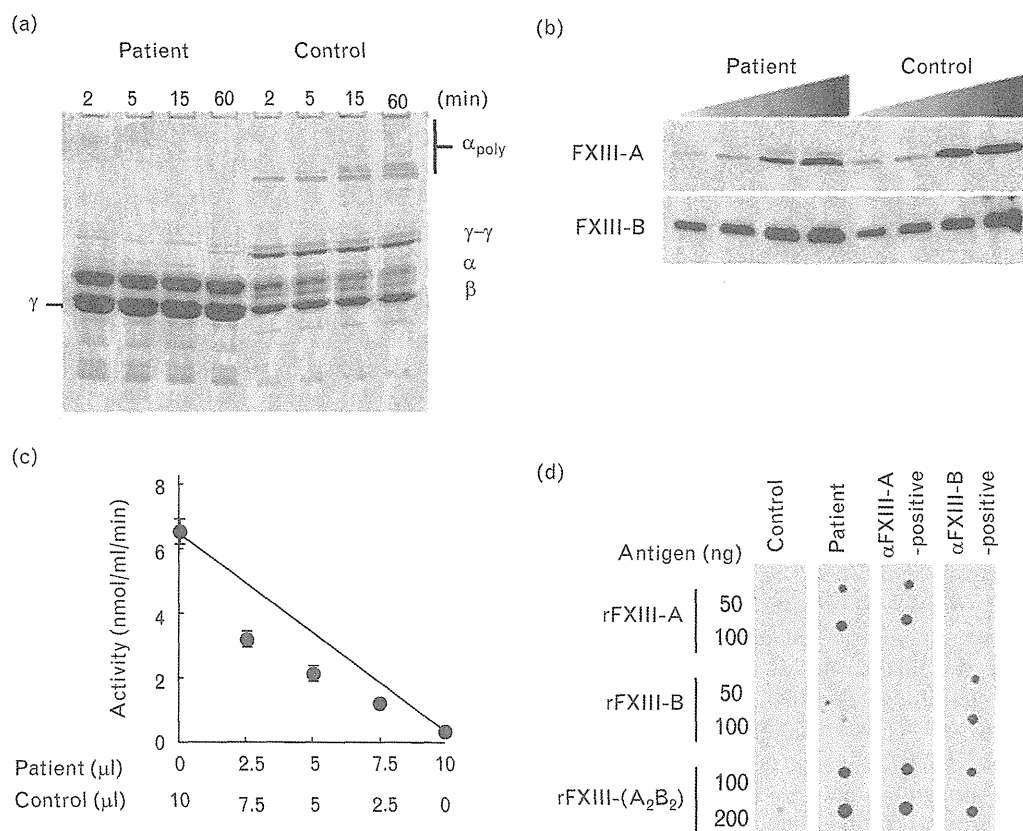
Underlying conditions of autoimmune/acquired hemorrhaphilia XIII/13 due to anti-FXIII antibodies

It is likely that the antibodies of this AH13 case were idiopathic, because the patient's first bleeding symptom emerged only 2 months before her hemorrhagic death in the absence of complications of other autoimmune diseases and malignancies [3,4]. About a half of all the AH13 cases were idiopathic at our hands, like AHA [5,6]. However, drug-induced disorders cannot be completely excluded from the underlying cause of this AH13 case, because she had received CTRX for neurosyphilis. CTRX is one of the most common drugs to cause drug-induced immune hemolytic anemia (DIIHA) [9,10]. This may be not a clear case of drug-induced antibodies because CTRX was administered approximately 6 months before the bleeding onset, and antibodies to CTRX are not of autoantibody type but only of the immune-complex type [11]. In the case of AH13, anti-FXIII inhibitors had developed while patients were taking isoniazid for pulmonary tuberculosis or ciprofloxacin for medial otitis [12,13]. The neurosyphilis *per se* and HCV infection may have also been related to the development of the patient's antibodies. It is worth noting that in our study, of 19 Japanese AH13 patients, one case was also positive for anti-HCV Ab ([4]; unpublished data).

Necessity for early diagnosis and treatment for aggressive autoimmune/acquired hemorrhaphilia XIII/13 due to anti-FXIII antibodies

To the best of our knowledge, this is the most aggressive case of all AH13 cases among the Japanese patients

Fig. 2



Analyses of the patient's FXIII and detection of anti-FXIII antibody. A fibrin cross-linking study was performed by the addition of 1 unit/ml thrombin and 5 mM CaCl₂ into the patient's plasma and normal control plasma. The clots were recovered at the indicated time intervals and subjected to sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis analysis. The results of the fibrin cross-linking study showed the lack of both γ -dimerization and α -polymerization reactions (panel a). A western blotting analysis was conducted using rabbit polyclonal anti-FXIII-A and FXIII-B antibodies. When diluted plasma was analyzed (dilution: 1/25 to 1/200; from the right to the left; panel b), the results showed a moderately reduced amount of FXIII-A protein (1/25 dilution of the patient's sample is comparable to 1/50 dilution of normal control) and a normal amount of FXIII-B protein. A five-step dilution cross-mixing test by amine incorporation assay was performed using the patient's plasma at the ratios of 0 : 1, 1 : 3, 1 : 1, 3 : 1, and 1 : 0 with normal plasma. The mixed samples containing the patient's plasma and normal plasma clearly showed an 'inhibitor' pattern, because there was a large downward deviation in all of the diluted samples (panel c). A dot blot assay was performed using rFXIII-A, rFXIII-B, and their complexes at the indicated amounts shown as antigen (ng). The results showed the presence of anti-FXIII-A antibodies (panel d). The positive controls stand for autoimmune/acquired hemorrhaphilia XIII/13 due to anti-FXIII antibodies (AH13) patients' plasmas identified previously [3,7].

studied [3,7] (a total of 28 cases as of March 2012 [14]). The authors believe that the patient's FXIII activity had already been significantly reduced by the autoantibodies against FXIII by day 16 as she developed continuous oozing from the incision site and epistaxis and repeated gingival bleeding. Whereas the patient showed 52% of FXIII activity at the time of her second consultation with our department (day 50), her FXIII activity drastically decreased to 5% within 7 days. It is possible that the second bleeding episode, an intramuscular hematoma in the patient's right thigh, further reduced her FXIII levels by its consumption. However, it is highly likely that the presence of anti-FXIII-A autoantibodies *per se* also had clinical implications for the patient's bleeding episodes by neutralizing the remaining small amount of FXIII, as clearly indicated

by the extremely low specific activity of FXIII. Thus, she developed the massive multiple bleedings into her left rectus abdominis muscle and subsequent expansion to the left flank, internal and external oblique muscles and a diffuse subcutaneous bleeding, as well as the fourth bleeding episode included left intrapelvic and intraperitoneal bleedings. Such catastrophic hemorrhages may have led to a further decrease in her FXIII levels despite the plasma exchange that was conducted to remove possible anti-FXIII inhibitors the day before her death.

The result of a commercial cross-mixing test for the screening of AH13 was reported 7 days after the patient's death and those of our extensive examinations on FXIII including a five-step dilution cross-mixing test and dot