

平成25年度 同一施設複数診療科からのアンケート回答状況

2014.01.20 現在

大学病院	4科対象施設	%	3科対象施設	%	2科対象施設	%	合計	割合(%)
アンケート回答数(0)	27	23.1			2	40	29	23.4
アンケート回答数(1)	45	38.5	2	100	3	60	50	39.5
アンケート回答数(2)	32	27.4					32	26.6
アンケート回答数(3)	12	10.3					12	9.7
アンケート回答数(4)	1	0.9					1	0.8
計	117	100.0	2	100	5	100	124	100.0
県立病院	4科対象施設	%	3科対象施設	%	2科対象施設	%	合計	割合(%)
アンケート回答数(0)	21	36.2	17	47.2	7	53.8	45	42.5
アンケート回答数(1)	22	37.9	13	36.1	5	38.5	40	37.7
アンケート回答数(2)	12	20.7	5	13.9	1	7.7	18	17.0
アンケート回答数(3)	2	3.4	1	2.8			3	1.9
アンケート回答数(4)	1	1.7					1	0.9
計	58	100.0	36	100.0	13	100.0	107	100.0
国立病院機構	4科対象施設	%	3科対象施設	%	2科対象施設	%	合計	割合(%)
アンケート回答数(0)	3	16.7	19	41.3	21	61.8	43	44.8
アンケート回答数(1)	8	44.4	19	41.3	9	26.5	36	37.5
アンケート回答数(2)	6	33.3	7	15.2	4	11.8	17	17.7
アンケート回答数(3)	1	5.6	1	2.2	0	0	2	0.0
アンケート回答数(4)	0	0	0	0	0	0	0	0.0
計	18	100.0	46	100.0	34	100.0	98	100.0
対象医療機関全体	4科対象施設	%	3科対象施設	%	2科対象施設	%	合計	割合(%)
アンケート回答数(0)	51	26.4	36	42.9	30	57.7	117	35.6
アンケート回答数(1)	75	38.9	34	40.5	17	32.7	126	38.3
アンケート回答数(2)	50	25.9	12	14.3	5	9.6	67	20.4
アンケート回答数(3)	15	7.8	2	2.4	0	0.0	17	5.2
アンケート回答数(4)	2	1.0	0	0.0	0	0.0	2	0.6
総計	193	100.0	84	100.0	52	100.0	329	100.0

1. 止血治療について

2014.02.03 現在

	(1) 出血するレベル			(2) 止血するレベル			(3) 抗線溶薬				他の回答	(4) 他の有効な止血治療				(5) その他			
	F13活性 (%)	VWF活性 (%)	アルファ2PI活性 (%)	F13活性 (%)	VWF活性 (%)	アルファ2PI活性 (%)	トランサミン		アプロチニン			有	具体的に	無	不明				
							有	無	有	無									
1	21	209	106	不明	不明	不明													
2	50	40		60	60							●	フィブロガミン					●	
3	50			90			●		●									●	わずかではありますが、多少効果はあった印象です。
4	10	不明	不明	不明	不明	不明		●											FFP、フィブロガミン投与以外に有効な止血治療はありませんでした。F13活性が5%でも出血しないこともありそれ以外の要素もあると考えます。
5																			F13活性については、出血しながら1週間で急激に変動(50%台から6%へ)したインヒビター陽性症例を経験しましたので、50%台でも要注意としかわかりません。
6	20	10		40	40		●												結合抗体の力価だけでなく、FXIIIインヒビター力価のベセスタ法のような機能的定量法はできないのでしょうか？
7	10未満			10以上							●	●	血管内塞栓術						凝固線溶の専門家のいる施設以外ではよほどの事情がない限り診るべきではない。
8	8	339	81	15															免疫抑制剤治療不応性でありました。長期臥床安静にしていたため入院加療以降、インヒビター消失しなくとも出血傾向は認めておりません。
9	10			30			●												フィブロガミンを投与しましたがどこまで関与したか不明です
10	50			50															当院では予防的にフィブロガミン投与をおこなっていましたが予防効果があったかどうかはわかりません。リツキサン投与後活性が30程度維持できて時は出血は起こらず経過しました。
11		30			50														特にありません
12	10	10	?				●												カルバゾクロム
13	49			122								●	13因子補充						各インヒビターの定量法の確立(活性抑制効果ではなくELISAなので力価や半定量でもかまわない)
14	5	30	30	60	60	80	●												投与を行っていません。
15	20-30	40-60	10-20	50-60	60-80	50-60	●		●										VWF活性、アルファ2PI活性についてはよく分かりません。
16	60			不明															測定数値と臨床症状が必ずしも相関しない
17	60			65															使用していません
18																			未使用
19	20			60								●	巨大動脈脈奇形の塞栓術						使用せず
20				10			●												●
21	30			50			●												●
22	20	5	?	50	20	?		●											あくまでもインヒビターのない欠乏の場合の印象です
23	40	40	わかりません	60	60	わかりません	●												一例、かつ止血後の紹介症例にて、詳細な言及が出来ません
24	<3	<5	<50	5	40	70	●												ベリクロムで測定したXIII因子活性が凝固活性として正確か？
25	63			139			●												一応書かせていただきましたが、疾患、病態によって考え方は変わるように感じました。当科ではアプロチニンの使用経験は30年にわたりにないと思います。
26	19			25															●
27	50	20		70	40														使用せず
28	35	142																	相談があったときには皮下出血の進行も少ないようで止血剤など薬剤を使用していません。
29	わかりません	5	わかりません	わかりません	20	わかりません	●					●	アドナ(カルバゾクロムナトリウム水和物)						今回DIOを鑑別せずに相談したことで混乱させてしまいました。
																			診断に関する検査の内容、検査施設に関する情報、治療方のガイドラインがあると良いと思っています

3. 班研究終了後の検査経費について

2014.02.03 現在

	検査の実施が可能か			検体を冷凍で送付することが可能か				
	実施する	実施しない	具体的なコメント	費用を誰が負担するのか	可能	不可能	具体的なコメント	検査費用を誰が負担するのか
1	●			病院負担(校費)	●			病院負担(校費)
2	●			大学の研究費	●			大学の研究費
3	●			大学	●			大学
4	●		回数は減ると思います	医局あるいは患者本人	●			医局あるいは患者本人
5	●			自己負担あるいは科の治験費	●			検体を冷凍で送付します。費用は科の治験費で負担します
6	●		診断に必要な不可欠な検査は施行しますが、正直費用負担は重荷に感じます	除適応範囲内は保険請求し、それ以外の検査は病院持ち出しor研究室の研究費からの負担となります	●		検体の郵送料の費用に関しては当講座の研究費での支払いで問題ないと存じます	費用にもよりますが、当講座の研究室の研究費からの負担でいたしかたないと思いますが、金額によっては正直費用負担は重荷に感じます
7	●			医局の研究費(私見)	●			医局の研究費(私見)
8	●			必要であれば担当病院負担	●			必要であれば担当病院負担
9	●		当院の患者様は亡くなられたのであくまでも生存されていた場合の仮定ですが、(1)(3)はおこないますがほかはおこなわない可能性があります	病院負担	●			病院負担
10	●		当院の検査委員会の承認が必要です。	患者本人	●		当院の検査委員会の承認が必要です。	患者本人
11	●			患者	●			患者
12	●			大学の研究費	●			大学の研究費
13								血液内科負担で測定します。
14	●			患者負担または医局研究費	●			患者負担または医局研究費
15		●	拠出する資金源とその目的に透明性が求められているため、研究目的と異なる使用は困難です		●			確約はできませんが講座費からの拠出予定
16				本人または校費で賄えるのであれば実施する				本人または校費で賄えるのであれば実施する
17	●		重症度・F13活性値により検査を行うか判断する。	病院負担で行っていましたが、病院負担は望ましくないとします。	●		重症度・F13活性値により検査を行うか判断する。	病院負担で行っていましたが、病院負担は望ましくないとします。
18	●			病院負担(病院幹部の承認が必要)	●			病院負担(病院幹部の承認が必要)
19	●		地方病院ですので負担が少ない方が助かります	病院または患者	●		地方病院ですので負担が少ない方が助かります	病院または患者
20	●		実施したい、というのが本音です。	自科あるいは自費	●			科の研究費に余裕があれば
21	●		患者様のご希望があれば	患者様ご本人にお願いすることになるとします	●		患者様のご希望があれば	患者様ご本人にお願いすることになるとします
22	●			当教室研究費	●			当教室研究費
23			経理処理が自己負担になる場合は、上記全ての検査は行いにくくなると思います。				検体を冷凍で送付することが可能だと思いますが(送料は発送者払い)、検査費用をどうするのかは現時点では判断できません、申し訳ございません。	
24	●			現時点ではわかりません	●			現時点ではわかりません
25	●			医局で負担	●			医局が負担
26				大学				入院患者の場合:病棟費用、外来患者の場合:医局費用
27	●			診断のために実施すると思いますが、検査費用は混合診療となるため研究費で支払うこととなります。	●			検査費用はやはり研究費で支払うこととなります。
28	●			教室 あるいは 病院	●			教室 あるいは 病院

FXIII/13濃縮製剤投与による症状に対する「逆」効果について

2014.02.03 現在

	1) FXIII/13濃縮製剤投与による止血効果が「認められたこと(改善)」がある。		2) FXIII/13濃縮製剤投与による止血効果が「認められなかったこと(不変)」がある。		3) 以前は、FXIII/13濃縮製剤投与による止血効果が認められたが、「その後認められなくなったこと(消失)」がある。		4) FXIII/13濃縮製剤投与後、出血症状が「逆に悪化」したことがある。		5) FXIII/13濃縮製剤投与「中止」後、出血症状が「逆に改善」したことがある。		2)、3)、4)、5)のどれかに「有り」と回答された方は、その状況を具体的に記述して下さい。
	あり	なし	あり	なし	あり	なし	あり	なし	あり	なし	
1	●			●		●				●	当院症例は、濃縮製剤投与により、インヒビター存在下で投与後の活性/抗原上昇が充分ではない条件下でも臨床上の止血効果は認めました。boost reactionを確認するような臨床上の濃縮製剤不応やインヒビター力価の著明な上昇というは認めませんでした。ただ、濃縮製剤投与中になかなか免疫抑制療法効果が表れなかったのが、たまたもとのインヒビターが高力価だったためか、抗原暴動によりインヒビター力価が増えたためか、は判断しかねます。
2	●			●		●				●	
3	●		●			●				●	
4	●			●		●				●	
5											ご質問は濃縮製剤を投与した症例が対象であり、わたしの症例は対象外です。
6		●		●		●				●	
7		●		●		●				●	
8	●			●		●				●	
9		●		●		●				●	
10		●	●			●				●	私どもの患者さんにはまだ投与したことはありません。 13因子測定感度以下で13因子製剤投与 13因子は上昇せず 止血には難渋 相前後トラネキサムさんは使用しているので判断は難しい 使用は1回で変化はわかりません
11		●	●			●				●	FFPなどと合わせて投与しています 下血であまり改善なかったのですがいつのまにか改善 改善の原因は明らかにはできなそうです
12											FXIII/13濃縮製剤は使用していません。
13	●			●		●				●	
14	●			●		●				●	
15	●			●		●				●	
16	●			●		●				●	
17											投与していない
18	●		●			●				●	boost reactionに関しては13因子インヒビター獲得患者の経験がありません。そういった症例に後補充療法を行うか否か当分としてはやはり免疫抑制剤等の治療をまず行い、改善の乏しい場合や改善してきている際に使用を検討するという形で行うことを検討しております。 13因子製剤投与で出血症状が明らかに改善したのは全身性エリテマトーデス患者の腹腔内出血と再発性多発軟骨炎患者の大腸筋出血の2例です。 また、全身性エリテマトーデス患者が脳出血をきたしたため改善目的に投与したことがあります。13因子製剤が状態改善に役立ったか判断困難ですが、脳出血は改善しました。 肺動脈出血患者2症例に13因子製剤を投与しました。 1例は前述の再発性多発軟骨炎患者で腎臓にインヒビター測定をお願いしましたが陰性でした。肺炎からの肺動脈出血で状態が重篤でした。DICに近い状態で血栓症のriskも高く13因子製剤の投与量はフィブリノゲン15mg/日としていたように記憶しています。肺動脈出血の明らかな改善はなかったように思われました。急性冠症候群を合併しましたが、状態も重篤であったため全身状態不良による循環不全が原因の可能性が高いと思われる、13因子製剤の影響があったか否かの判断は困難でした。 もう1例は全身性エリテマトーデス患者の薬剤性？間質性肺炎からの肺動脈出血でこちらも1例目同様重篤でした。同様の治療で同様の経過でした。 肺動脈出血と13因子欠乏症の関係はこちらも調べてみようと思っております。 他シェーグレン症候群に13因子欠乏症をきたした患者さんの妊娠時に婦人科の先生が13因子製剤を投与して無事出産したという症例がありました。
19	●			●		●				●	
20	●			●		●				●	現実的には、出血症状が軽微な例を除いて、これは不可能だと考えられます。 XIII因子の低下と出血傾向が認められた症例が受診した場合、XIII因子の単純欠乏かインヒビターかを短時間で判定する方法はありません。 後天性血友病の場合はAPTTの交差凝集試験をすれば、いずれかの目安をその日のうちにつけることができますが、XIII因子ではそれが不可能だからです。 研究班に検体を送りしたら翌日くらいに結果が出る限り、診断が付くまでXIII因子の投与を見送ることができるような軽い出血傾向の場合以外は、治療としてXIII因子を投与し、回収率を測定することで、初めてインヒビターを疑うことになる場合が多いように思います。 従って、 ・抗体根絶治療(免疫抑制療法):必ず診断直後から開始する。 ・診断後は、できるだけFXIII/13濃縮製剤の投与を避ける (FXIII/13は遺伝的多型性に富むので、boost reactionの可能性を否定できない) とする方が良いと思います。 boost reactionがあるのかどうかは、インヒビター力価の定量が適切に行われ無い限り判定できないと思われまます。
21	●			●		●				●	
22	●			●		●				●	当初出血していた部位とは異なる部位での再発性出血もあり、TAE、手術など複数の要因も ありますので、(2)に関しては認識が難しいです。Dynamic CTでは造影剤漏れが確認できても、経皮的動脈造影術目的での血管造影時にはすでに止血されており、造影剤の血管外漏れをみとめないこともあり、(2)に関してはF13製剤の効果ありともなしとも認識しがたい です。
23		●	●			●				●	免疫抑制療法を併用しないでF13濃縮製剤1200単位を投与したらF13活性が低下した
24	●			●		●				●	
25	●			●		●				●	
26											未実施
27	●			●		●				●	
28		●		●		●				●	FXIII濃縮製剤投与開始後、FXIII活性の上昇は全く認められず、出血症状も改善がなかった。 他院に転院してステロイドパルス療法およびrituximab投与が行われてから、出血症状は改善が認められた。 その後FXIII製剤投与は中止されたが、FXIII活性、抗原量に変化は認められず。 PSL投与を継続し、OyAを追加しておよそ2ヶ月後からFXIII抗原量の増加がみられた。
29	●			●		●				●	

18 7 6 18 1 24 0 25 0 25

FXIII/13 濃縮製剤投与による凝固検査上の「逆」効果について

2014.02.03 現在

	1) FXIII/13濃縮製剤投与による「F13活性・抗原量」に関する効果が「認められたこと(改善)」がある。		2) FXIII/13濃縮製剤投与による「F13活性・抗原量」に関する効果が「認められなかったこと(不変)」がある。		3) 以前は、FXIII/13濃縮製剤投与による「F13活性・抗原量」に関する効果が認められたが、「その後認められなくなったこと(消失)」がある。		4) FXIII/13濃縮製剤投与後、「F13活性・抗原量」に関する検査データが「逆に悪化」したことがある。		5) FXIII/13濃縮製剤投与「中止」後、「F13活性・抗原量」に関する検査データが「逆に改善」したことがある。		2)、3)、4)、5)のどれかに「有り」と回答された方は、その状況を具体的に記述して下さい。
	あり	なし	あり	なし	あり	なし	あり	なし	あり	なし	
1	●		●		●		●		●		第XIII因子製剤投与後の活性上昇が予測より低値であった。
2	●			●		●		●			
3	●			●		●		●			
4											当院の患者には投与したことがないのではありません。
5		●	●			●		●		●	2) 免疫抑制療法(副腎皮質ステロイドホルモン、シクロスポリン、サイクロフォスファミド)無効。F13Cの回復は認めず。抗原量は補充増加。 4) 悪化はないが、不変状態
6	●		●			●		●		●	抗XIII因子自己抗体症例に対し、出血症状出現時にXIII因子補充を行ったが、XIII因子活性の上昇は認めなかった。
7											当院症例は、濃縮製剤投与により、インヒビター存在下で投与後の活性/抗原上昇が充分ではない条件下でも臨床上の止血効果は認めました。 boost reactionを確認するような臨床上の濃縮製剤不応やインヒビター力価の著明な上昇というものは認めませんでした。 ただ、濃縮製剤投与中になかなか免疫抑制療法の効果が表れなかったのが、たまたもとのインヒビターが「高力価だったためか、抗原暴露によりインヒビター力価が増えたためか、は判断し兼ねます。
8	●			●				●		●	
9	●			●				●		●	
10	●			●				●		●	
11	●			●				●		●	
12	●			●				●		●	
13	●			●				●		●	
14	●		●			●		●		●	boost reactionに関しては13因子インヒビター獲得患者の経験がありません。そういった症例に今後補充療法を行うか否か自分としてはやはり免疫抑制剤等の治療をまず行い、改善の乏しい場合や改善してきている際に使用を検討するという形で行うことを検討しております。 13因子製剤投与で出血症状が明らかに改善したのは全身性エリテマトーデス患者の腹腔内出血と再発性多発軟骨炎患者の大脳筋出血の2例です。 また、全身性エリテマトーデス患者が脳出血をきたしたため改善目的に投与したことがあります。13因子製剤が状態改善に役立ったか判断困難ですが、脳出血は改善しました。 肺出血患者2症例に13因子製剤を投与しました。 1例は前述の再発性多発軟骨炎患者で貴学にインヒビター測定をお願いしましたが陰性でした。肺炎からの肺出血で状態が重篤でした。DICに近い状態で血栓症のriskも高く13因子製剤の投与量はフィボリンP15ml/日としていたように記憶しています。肺出血の明らかな改善はなかったように思われました。急性冠症候群を合併しましたが、状態も重篤であったため全身状態不良による循環不全が原因の可能性が高いと思われ、13因子製剤の影響があったか否かの判断は困難でした。 もう1例は全身性エリテマトーデス患者の薬剤性?間質性肺炎からの肺出血でこちらも1例目同様重篤でした。同様の治療で同様の経過でした。 肺出血と13因子欠乏症の関係はこちらでも調べてみようと思っております。 他シェーグレン症候群に13因子欠乏症をきたした患者さんの妊娠時に婦人科の先生が13因子製剤を投与して無事出産したという症例がありました。
15											未使用
16											製剤投与歴がありません
17											投与していません
18											投与はしていません
19	●			●		●		●		●	
20		●		●		●		●		●	FXIII濃縮製剤投与開始後、FXIII活性の上昇は全く認められず、出血症状も改善がなかった。 他院に転院してステロイドパルス療法およびrituximab投与が行われてから、出血症状は改善が認められた。 その後FXIII製剤投与は中止されたが、FXIII活性、抗原量に変化は認められず。 PSL投与を継続し、CyAを追加しておよそ2ヶ月後からFXIII抗原量の増加がみられた。
21	●			●		●		●		●	特に当院の患者さんでは、逆効果や効果の減弱という印象はこれまでありません。
22											FXIII低下症例の経験はありません
23		●	●			●		●		●	
24	●		●			●		●		●	1) 値の改善を認めたことがあります。免疫抑制療法である程度反応した場合濃縮製剤で活性の上昇を認めました。 2) 一方変わらなかったこともあります。一方発症時はほとんど濃縮製剤でほとんど反応しませんでした。 3) 後で効かなくなったことはないです。免疫抑制療法に反応したのか、途中で活性の上昇がよくなったことがあります。 4) 悪化したことはないです。 5) 中止した後すぐに悪化したわけではありませんが、予防的投与を中止した後免疫抑制療法が効いたのか製剤への反応がよくなりました。 ただ個人的な意見なのですが濃縮製剤使用により抗体の作成が誘発される可能性もあるのかもしれないと思っています。 当院症例では活性が当初予防的な意味もあり濃縮製剤を予防的投与していましたが、途中で予防的投与を上記の懸念から中止しました。 免疫抑制療法をどんどん強めていたのでそちらのファクターが強いと思われるが、予防的投与をやめた後の負荷試験のため濃縮製剤への反応は良好でした。 予防的濃縮製剤投与終了後も明らかな出血イベントはありませんでした。
25		●		●		●		●		●	
26		●	●			●		●		●	13因子活性の変化がなかった 2010/03/09-8% (投与前), 2010/03/25-16% (投与前), 2010/05/01-9% (投与後)

14 5 7 12 1 16 0 19 1 18

Ⅲ. 分担研究報告

分担研究報告書

分担課題：後天性血友（出血）病XIII/13症例における抗FXIII抗体の同定

研究分担者 惣宇利 正善 山形大学医学部分子病態学

研究要旨

- ・ 本年度は、新たに 8 症例で抗凝固 XIII 因子 (FXIII) 自己抗体を同定した。7 例は Aa 型、1 例は Ab 型の抗 FXIII 自己抗体であった。
- ・ Aa 型抗 FXIII A サブユニット (FXIII-A) 自己抗体（以後、活性に関わる記述ではインヒビターと称する）は、活性化反応を阻害する、FXIII 異種四量体が激減するという所見などを根拠として判定した。
- ・ Ab 型インヒビターは、活性化中間体もしくは完全に活性化した FXIII-A に結合して活性を阻害するという所見を根拠として判定した。
- ・ Aa 型抗 FXIII A サブユニット (FXIII-A) 自己抗体の総量を測定する ELISA 法を改良し、症例間の比較を行った。
- ・ これまでの自己免疫性血友（出血）病 XIII/13 全症例の抗 FXIII 自己抗体について、IgG のサブクラスを同定した。
- ・ α_2 -プラスミンインヒビターの架橋部位を含むペプチドを融合したルシフェラーゼを用いて、FXIIIインヒビターを鋭敏に検出する新たなFXIII活性測定法を開発した。

A. 研究目的

凝固第XIII因子 (FXIII) は、フィブリン分子間およびフィブリンと α_2 プラスミンインヒビター (α_2 PI) やフィブロネクチンの間に架橋結合を形成して、止血の維持と創傷治癒の促進に働く血漿トランスグルタミナーゼであり、酵素部位である2つのAサブユニット (FXIII-A) とそのキャリアである2つのBサブユニット (FXIII-B) から成る異種四量体として、血中に存在する。自己免疫性血友（出血）病XIII/13 (AHXIII/13) は、FXIIIに対する自己抗体の産生によるFXIIIの質的・量的低下が原因で重篤な出血傾向を示す後天性FXIII欠乏症である。これまでの我々の研究で、抗FXIII自己抗体は、それぞれの反応様式の違いから、FXIII-Aに結合して異種四量体形成とトロンビンによる活性化ペプチドの切断を阻害するAa型、活性化したFXIII-Aの触媒作用を阻害するAb型、FXIII-Bと結合してFXIII異種四量体のクリアランスを促進するB型、の3タイプに分類されることを確認している。

FXIIIの活性測定には主にアンモニア放出測定法とアミン取り込み法が用いられているが、いずれの方法とも必ずしも抗FXIII自己抗体による活性阻害（活性に関わる記述ではインヒビターとする）を検出できるとは限らない。また、症例毎の抗FXIII自己抗体量（総抗FXIII抗体量やBethesda assay様インヒビター力価）を的確に測定する方法も一部で実施されているものの一般化されておらず、FXIII補充投与量の決定や治療経過のモニタリングに支障を来しているのが現状である。

そこで、本年度は、AHXIII/13疑いのある症

例の確定診断と抗FXIII自己抗体のタイプ決定を引き続き行なうとともに、総抗FXIII自己抗体量およびインヒビター力価を鋭敏に測定するための方法を検討した。

B. 研究方法

[症例検体の実験的精密検査]

血漿中の FXIII-A、-B、および異種四量体抗原量は、抗 FXIII-A 抗体および抗 FXIII-B 抗体を用いた ELISA により定量した。FXIII の活性は、モノダシルカダベリンおよび N,N-ジメチルカゼインを基質としたアミン取込み法にて測定した。抗 FXIII 自己抗体は、組換え FXIII-A (rFXIII-A) および組換え FXIII-B (rFXIII-B) を用いて、ドットプロット法により検出した。フィブリン架橋反応は、血漿に塩化カルシウムおよびトロンビンを添加して生じたフィブリン塊を SDS-PAGE 解析して調べた。

[総抗 FXIII 自己抗体量の定量]

rFXIII-A、rFXIII-B、あるいはトロンビンで事前に活性化した rFXIII-A を患者血漿に加えて 2 時間インキュベートし、FXIII に結合した IgG を、抗ヒト FXIII-A(-B)モノクローナル抗体結合マイクロプレートおよび酵素標識抗ヒト IgG 抗体を用いた ELISA により定量した。

[α_2 PI 融合ルシフェラーゼを用いた FXIII 活性測定] α_2 PI N 末端の分泌シグナルおよび架橋結合部位 (Gln-14) を含む塩基配列を 5' 末端に結合した Metridia ルシフェラーゼ (α_2 PI^N-MetLuc) cDNA を作成した。 α_2 PI^N-MetLuc cDNA を挿入した哺乳動物細胞発現ベクターを baby hamster kidney 細胞に導入し、産生した α_2 PI^N-MetLuc を

塩化カルシウム、トロンビンとともに血漿と反応後、生じたフィブリン塊に取り込まれたルシフェラーゼ活性を測定した。

(倫理面への配慮)

患者検体は各主治医がインフォームドコンセントを得た上で提供を受けている。すべての研究は山形大学医学部倫理委員会、遺伝子組換え実験委員会の承認を得て行なった。

C. 研究結果

1) 新規AHXIII/13症例での抗体検出とタイプング

本年度、23例の後天性FXIII欠乏症疑い症例を実験的に精密検査し、ドットプロット解析により抗FXIII Ig陽性のAHXIII/13症例8例(症例26-33)を新たに確定診断した。8例いずれにもFXIII-Aと反応するIgが検出された。症例29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29の抗FXIII自己抗体は、活性化ペプチドの切断を阻害しないこと、活性化FXIIIのアミン取り込み活性を阻害することから、Ab型インヒビターと判定された。ただし、これまでに同定されている2症例のAb型抗体陽性の血漿ではいずれもフィブリン γ 鎖間の架橋反応が正常に完了していたのに対して、症例29では一部の γ 鎖間のみ架橋され不完全なまま反応の進行が停止していた。

2) 総抗FXIII-A自己抗体量の測定

これまで、抗FXIII-A自己抗体量検査では、rFXIII-Aを固相化したマイクロプレートを用いてfreeの抗体量を測定していた。しかし、Aa型抗FXIII自己抗体は、血漿中では少なくとも一部がFXIII-Aと結合して抗原抗体複合体として存在しているために、プレート上のrFXIII-Aには結合しないことなどから、他の検出方法と比べて低感度であった。そこで、あらかじめ一定量のrFXIII-Aを血漿に添加して反応させた後に、抗ヒトFXIII-Aモノクローナル抗体を固相化したマイクロプレートにFXIII-Aを回収し、同時に回収された自己抗体を、酵素標識抗ヒトIgG抗体を用いて定量した。いずれのAa型症例血漿においても、抗FXIII自己抗体が検出された。

症例1の抗体量を基準値(1.00 arbitrary unit [AU])とした場合、Aa型26例の平均値は1.52、最大値2.95(症例17)、最小値0.36(症例31)であった。複数の症例について、本法を用いて治療後の経過追跡を行ったところ、少なくとも2例においては抗FXIII-A自己抗体が検出感度以下に減少するのに伴ってFXIII異種四量体が増加することが確認され、抗体の根絶/消失が示唆された。

3) Ab型抗FXIII-A自己抗体の交差性

上記ELISA法において、Ab型抗FXIII-A自己抗体は、1例(症例8)に弱い検出(0.30)を認

めたものの、残る2例(症例15、29)は検出感度以下であった。Ab型インヒビターが活性化FXIIIの活性を阻害することから、あらかじめトロンビンで活性化ペプチドを切断したrFXIII-A(rFXIII-A')との交差性を調べたところ、症例8と15の抗FXIII-A自己抗体について、カルシウムイオン存在下での結合の明確な増加(症例8、約3倍;症例15、約5倍)が確認された。一方、症例29の自己抗体は、rFXIII-Aと比較してrFXIII-A'に対する反応性は微増に過ぎなかったが、トロンビン処理した異種四量体(rA'₂B₂およびカルシウムを加えたrA*₂B₂)に対して約2.4倍の結合を示した。なお、Ab型抗FXIII自己抗体の交差性が活性化ペプチドの切断に依存したのとは対照的に、Aa型自己抗体はいずれも活性化ペプチドの切断により反応性が低下した。

4) 抗FXIII自己抗体のサブクラス

上述のELISA法を応用して、各症例の抗FXIII自己抗体のサブクラスを調べた。Aa型について、IgG1が24例、IgG3が18例、IgG4が21例に認められた。Ab型では、症例8はIgG1、症例15および29はIgG4であった。一方、B型2例はいずれもIgG2であった。

5) α_2 PI^N-MetLucを用いたFXIII活性測定法の検討

FXIII活性測定法について、これまでの我々の研究から、アンモニア放出測定法はAa型抗FXIII自己抗体を鋭敏に検出するのに対してAb型を見逃す危険性が高いこと、逆にアミン取り込み法はAb型の検出に有利であるのに対して必ずしもAa型を検出できるとは限らないことを指摘している。AHXIII/13において α_2 PIのフィブリンへの取り込みが著しく低下していることに着目し、架橋部位(Gln-14)を含む α_2 PI N末端とルシフェラーゼとの融合タンパク質(α_2 PI^N-MetLuc)を用いた活性測定法を検討した。FXIII欠乏血漿で段階的に希釈した正常血漿において、FXIII量に依存したフィブリンへのルシフェラーゼ活性の取り込みが確認された。5段階希釈試験において、Aa型、Ab型ともにルシフェラーゼ活性取り込みの明瞭な阻害が観測された。本法を用いて各症例のBethesda assay様インヒビター検査を行ったところ、症例毎のインヒビター力価の違いが明確に示された。

D. 考察

本年度の研究で改良したELISAによるAa型抗FXIII-A自己抗体測定法は、rFXIII-A固相化量の制限や、血漿中の内在のFXIII-Aとの競合といった要因による検出感度の低下を克服し、抗FXIII-A自己抗体総量の高感度な定量を実現した。実際、ELISAでの検出が困難であった症例の抗FXIII-A自己抗体も容易に検出できるようになり、また、治療後にドットプロット陰性となった血漿検体においても、微量の自己抗体の残存が検出されている。一方で、本法で自己抗体が検出感度以下となった時期からFXIII異種四量体の出現が確認されている。このように、治療経過のモニタリングにおける本法の有用性がうかがえ、Ab型やB型の検出を含めた更なる

検討を行う予定である。

Ab型抗FXIII自己抗体については、活性化ペプチドの切断は阻害せず、活性化したFXIIIの酵素活性を阻害することから、活性型のFXIII-Aに結合することが予想されていた。今回の研究から、Ab型症例8および15の自己抗体は、活性化ペプチドの切断に加えてカルシウムイオンの存在がFXIII-Aとの結合に必要であること、すなわち、FXIII-Aが完全な活性型 (FXIII-A*) になることで初めて交差性を発揮することが確認された。一方で、本年度新たに同定されたAb型症例29の自己抗体は、FXIII-A*ではなく活性化中間体であるA₂B₂ (およびA₂B₂) に結合することが判明した。血友病における抗FVIII抗体にIgG3がほとんど報告されていないのに対して、多くのAa型症例の抗FXIII自己抗体にIgG3が含まれているのは興味深い。また、B型はいずれもIgG2のみであり、これらのサブクラスの違いは、抗体産生 (の開始、促進、維持など) の機序が異なるためである可能性がある。

我々は、Aa型抗FXIII自己抗体を持つ症例では血漿中の異種四量体が激減していることを明らかにしており、FXIII濃縮製剤 (異種四量体) 投与・添加直後から結合型抗FXIII-A抗体が増加しFXIII-Aに対して飽和状態となることから、自己抗体はまず異種四量体のFXIII-Aに結合し、徐々にFXIII-Bを解離させることが強く示唆される。このように遊離型Aa型抗FXIII自己抗体の存在は、濃縮製剤補充効果の持続性を著しく減じるものであり、Aa型症例の治療において、免疫抑制薬のみならず濃縮製剤の過剰投与、定期的なFXIII/13活性のモニタリングが欠かせないことを示している。

現在市販されているFXIII活性検査キットは主にアンモニア放出測定法に基づくものであるが、Ab型の検出が困難であることを、これまでの我々の研究結果が示している。本研究で新たに開発したFXIII活性測定法は、Aa型、Ab型とも鋭敏に活性阻害を検出できるものであり、有用であると考えられる。

B型抗FXIII自己抗体は活性阻害を示さないため、現時点で有効な検出方法はドットプロットやWestern blottingである。現在B型用イムノクロマト法も開発中であるが (尾崎班員の分担研究報告書を参照)、Aa型、Ab型を含めAHXIII/13の診断には、FXIII-A、FXIII-Bそれぞれの抗原量、異種四量体量、活性の測定が欠かせない。しかしながら、FXIII-Bと異種四量体の測定は特定の研究施設でのみ行われており、市販の測定試薬がないのが現状である。今後、これらの試薬の開発・市販化に向けた働きかけも必要であると思われる。

E. 結論

・Ab型抗FXIII自己抗体が活性型FXIIIあるいは活性化中間体に強く交差反応を示すことを新たに見いだした。

・Aa型、Ab型FXIII抗FXIII自己抗体の検出および定量に有用なFXIII活性測定法、総抗FXIII自己抗体測定法を開発した。今後はAHXIII/13の診断

と治療経過のモニタリングに向けた改良を行い、活用していく予定である。

G. 研究発表

1. 論文発表

- (1) **Souri M**, Biswas A, Misawa M, Omura H, Ichinose A. Severe congenital factor XIII deficiency caused by novel W187X and G273V mutations in the F13A gene; diagnosis and classification according to the ISTH/SSC guidelines. *Haemophilia*. in press
- (2) Kasahara K, Kaneda M, Miki T, Iida K, Sekino-Suzuki N, Kawashima I, Suzuki H, Shimonaka M, Arai M, Ohno-Iwashita Y, Kojima S, Abe M, Kobayashi T, Okazaki T, **Souri M**, Ichinose A, Yamamoto N. Clot retraction is mediated by factor XIII-dependent fibrin- α IIB β 3-myosin axis in platelet sphingomyelin-rich membrane rafts. *Blood*. 122:3340-3348. 2013.
- (3) Kawano H, Yamamoto D, Uchihashi Y, Wakahashi K, Kawano Y, Sada A, Minagawa K, Katayama Y, Kohmura E, **Souri M**, Ichinose A. Severe inhibitor-negative acquired factor XIII/13 deficiency with aggressive subdural haemorrhage. *Blood Coagul Fibrinolysis* 24:638-641. 2013.
- (4) Wada H, **Souri M**, Matsumoto R, Sugihara T, Ichinose A. Alloantibodies against the B subunit of plasma factor XIII developed in its congenital deficiency. *Thromb Haemost*. 109:661-668. 2013.
- (5) 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*. 19:415-419. 2013.

2. 学会発表

惣宇利正善, 尾崎司, 一瀬白帝. 非酵素部位である凝固第XIII因子Bサブユニットのフィブリン架橋反応における役割. 日本生化学会東北支部会 5月 仙台

惣宇利正善, 尾崎司, 一瀬白帝. フィブリン架橋反応における抗XIII因子自己抗体の阻害作用機序. 第35回日本血栓止血学会学術集会 5月 山形

Souri M, Osaki T, Ichinose A. Defect of heterotetramer assembly by anti-factor XIII autoantibodies results in marked delay of crosslinking of fibrin. 第24回国際血栓止血学会 7月 オランダ・アムステルダム

H. 知的財産権の出願・登録状況

特記事項なし

平成 25 年度 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）
分担研究報告書

分担課題：後天性血友病 13 疑い症例の迅速自己抗体検査（イムノクロマト法）の実地試用

研究分担者 尾崎 司 山形大学医学部 助教

研究要旨

凝固第 XIII 因子(FXIII)は酵素部位の A サブユニット(FXIII-A)とそのキャリアーである B サブユニット(FXIII-B)からなる。FXIII の自己抗体(多くはインヒビター)が原因で出血症状を示す後天性/自己免疫性血友病 XIII(AHXIII/13)は自己抗体が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 Aa 型、Ab 型、B 型の 3 群に分類される。本研究では、Aa 型を迅速に診断することが可能なイムノクロマト法の開発に成功し、実地試用を行った。その結果、AHXIII/13 の Aa 型では診断した 8 例すべてで陽性反応を示した(感度 100%)。一方、自己抗体を持たない症例では正常血漿(17 例)も含め、34 例中偽陽性は 2 例(特異度 94%)であった。従来法であるドットプロットと比較したところ、 κ 係数は 0.71 で一致度は十分高いといえる。一方、Ab 型では 3 例中 1 例、B 型では 2 例中 1 例が陽性反応を示したに止まった。Ab 型については活性化 FXIII-A を予め症例血漿と混合した後、イムノクロマト法を行うことで著しく感度が改善され、3 例すべて陽性反応を示した。

A. 研究目的

後天性/自己免疫性血友病XIII(AHXIII/13)は凝固第XIII因子(FXIII)に対する自己抗体(インヒビターであることが多い)が原因で出血症状を示す。現在AHXIII/13の確定診断はELISAやドットプロット法で行われているが、これらの方法は煩雑で時間もかかるので、限られた医療機関でしか実施されていない。多くの医療機関でAHXIII/13の診断を可能にするためには、簡便で時間がかからない検出方法の開発が急務である。本分担研究では、AHXIII/13を迅速診断するイムノクロマト法の実地試用を目的とした。

B. 研究方法

1. イムノクロマト法(直接法)

検体を希釈バッファーで 10 倍希釈後、抗 FXIII-A マウスモノクローナル抗体(mAb)を固定化したストリップに展開した。洗浄バッファーで 3 回洗浄後、抗ヒト IgG 抗体固定化金コロイドと反応させた。検体中に自己抗体(抗 FXIII-A 抗体)が存在する場合は、テストライン上の抗 FXIII-A mAb と FXIII-A、自己抗体が複合体を形成し、自己抗体に抗ヒト IgG 抗体固定化金コロイドが結合することでテストラインが赤褐色に呈色する。一方、自己抗体が存在しない場合は複合体が形成されず、呈色しない。テストラインの呈色の強度はデンシトメトリー分析装置(FactScan)で測定した。

2. イムノクロマト法(混合法)

AHXIII/13 症例では血漿中の FXIII-A 量が極めて低下している場合がある。このような検体では自己抗体が存在しても FXIII-A が少ないためテストライン上に抗 FXIII-A mAb—FXIII-A—自己抗体抗ヒト IgG 抗体固定化金コロイドの複合体が形成されず、呈色しない。このような症例で自己抗体を検出するために検体と健常人血漿を 1:1 で混合し、37°C で 2 時間反応させた後、イムノクロマト法を行った。

AHXIII/13 は自己抗体が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 Aa 型、Ab 型、B 型の 3 群に分類される。Ab 型の自己抗体は、活性化 FXIII-A を認識する。したがって、Ab 型の症例に関しては健常人血漿の代わりに活性化 FXIII-A を入れて 37°C で 2 時間反応させた後、イムノクロマト法を行った。

3. カットオフ値の設定

FXIII-A に対する自己抗体をもつ AHXIII/13 (Aa 型) 1 症例の血漿と健常人血漿を 1:1 で混合したものを陽性コントロールとしてそのテストラインの強度を 1.0 としておのおののバンドの強度を算出した。正常血漿 17 例の強度を測定し、平均 +2SD をカットオフ値として設定した。

(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. カットオフ値の設定

正常血漿17例の吸光強度を測定したところ、平均0.09、SDは0.05であった。したがって、カットオフ値は $0.09+0.05 \times 2=0.19$ と設定した。このカットオフ値では正常血漿17例はいずれも陰性であった。

2. AHXIII/13 疑い症例の迅速診断

混合法を用いて25例のAHXIII/13疑い症例の迅速診断を行った。その結果、10例で陽性反応を示した。精査したところ、2例は偽陽性で自己抗体を含まない出血性後天性FXIII欠乏症(HAF13D)であった。陽性反応を示した残り8例はAHXIII/13のAa型であったが、AHXIII/13のAb型1例は陰性を示した。

3. 直接法と混合法の比較

AHXIII/13のAa型8例を混合法(うち7例は直接法でも測定)で測定し、HAF13D 17例、Ab型3例、B型2例については直接法と混合法両方で測定を行った。HAF13Dに関しては17例中、直接法で1例、混合法で2例陽性反応を示した。

AHXIII/13のAa型については混合法では8例すべて陽性反応を示したが、直接法では5例陽性、2例陰性反応を示した。Ab型、B型は混合法でそれぞれ1例ずつ陽性反応を示したが、直接法ではすべて陰性反応を示した。

AHXIII/13のAb型3例については各症例の血漿と活性化FXIII-Aを混合し、イムノクロマト法を実施した。その結果、3例いずれも陽性反応を示した。

D. 考察

混合法を用いて迅速診断を行った結果、Aa型8例は陽性を示したが、Ab型1例は陰性を示した。Aa型はFXIII-Aに対する自己抗体をもっているのに対してAb型は活性化FXIII-Aに対する自己抗体をもっている。したがって、Aa型では各々の自己抗体が血漿中のFXIII-Aに対して反応し、陽性反応を示したのに対して、Ab型では自己抗体はFXIII-Aに反応せずに陰性反応を示したと考えられる。

直接法で陰性を示したAa型2例はいずれもFXIII-Aが検出限界以下(<0.02 U/mL)であったことから、FXIII-Aが極めて少ない場合はAa型であっても偽陰性を示す可能性が高い。これを避けるには健常人血漿と1:1で混合する混合法を用いる必要があることが判明した。

健常人血漿17例すべておよび、HAF13D 17例中15例は陰性を示したが、2例は陽性を示した。1例は混合法のみ陽性、もう1例は直接法、混合法ともに陽性を示しており、精査が必要である。

E. 結論

AHXIII/13のAa型を迅速診断するイムノクロマト法の開発に成功した。このイムノクロマト法を用いて新たに8例のAa型症例を同定した。従来のドットプロット法と比較したところ、 κ 係数は0.71で一致度は十分高いといえる。また、Ab型の診断についても活性化FXIII-Aと混合することで感度を改善できることが判明した。残るB型の診断のためのイムノクロマト法は、現在、企業と共同で開発中である。

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

(1) 国内学会

1. 尾崎 司, 惣宇利 正善, 曲 泰男, 一瀬 白帝: 抗第XIII因子抗体のエピトープ探索法の開発と症例の分子病態解析への応用. 第35回日本血栓止血学会学術集会, 山形; 2013年6月1日

2. 尾崎 司, 惣宇利 正善, 杉山 大輔, 曲 泰男, 一瀬 白帝: Epitope analysis of anti-factor XIII autoantibodies to characterize molecular bases for the acquired hemorrhophilia XIII/13. 第86回日本生化学会大会, 横浜; 2013年9月11日

(2) 研究会

1. 尾崎 司, 惣宇利 正善, 杉山 大輔, 曲 泰男, 一瀬 白帝: 自己免疫性血友病XIIIにおける抗血漿TGase(凝固第XIII因子)抗体の生化学的解析. 第5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, 東京; 2013年9月10日

H. 知的財産権の出願・登録状況

特記事項なし

平成 25 年度 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）
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 (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、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。本年度の対象症例において、前年度に引き続き IgG 型を主とする抗 VWF 抗体が検出され、免疫学的機序による発症であることが証明された。一方免疫学的異常以外の症例は少数であったが存在し、本疾患の多様性が示唆されたが、対象症例中、免疫学的異常を呈したものは最も多く本疾患の病因の主体であることが想定された。

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、1h 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 家兎血清(Dako)または抗ヒト IgM、IgA (本年度追加) ヤギ血清(Sigma)で 1h 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

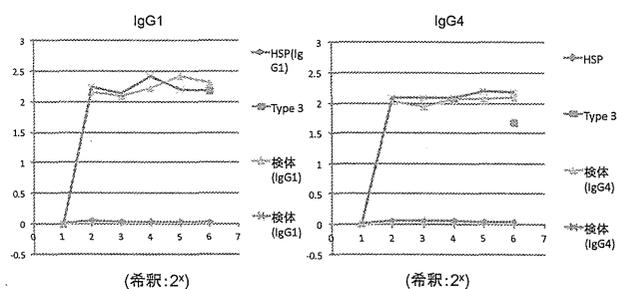
解析結果

	Pt-3	Pt-4	Pt-5	Pt-6
年齢	76	70	40	72
性別	F	M	M	M
基礎疾患	I TP	PV、デ パゲン	なし	Macroglobulinemia

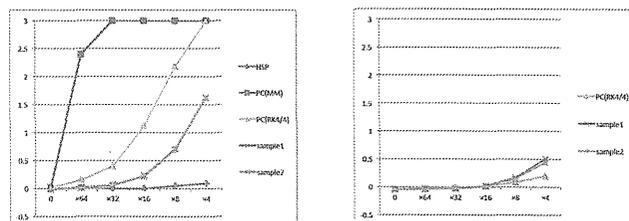
			内服		
主な臨床 症状		消 化 管 出 血	広範な 皮下出 血	APTT 延長	鼻出血, IgM 6590, κ
APTT	sec	ND	51.4	42.2	78.4
APTT 対照	sec	ND	ND	34.1	ND
FV111:C	(%)	22	54.4	54	6
VWF:Rco	(%)	<6	7	37	<6
VWF:Ag	(%)	282	53	72	9

今年度 4 症例に対して免疫学的機序によるものの有無を考慮し、抗 VWF 抗体の検出を行った。免疫学的機序による発症であることが示唆された。

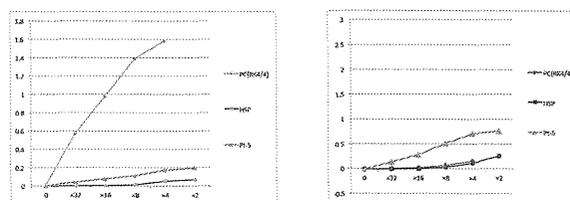
Pt-3



PT-4



PT-5



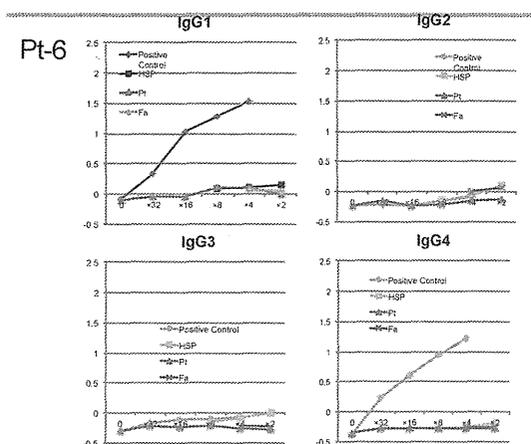
PT-6

すべての IG に対して検討したが抗 VWF 抗体は検出されなかった(次項)。

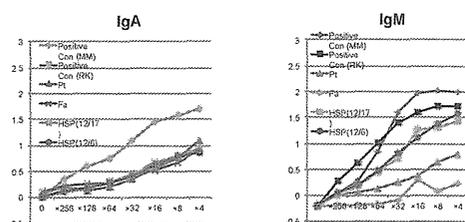
D. 考察

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が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抗体価の定量のみではAvWSの重症度を予測することは困難ではないかと示唆された。



Pt-6



E. 結論

今年度集積されたAvWS2例を解析し、免疫学敵意所を明らかにした。

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.

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. Suzuki N, Kunishima S, Ikejiri M, Maruyama S, Sone M, Takagi A, Ikawa M, Okabe M, Kojima T, Saito H, Naoe T, **Matsushita T**. Establishment of mouse model of MYH9 disorders: heterozygous R702C mutation provokes macrothrombocytopenia with leukocyte inclusion bodies, renal glomerulosclerosis and hearing disability. PLoS One 2013; 8: e71187.

2. Shirahata A, Fukutake K, Takamatsu J, Shima M, Hanabusa H, Mugishima H, Amano K, Takedani H, Tamashima S, **Matsushita T**, Tawa A, Tanaka I, **Higasa S**, Kosaka Y, Fujii T, Sakai M, Migita M, Kawakami K, Ohashi Y, Saito H. A Phase II clinical trial of a mixture of plasma-derived factor VIIa and factor X (MC710) in haemophilia patients with inhibitors: haemostatic efficacy, safety and pharmacokinetics/pharmacodynamics. Haemophilia 2013; 19: 853-60.

3. Murata M, Takagi A, Suzuki A, Okuyama E, Takagi Y, Ando Y, Kato I, Nakamura Y, Murate T, **Matsushita T**, Saito H, Kojima T. Development of a new laboratory test to evaluate antithrombin resistance in plasma. Thromb Res 2013.

4. Mimuro J, Takahashi H, Kitajima I, Tsuji H, Eguchi Y, **Matsushita T**, Kuroda T, Sakata Y. Impact of recombinant soluble thrombomodulin (thrombomodulin alfa) on disseminated intravascular coagulation. Thromb Res 2013; 131: 436-43.

5. Fukuda T, Kamisato C, Honda Y, **Matsushita T**, Kojima T, Furugohri T, Morishima Y, Shibano T. Impact of antithrombin deficiency on efficacy of edoxaban and antithrombin-dependent anticoagulants, fondaparinux, enoxaparin, and heparin. Thromb Res 2013; 131: 540-6.

6. 松下正. 【血液病と中枢神経病変】 血栓性血小板減少性紫斑病と中枢神経病変. 血液フロンティア. 2013;23:1249-1252

7. 松下正. 凝固障害に対する補充療法 標準的治療法の整理. 日本輸血細胞治療学会誌. 2013;59:571-578

8. 松下正, 鈴木伸明. 凝固線溶系 JAK2 変異と血栓症. Annual Review 血液. 2013;2013:209-213

H. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

平成 25 年度 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）
分担研究報告書

分担課題:「グローバル線溶能検査法の開発」に関する研究

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」を担当した。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が目的である。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した。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。トロンビンあるいはトロンビンと tissue factor を含んだ専用採血管、及びアプロチニンを含んだコントロール用採血管を積水メディカル株式会社の協力で作成した。同専用採血管を用いて健常者より採血し、2 時間 incubate 後の D-dimer を測定したところ、euglobulin clot 溶解時間と負の相関、血中プラスミノゲン量と正の相関を認め、線溶因子およびフィブリン安定化因子の関連した「出血性後天性凝固異常症」のスクリーニングに有用であると考えられた。現在、他の線溶系マーカーとの関連をさらに調べるとともに、原因不明の出血患者、および外傷性の異常出血患者の線溶異常の評価が可能か、検討中である。

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した。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 量を測定する方法を用いた。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した。臨床現場での検査の簡便性、並びに精度の向上のため、専用の採血管を作成した。

（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、患者検体で検討した。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した。

C. 研究結果

(1) グローバル線溶能検査法の確立

上記「グローバル線溶能検査法」の基礎的データを集積した。集積したデータを基に、トロンビンあるいはトロンビンと tissue factor

を含んだ専用採血管、及びアプロチニンを含んだコントロール用採血管を積水メディカル株式会社の協力で作成した。同専用採血管を用いて健常者より採血し、2時間 incubate 後のD-dimer を測定したところ、概ね基礎データと同様の結果が得られた。健常者では、euglobulin clot 溶解時間と負の相関、血中プラスミノゲン量と正の相関を認めた。

(2) 異常出血症例の解析

plasminogen activator inhibitor type 1 (PAI-1) 活性の低下している異常出血症例を解析した。後天性では無く、新規の先天性 PAI-1 欠損症であった。その他に2例の異常出血例の相談があり、1例はフィブリノーゲン異常が疑われたが遺伝子解析の結果異常は見いだされなかった。他の1例は骨髄異形成症候群(MDS)の症例の筋肉内出血で後天性 FXIII 欠損症が疑われたが、FXIII 活性が70%程度あり、確定診断にはいたらなかった。

D. 考察

本研究において確立したグローバル線溶能検査は、健常人において euglobulin clot 溶解時間と負の相関、血中プラスミノゲン量と正の相関を認めたことから、線溶因子の関連した「出血性後天性凝固異常症」のスクリーニングに有用であると考えられた。今後、PAI-1 欠損症を始めとする、先天性及び後天性線溶阻害因子異常症におけるデータを集積し、その有用性を検証したい。同時に、他の線溶系マーカとの関連をさらに調べるとともに、原因不明の出血患者、および外傷性の異常出血患者の線溶異常の評価が可能か、検討したい。

E. 結論

本研究において確立したグローバル線溶能検査は、線溶因子の関連した「出血性後天性凝固異常症」のスクリーニングに有用であると考えられた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

直接関連する論文はなし

2. 学会発表

- Nagahashi K, Iwaki T, Takano K, Ozaki

Y, Kanayama N, Umemura K, Urano T. Is the phenotype manifested by complete PAI-1 deficiency in human compatible to that in mouse? XIV International Workshop Molecular and Cellular Biology of Plasminogen Activation South Bend (USA) 2013. June. 4-8

- Sano H, Otsu M, Iwaki T, Nagahashi K, Suzuki Y, Kanayama N, Urano T. Generation of inducible pluripotent stem(iPS) cells from plasminogen activator inhibitor-1 deficient patient XIV International Workshop Molecular and Cellular Biology of Plasminogen Activation South Bend (USA) 2013. June. 4-8

H. 知的財産権の出願・登録状況

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 25 年度 第 1 回班会議プログラム

日時： 平成 25 年 6 月 16 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	
10:00～12:00	24 年度の報告概要（まとめ） 24 年度の中間評価と対応 25 年度の実施計画（全体）	一瀬 白帝
(12:00～13:00)	昼食	
13:00～13:40	25 年度の実施計画（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）	
13:40～14:40*	症例検討会 ・小林 宣彦 先生（群馬大学医学部） ・井原 章裕 先生（福山リハビリテーション病院） ・金城 恒道 先生（JA 長野厚生連 北信総合病院） ・島田 恒幸 先生（埼玉医科大学） ・窓岩 清治 先生（自治医科大学） ・金子 誠 先生（東京大学医学部附属病院）	
14:40～15:00	全体討論 その他	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 25 年度 第 2 回班会議 プログラム

日時： 平成 26 年 1 月 26 日(日) 10:00～15:00

場所： キャンパス・イノベーションセンター リエゾン 501
(東京都港区芝浦 3-3-6)

09:50～10:00	受付	
10:00～11:20 (80分)	25年度の研究成果とまとめ 自己評価 班研究終了後の展望（全体） その他	一瀬 白帝
11:20～12:00 (40分, 1人10分)	25年度の研究進捗状況と班研究終了後の展望 （研究分担者） ・尾崎 司 先生（山形大学医学部） ・惣宇利 正善 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	
13:00～13:50 (50分, 1人10分)	症例検討会（主治医） ・渡邊 健 先生（東京医科歯科大学） ・平瀬 伸尚 先生（九州大学病院別府病院） ・佐藤 謙伍 先生（北海道・砂川市立病院） ・小島 稔 先生（東海大学医学部） ・木村 悟 先生（福島・太田西ノ内病院）	
13:50～14:00	症例総合討論	
14:00～15:00	全体討論 その他	一瀬 白帝