

- ・血栓研究会, 仙台; 2012年9月8日
- 17. 惣宇利正善, 一瀬白帝: 日本人後天性血友病XIII(13) 19症例におけるFXIIIインヒビターの生化学的特徴. 第50回東北止血・血栓研究会, 仙台; 2012年9月8日
- 18. 一瀬白帝: 高齢化社会で増加しつつある後天性血友病XIII/13の分子病態、診断と治療. 第16回岡山血液セミナー 特別講演, 岡山; 2012年10月6日
- 19. 一瀬白帝: 出血性後天性第XIII/13因子欠乏症と自己免疫性血友病XIII/13の診断と治療. 第17回近畿血栓症研究会 特別講演, 大阪; 2012年10月27日
- 20. 惣宇利正善, 尾崎 司, 一瀬白帝: 細胞核における凝固第XIII因子のトランスグルタミナーゼ活性. 第20回山形分子生物学セミナー, 鶴岡; 2012年11月26日
- 21. 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
- 22. 一瀬白帝: 自己免疫性血友病XIII/13の検査のアルゴリズムと診断の指針(試案). 第7回日本血栓止血学会学術標準化委員会シンポジウムScientific Standardization Committee Symposium 2013, 東京; 2013年1月12日

**G. 研究発表(協力者・主治医)平成25年度
窓岩 清治**

1. Madoiwa S, Kitajima I, Ohmori T, Sakata Y, Mimuro J. Distinct reactivity of the commercially available monoclonal antibodies of D-dimer and plasma FDP testing to the molecular variants of fibrin degradation products. *Thromb Res.* 2013 Oct;132(4):457-64.
2. 窓岩清治, 小山寛介, 坂田飛鳥, 大森司, 三室 淳, 坂田洋一: 第40回日本集中治療医学会学術集会医師部門シンポジウム, 松本, 2013年2月28日

小川 孔幸

1. 小林宣彦, 柳澤邦雄, 林 俊誠, 内海英貴, 小川孔幸, 野島美久, 松下 正, 一瀬白帝: A case of Acquired von Willebrand syndrome (AvWS) which was also positive for lupus anticoagulant. 第75回日本血液学会学術集会, ロイトン札幌(札幌), 2013年10月12日

矢富 裕

1. 鈴木明子, 金子 誠, 菅野信子, 矢富 裕: 合成基質法とトロンビン生成試験による各種ヘパリン類の抗Xa活性の評価. *臨床病理* 2013;61(7):567-75.
2. 金子 誠, 菅野信子, 奥山恵理子, 矢富 裕: ヘパリン類の濃度測定時の注意点(テストチームヘパリンSキットの検討から). 第60回日本臨床検査医学会学術集会, 神

戸, 2013年10月31日-11月3日

3. 小野佳一, 金子 誠, 久米幸夫, 野々部亮子, 川口直子, 大濱侑季, 菅野信子, 横田浩充, 家子正裕, 矢富 裕: 重症肝障害により凝固異常(APTT延長)の判断に苦慮した1症例. 日本検査血液学会 第14回学術集会, 東京, 2013年07月27-28日
4. 金子 誠, 菅野信子, 鈴木明子, 松本智子, 嶋 緑倫, 矢富 裕: 血友病A症例への遺伝子組換え型血液凝固第VIII因子製剤補充後に検査試薬の差異により第VIII因子活性に大きな差が生じた一例. 第61回日本輸血・細胞治療学会総会, 横浜, 2013年05月16-18日

花房 規男

1. Hanafusa, N., Noiri, E., and Nangaku, M., Differences in Reduction of Coagulation factor XIII (F13) Between Immunoabsorption Plasmapheresis and Double Filtration Plasmapheresis. *Ther Apher Dial*, 2013 Apr;17(2):241-2.
2. Norio Hanafusa, Yoshifumi Hamasaki, Hiroo Kawarasaki, et al. Choice of Apheresis Modality for Antibody Removal in ABO-blood Type Incompatible Living Related Renal Transplantation. *Transfus Apher Sci.* 2013 Oct;49(2):254-8.
3. 花房規男, 野入英世, 市村理, 山本裕子, 渡邊恭通, 南学正臣. 二重濾過血漿交換療法における血漿処理量と除去率との関連, 第34回日本アフェレンシス学会学術大会, 長野, 2013年11月
4. Norio Hanafusa, Eisei Noiri, Osamu Ichimura, et al. Relation between Processed Plasma Volume and Actual Clearance during Double Filtration Plasmapheresis. The 31st Annual Meeting of the International Society of Blood Purification, Bologna, Italy, 2013年9月.
5. 花房規男, 野入英世, 南学正臣. 二重濾過血漿分離交換法は凝固因子第13因子を低下させる. 第35回日本血栓止血学会学術集会, 山形, 2013年6月.
6. 花房規男, 野入英世, 南学正臣. ABO血液型不適合生体腎移植の術前アフェレンシス治療: FXIII 値からみた治療法の選択. 第35回日本血栓止血学会学術集会, 山形, 2013年6月.

小川 大輔

1. 小川大輔, 惣宇利正善, 一瀬白帝, 宮崎泰司: 大腿筋肉内出血にて発症した自己免疫性後天性血友病XIII(後天性凝固第13因子欠乏症)の症例. 第35回日本血栓止血学会, 山形国際ホテル(山形), 2013年5月31日

島田 恒幸

1. 島田恒幸, 中村裕一, 猪野裕英, 別所正美, 惣宇利正善, 一瀬白帝: 重症中腎筋出血で発症した後天性血友病XIII/13. 第75回日本血液学会学術集会、札幌, 平成25年10月12日

浅尾 優

1. 浅尾 優, 矢野寛樹, 渡部真志, 上用祐士, 湯上小百合, 浅井光広, 牧 隆太郎, 佐々木謙成, 三島信彦, 惣宇利正善, 一瀬白帝: 後天性血友病13の一例. 第35回日本血栓止血学会学術集会 P-048, 山形国際ホテル (山形) ; 2013年6月1日

井原 章裕

1. 井原章裕, 植木和則, 鈴木伸明, 松下 正, 一瀬白帝. 血小板減少症に合併した、抗VWF抗体による76歳女性後天性 von Willebrand Syndromeの一例. 第75回日本血液学会, 札幌, 平成25年10月12日

中島 裕貴

1. 中島裕貴: 後天性第13因子欠乏症による高齢者膝関節血症の1例. 第5回日本関節鏡・膝・スポーツ整形外科学会(JOSKAS), 札幌, 2013年6月
2. 荒川和也: 膝関節手術に硬膜外鎮痛を施行したが、後に第13因子欠乏症と判った教訓的症例. 第60回日本麻酔科学会学術集会, 札幌, 2013年5月

G. 研究発表 (協力者・主治医) 平成24年度 家子正裕

1. 論文発表

1. 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.* 2012; 96: 781-5.
2. 斉藤誠, 若狭健太郎, 盛暁生, 入江達朗, 田中雅則, 森岡正信, 家子正裕. 高齢者後天性血友病 A 3 例の臨床的検討. *臨床血液.* 2012; 53: 240~5.

2. 学会発表

1. 内藤澄悦, 家子正裕, 他. 凝固時間法による凝固第XIII因子活性測定の試み. 第46回日本臨床検査医学会北海道支部総会, シンポジウム「凝固検査学の進歩」. 札幌. 2012年9月22日.

矢富 裕

1. 論文発表

1. Kanno N, Kaneko M, Suzuki A, Yatomiyama Y. Evaluation of Factor XIII Activity Using Berichrom FXIII Chromogenic Assay on the Fully-Automated Coagulation Analyzer CS-2000i - Based on Comparisons with Universal Biochemical Analyzer and Antigen Method -. *Sysmex Journal Interna-*

tional, 2013年2月25日(web)

2. 菅野信子, 金子 誠, 田邊久美子, 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Berichrom FXIII®を用いた血液凝固第XIII因子活性測定条件の検討. *臨床病理* 60(12) 1131-38, 2012.

2. 学会発表

1. 和田英夫, 松野一彦, 川杉和夫, 金子 誠, 遠見真理, 阪田敏幸, 田中秀明, 矢富 裕, 尾崎由基男, 村田 満, 登 勉. 抗Xa活性のモニター法の開発と標準化. 第52回日本臨床化学会年次学術集会, 盛岡, 2012年9月6日
2. 田中亮子, 金子 誠, 小野佳一, 久米幸夫, 菅野信子, 内野康志, 小池和彦, 横田浩充, 矢富 裕. 光学的検出法で測定不可能であった凝固検体の一例. 第13回日本検査血液学会学術集会, 高槻, 2012年7月29日

花房規男

1. 論文発表

1. Hanafusa, N., Noiri, E., and Nangaku, M., Differences in Reduction of Coagulation factor XIII (F13) Between Immunoabsorption Plasmapheresis and Double Filtration Plasmapheresis. *Ther Apher Dial*, 2013. in press.
2. 花房規男, 野入英世, 中尾彰秀, 他. アフェレシスと希少疾患 血液型不適合妊娠(p型)とアフェレシス日本アフェレシス学会雑誌31(2) 164-166, 2012.

2. 学会発表

1. Hanafusa N, Hamasaki Y, Kawarasaki H, et al. The choice of modality for antibody removal in ABO-blood type incompatible living donor renal transplantation. The 14th Congress of the World Apheresis Association, Istanbul, Turkey, 2012年9月.
2. 花房規男, 野入英世, 南学正臣. 新たな二重濾過血漿分離交換法の試み (第1報) 第33回日本アフェレシス学会学術大会, 長崎, 2012年11月
3. 花房規男, 南学正臣. 高効率免疫吸着療法. 第33回日本アフェレシス学会学術大会, 長崎, 2012年11月
4. 花房規男. アフェレシスにおける凝固因子第13因子 (井上學術奨励賞受賞記念講演). 第33回日本アフェレシス学会学術大会, 長崎, 2012年11月
5. 第57回日本透析医学会学術集会・総会: ワークショップ 各種血液浄化療法の効率と予後を考える, PE, DFPP, 吸着, 2012, 札幌.
6. 第19回神奈川腎不全セミナー. 腎専門医が診るアフェレシス療法~最新の流れ~. 2012. 横浜.

朝倉英策

1. 論文発表

1. Hayashi T, Kadohira Y, Morishita E, Asakura H, Souri M, Ichinose A. A case of acquired FXIII deficiency with severe bleeding symptoms. Haemophilia. 2012 Jul;18(4):618-20.

岡村 孝

1. 論文発表

1. Kanaji T, Ware J, Okamura T, Newman PJ. GPIb α regulates platelet size by controlling the subcellular localization of filamin. Blood 119: 2906-2913, 2012
2. Nakamura T, Oku E, Nomura K, Morishige S, Takata Y, Seki R, Imamura R, Osaki K, Hashiguchi M, Yakushiji K, Mouri F, Mizuno S, Yoshimoto K, Ohshima K, Nagafuji K, Okamura T. Unrelated cord blood transplantation for patients with adult T-cell leukemia/lymphoma: experience at a single institute. Int J Hematol 96: 657-663, 2012
3. Hatada T, Wada H, Kawasugi K, Okamoto K, Uchiyama T, Kushimoto S, Seki Y, Okamura T, Imai H, Kaneko T, Nobori T, and Japanese Society of Thrombosis Hemostasis/DIC subcommittee. Analysis of the cutoff values in fibrin-related markers for the Diagnosis of overt DIC. Clinical and Applied Thrombosis /Hemostasis 18: 495-500, 2012
4. Takata Y, Kanaji T, Moroi M, Seki R, Sano M, Nakasato S, Sueoka E, Imamura Y, Okamura T. Platelets with a W127X mutation in GPIIX express sufficient residual amounts of GPIb α to support adhesion to von Willebrand factor and collagen. Int J Hematol 96: 733-742, 2012.
5. 天本貴広、江頭弘一、川野洋之、東谷孝徳、石丸 健、佐藤進一郎、奥英二郎、今村理恵、中島 収、岡村 孝、佐川公矯. 混合型自己免疫性溶血性貧血をとともなうEvans症候群の1症例. 日本輸血・細胞治療学会誌 58: 539-546, 2012
6. Imamura R, Mouri F, Nomura K, Nakamura T, Oku E, Morishige S, Takata Y, Seki R, Osaki K, Hashiguchi M, Yoshimoto K, Ohshima K, Nagafuji K, Okamura T. Successful treatment of small cell variant anaplastic large cell lymphoma with allogeneic peripheral blood stem cell transplantation, and review of the literature. Int J Hematol 2012
7. 長藤宏司、山田研太郎、岡村 孝. 糖尿病に合併する感染症 造血幹細胞移植. 糖尿病 2012; 4: 117-126
8. 岡村 孝. 標本に学ぶ血液疾患症例「骨髓線維症」. 血液フロンティア創刊

神谷悦功

1. 学会発表

1. 朴智栄、神谷悦功、他：スニチニブ内服開始4日後に肺出血、腫瘍崩壊に伴う重篤な有害事象を来した1例 分子標的薬開始時に潜在する危険性について、第10回日本臨床腫瘍学会学術集会 大阪、2012年7月26日
2. 神谷悦功、他：初発から長い経過をとった自己抗体による出血性後天性第XIII因子 (F13) 欠乏症 (自己免疫性血友病13)、第74回日本血液学会学術集会 京都、2012年10月20日
3. 神谷悦功、他：超高齢化社会におけるがん診療のあり方を提言する 病院完結型医療から地域完結型医療へ 第2報、第66回国立病院総合医学会 神戸、2012年11月17日

和田秀穂

1. 学会発表

1. Matsumoto R, Wada H, Sugihara T, Souri M, Ichinose A. Bleeding phenotype of factor XIII B deficiency aggravated by thrombocytopenia and alloantibodies. 第74回日本血液学会学術集会 (ポスター発表). 京都、2012年10月20日

川野宏樹

1. 学会発表

1. 川野宏樹. Inhibitor-negative severe acquired factor XIII/13 deficiency with aggressive subdural hemorrhage. 第74回日本血液学会学術集会 (ポスター発表), 京都, 2012年10月20日

沼田透効

1. 学会発表

1. 沼田透効. 後出血を繰り返し、後天性血友病13が疑われた鼻背の基底細胞上皮腫の1例. 第76回日本皮膚科学会東部支部学術大会, 札幌, 2012年9月

E. 知的所有権の出願・取得状況

(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

山形大学に以下の発明届を提出した。(2013年11月)

- (1) 血液凝固第XIII因子(FXIII)を標的分子とした新止血・抗血栓薬
- (2) 凝固第XIII因子 (FXIII) の生理的基質を模倣した発光酵素タンパク質融合基質

保医発0913第1号
平成25年9月13日

(別添)

地方厚生(支)局医療課長
都道府県民生主管部(局)
国民健康保険主管課(部)長
都道府県後期高齢者医療主管部(局)
後期高齢者医療主管課(部)長 } 殿

厚生労働省保険局医療課長
(公印省略)

公知申請に係る事前評価が終了し、薬事法に基づく承認事項の
一部変更承認がなされた医薬品の保険上の取扱いについて

適応外使用に係る公知申請についての事前評価が行われた結果、公知申請を行っても
差し支えないとの結論が得られた別添の医薬品については、結論が得られた日から当該
品目について追加が予定された効能・効果及び用法・用量を保険適用としたところです
(平成25年2月7日付け保医発0207第1号、平成25年4月25日付け保医発0425第1号及
び平成25年5月28日付け保医発0528第1号厚生労働省保険局医療課長通知「公知申請に
係る事前評価が終了した医薬品の保険上の取扱いについて」)。

本日、別添の品目において薬事法(昭和35年法律第145号)第14条第9項の規定に基
づき、追加が予定された効能・効果及び用法・用量の一部変更承認がなされたため、課
長通知によらず保険適用が可能となったことから、平成25年2月7日付け保医発0207第
1号、平成25年4月25日付け保医発0425第1号及び平成25年5月28日付け保医発0528第
1号厚生労働省保険局医療課長通知は廃止することとするので、貴管下の保険医療機関、
審査支払機関等に対して周知徹底をお願いします。

なお、今後の使用に当たっては、新しい添付文書を御参照ください。

1. 平成25年2月7日付け保医発0207第1号「公知申請に係る事前評価が終了した医薬
品の保険上の取扱いについて」
一般名：プレドニゾロン
販売名：プレドニン錠5mg
会社名：塩野義製薬株式会社
2. 平成25年4月25日付け保医発0425第1号「公知申請に係る事前評価が終了した医薬
品の保険上の取扱いについて」
一般名：ヒト血漿由来乾燥血液凝固第XIII因子
販売名：フィプロガミンP静注用
会社名：CSLベーリング株式会社
3. 平成25年5月28日付け保医発0528第1号「公知申請に係る事前評価が終了した医薬
品の保険上の取扱いについて」
一般名：ヨード化ケン油脂肪酸エチルエステル
販売名：リピオドール480注10mL
会社名：ゲルベ・ジャパン株式会社

研究課題： 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 課題番号：H24-難治等(難)一般-052
 研究代表者： 山形大学 氏名 一瀬 白希

1. 診断基準、重症度分類、診療ガイドラインの策定・改訂の状況（臨床調査研究分野、研究奨励分野の研究課題のみ）

対象疾患名	診断基準					重症度分類					診療ガイドライン				
	策定・改訂		学会の承認			策定・改訂		学会の承認			策定・改訂		学会の承認		
	達成状況	完了年月日	達成状況	完了年月日	学会名	達成状況	完了年月日	達成状況	完了年月日	学会名	達成状況	完了年月日	達成状況	完了年月日	学会名
後天性(自己免疫性)血友(出血)病 XIII/13	改訂中(国際版)	平成26年1月14日	承認手続中(提出済み)	平成26年1月14日	国際血拴止血学会	改訂中(国際版)	平成26年1月14日	承認手続中(提出済み)	平成26年1月14日	国際血拴止血学会	策定中	平成26年1月14日	未承認(国際版)	平成26年1月14日	国際血拴止血学会
	策定中(日本語版)	平成26年1月14日	承認手続中(協議中)	平成26年1月14日	日本血拴止血学会	策定中(日本語版)	平成26年1月14日	承認手続中(協議中)	平成26年1月14日	日本血拴止血学会	策定中	平成26年1月14日	未承認(日本語版)	平成26年1月14日	日本血拴止血学会
後天性von Willebrand 症候群	策定完了	平成26年1月10日	未承認	平成26年1月10日	日本血拴止血学会	未策定	平成26年1月10日	未承認	平成26年1月10日	日本血拴止血学会	策定中	平成26年1月10日	未承認	平成26年1月10日	日本血拴止血学会

2. 各種ガイドライン（診断基準、重症度分類、診療ガイドライン以外）の策定状況

ガイドラインの名称	達成状況	策定年月日	ガイドラインの普及活動
日本語版出血評価票 (JBAT)	策定完了	平成25年11月8日	平成26年2月12日国際第XIII/13因子シンポジウム（オーストリア、ウィーン）、平成26年6月24日国際血拴止血学会/科学及び標準化委員会（米国ミルウォーキー）、平成26年5月29日～5月31日日本血拴止血学会（大阪）で、試行結果を発表する予定
検査・診断アルゴリズム	策定完了	平成26年1月14日	平成26年2月12日国際第XIII/13因子シンポジウム（オーストリア、ウィーン）、平成26年6月24日国際血拴止血学会/科学及び標準化委員会（米国ミルウォーキー）、平成26年5月29日～5月31日日本血拴止血学会（大阪）で、試行結果を発表する予定

3. 研究開発の基盤整備の状況

対象疾患名	症例登録システム			生体試料収集・管理システム			ウェブページ	
	達成状況	完了年月日	登録症例数 (平成25年 末現在)	達成状況	完了年月日	収集検体数 (平成25年 末現在)	達成状況	完了年月日
出血性後天性凝固異常症	構築完了	平成25年12月 26日	117	構築完了	平成25年12月 26日	117	開設完了	平成25年7月9 日

4. 研究成果の普及、活用に係る活動

活動の名称	実施年月日	実施場所等	対象者	参加者数	活動の概要
国際第XIII/13因子シンポジウム主催・発表	平成26年2月12日	ウィーン国際会議場	研究者／臨床医	150人	後天性(自己免疫性)血友(出血)病XIII/13の診断、治療の最新の動向について発表する予定。
国際血栓止血学会／科学及び標準化委員会発表	平成25年6月29日	アムステルダム国際会議場	研究者／臨床医	150人	後天性(自己免疫性)血友(出血)病XIII/13の診断、治療の最新の動向について発表した。
厚労省「医療上の必要性の高い未承認薬・適応外薬検討会議」への資料提供	平成25年4月25日	厚労省「医療上の必要性の高い未承認薬・適応外薬検討会議」			後天性(自己免疫性)血友(出血)病XIII/13の患者の実態調査の結果が審議会で活用され、第XIII/13因子濃縮製剤が保険適用された。

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

- ・ この2年間にわたり、本研究室での実験的精密検査により新たに13症例で抗凝固 XIII 因子（FXIII）自己抗体を同定した。12例はAa型、1例はAb型の抗FXIII自己抗体（活性に関わる記述ではインヒビターとする）であった。
- ・ Aa型抗FXIII Aサブユニット（FXIII-A）自己抗体は、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、活性化ペプチドの切断を阻害することなく酵素活性自体を阻害するという所見を根拠として判定した。
- ・ Aa型、Ab型いずれのインヒビターを有する血漿においても、 α_2 -プラスミンインヒビターのフィブリンへの取込みが著しく阻害されていることを基に、 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。
- ・ また、Aa型抗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。

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（AH13）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。

活性化したFXIIIは、まず迅速にフィブリン γ 鎖2分子間を架橋し、引き続いて多分子の α 鎖間を架橋する。Aa型インヒビター症例では γ 鎖間、 α 鎖間いずれの架橋反応とも著しく遅延するのに対して、Ab型インヒビター症例では γ 鎖間は正常に架橋されるにもかかわらず、重篤な止血異常を示す。

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FXIIIインヒビター

による活性阻害を検出できるとは限らない。また、症例毎抗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。

平成24-25年度の本研究では、①AH13の確実な診断と治療経過のモニタリングに向けて、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。②また、Aa型とAb型抗FXIII-A自己抗体のフィブリン架橋反応に対する影響を、症例の検体を用いて検討した。

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、-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51アミノ酸残基をコードする塩基配列を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

この2年間で37例の後天性FXIII欠乏症疑い症例を実験的に精密検査し、Aa型12例、Ab型1例を新たに確定診断した。当研究室で精査・確定診断したAH13症例は合計で33例となった。

2) 自己抗体のフィブリンと α_2 PI間の架橋反応に対する影響

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2例(症例8、15)では正常血漿と同様、2分以内に完了した。Ab型の症例29では、2分以内に一部の γ 鎖のみが架橋した後、反応の進行を認めなかった。抗フィブリノゲン抗体および抗 α_2 PI抗体を用いてウエスタンブロット解析したところ、Aa型、Ab型ともに、 α 鎖の多量体化と α_2 PIのフィブリンへの取込みが検出されなかった。

3) α_2 PI^N-MetLucを用いたFXIII活性測定法の検討

AH13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。

4) 総抗FXIII-A自己抗体量の測定

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。これまでに同定された26例いずれのAa型症例血漿においても、良好な抗FXIII自己抗体の検出を認めた。症例1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/消失を示唆する所見である。

5) Ab型抗FXIII-A自己抗体の交差性

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rFXIII-A'(rFXIII-A*)への結合の増加(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であった一方、トロンビン処理した異種四量体(rA₂B₂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。

6) 自己抗体のフィブリン架橋反応に対する影響

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り込まれる。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。

7) 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。

D. 考察

我々の研究室では33例のAH13症例を解析しており、その大半(27例)の抗FXIII自己抗体が四量体形成と活性化ペプチド切断を阻害する

Aa型インヒビターである。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はない。Aa型の抗体は活性化反応を阻害するので、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推察される。

Ab型症例8および15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示唆される。

Aa型抗FXIII自己抗体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、抗FXIII自己抗体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、臨床経過の少なくとも一時期には大量の遊離型抗体が存在するが、免疫抑制療法により抗体産生が減少してFXIII-A産生と平衡し、更に抗体産生が停止すると次第に抗原抗体複合体も減少するものと考えられる。ただし、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ることもあり、治療方法を改良する必要がある（総括を参照）。

本研究では、Aa型抗FXIII自己抗体を持つ症例では異種四量体が激減していることが確認され、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（「参照ガイド」の各論1を参照）。

本研究で改良した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、治療後にドットブ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。

現在市販されているFXIII活性検査キットは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で示している。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。しかしながら、現時点では、改善すべき以下の問題点がある。

- ・ フィブリン塊の回収が容易ではない
- ・ 液相ではなく沈殿の状態でルシフェラーゼ基質と反応させるため、測定毎の値のばらつきが大きい
- ・ ルシフェラーゼ基質が高価である
- ・ 化学発光測定装置が必要である

ルシフェラーゼではなくアルカリフォスファターゼなどの発色反応に変えるなど、今後、一般化に向けた改善を行う予定である。

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ブロットや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、FXIII-A、FXIII-Bそれぞれの抗原量、異種四量体量、活性の測定が診断には欠かせない。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。今後の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。

Ab型インヒビターについて、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A'₂B₂（およびA*₂B₂）に結合することが示された。症例29の血漿での不完全な γ 鎖間の架橋は、フィブリン形成とともに生じたA'₂B₂（A*₂B₂）に速やかに自己抗体が結合し、架橋反応の進行を停止させるためであると考えられる。

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。
- ・ Aa型抗FXIII自己抗体を持つAHXIII/13症例では血漿中のFXIII異種四量体が激減していること、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インヒビターの検出および定量に有用なFXIII活性測定法、抗FXIII自己抗体測定法を開発した。今後はAH13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.
- (6) 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.
- (7) 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.
- (8) 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.
- (9) **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.

(10) 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.

(11) 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.

(12) 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

- (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 第34回に本血栓止血学会学術集会 2012年6月 東京
- (2) 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 2012年12月 福岡
- (3) 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 2012年9月 仙台
- (4) 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 2013年5月 仙台
- (5) 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 2013年5月 山形
- (6) 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 2013年7月 オランダ・アムステルダム

平成 24～25 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）の開発と実地試用

研究分担者 尾崎 司 山形大学医学部 助教

研究要旨

後天性/自己免疫性血友病 XIII(AH13)は、凝固第 XIII 因子(FXIII)の酵素部位である A サブユニット(FXIII-A)あるいはキャリアーである B サブユニット(FXIII-B)に対する自己抗体(多くはインヒビター)が原因で出血症状を示す。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。本分担研究では、企業との共同で AH13 を迅速かつ簡便に診断可能なイムノクロマト法の開発を行った。FXIII-A に対するマウスモノクローナル抗体(mAb)3 種と FXIII-B に対する mAb7 種を作製した。3 種の抗 FXIII-A mAb はいずれも組み換え FXIII-A(rFXIII-A)との親和性が高く、その内 1 種を選定してイムノクロマト法の開発を行った。その結果、AH13 Aa 型の迅速診断が可能となり、実地試用で特異度と感度を調べた。健常人 17 例と AH13 疑い症例 26 例で検査を行ったところ、AH13 Aa 型症例は 8 例中 8 例が陽性反応を示した(感度 100%)。一方、自己抗体を持たない症例では健常人 17 例も含め、34 例中偽陽性は 2 例(特異度 94%)で、AH13 Ab 型は陰性反応を示した。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、作製した 7 種の抗 FXIII-B mAb もいずれも rFXIII-B と親和性が高く、その内 1 種を選定して B 型の迅速診断が可能なイムノクロマト法の開発を行う予定である。

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(多くはインヒビター)が原因で出血症状を示す。現在 AH13 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、臨床現場で AH13 の診断を可能にするためには、迅速かつ簡便な自己抗体の検出方法の開発が急務である。本分担研究では、認識ドメインを明らかにしたマウスモノクローナル抗体(mAb)を用いてイムノクロマト法を開発し、実地試用を行って感度と特異度を明らかにすることを目的とした。

B. 研究方法

1. 企業と共同で A サブユニット(FXIII-A)に対する mAb 3 種と B サブユニット(FXIII-B)に対する mAb 7 種を作製し、各々の mAb の認識ドメインの推定を行った。

1-1. 抗 FXIII-A mAb の認識ドメインの推定

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。組換え FXIII-A(rFXIII-A)をカルシウム存在下で 37°C、30 分トリプシン消化をおこない、Western blot を行った。3 種の抗 FXIII-A mAb (1TH2-8C4C, 1TH6-2H7F, 1TH6-10E)を検出に用いて、認識部位の推定をおこなった。

1-2. 抗 FXIII-B mAb の認識ドメインの推定

FXIII-Bは10個の寿司ドメインから構成される。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。7種の抗FXIII-B mAb (1-3B、1-3C、3-3D、4-2B、5-6C、5-11B、6-5F)を検出に用いた。

2. 認識ドメインと親和性を明らかにした抗-FXIII-A mAb を用いてイムノクロマト法を開発し、実地試用を行った。

2-1. 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 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。検体中に抗 FXIII-A 自己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分析装置(FactScan)で測定した。

2-2. イムノクロマト法(混合法)

AH13 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。

一方、AH13 の 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。

2-3. カットオフ値の設定

FXIII-A に対する自己抗体をもつ AH13 の 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。健常人血漿 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. 抗 FXIII mAb の認識ドメインの推定

1-1. 抗 FXIII-A mAb の認識ドメインの推定

rFXIII-A をカルシウム存在下で 37°C、30 分トリプシン消化を行うと、活性化ペプチドと β -サンドウィッチ、コアとバレル 1 ドメインの間で切断を受けて活性化ペプチド、 β -サンドウィッチ+コア、バレル 1+2 ドメインの断片が生成す

る。rFXIII-A のトリプシン断片の Western blot 解析の結果、3 種の mAb を用いた場合、いずれもバレル 1+2 を含む断片が反応した。

1-2. 抗 FXIII-B mAb の認識ドメインの推定

Western blot の結果、1-3B は、第 1-4、第 1-5 寿司ドメインを除く rFXIII-B と反応し、1-3C は、第 4-10 寿司ドメインを除く rFXIII-B と反応し、第 4-10 寿司ドメインも微弱ながら反応した。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 が反応した。5-6C は全長および第 2-10 寿司ドメイン、第 4-10 寿司ドメインと反応した。一方、6-5F は全長および第 2-10 寿司ドメイン、第 4-10 寿司ドメイン、第 1-9 寿司ドメインと反応した。

2. イムノクロマト法の開発と実地試用

2-1. カットオフ値の設定

正常血漿 17 例の強度を測定したところ、平均 0.09、SD は 0.05 だった。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。

2-2. AH13 疑い症例の迅速診断

混合法を用いて 25 例の AH13 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 AH13 の Aa 型であったが、AH13 の Ab 型 1 例は陰性を示した。

2-3. 直接法と混合法の比較

AH13 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。AH13 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、AF13D 17 例、AH13 の 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。AF13D 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。AH13 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。

AH13 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

3種の抗FXIII-A mAbはrFXIII-Aのトリプシン消化断片のWestern blotの結果、おもにバレル1あるいは2を認識していると考えられた。この内の1種(1TH2-8C4C)を選定してイムノクロマト法の開発を行った。

混合法を用いて迅速診断を行った結果、Aa型8例はすべて陽性を示したが、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例はいずれも血漿中のFXIII-A抗原量が検出限界以下(<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方が良いことが判明した。

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(特異度94%)。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(この症例はドットプロット法で陰性、ELISAで陽性)を示しており、精査が必要である。

一方、7種の抗FXIII-B mAbは第5寿司ドメインを3種(3-3D、4-2B、5-11B)、第6寿司ドメイン(1-3B)、第9寿司ドメイン(6-5F)、第10寿司ドメイン(5-6C)を1種ずつ認識しており、1-3Cは第3寿司ドメインあるいは第5寿司ドメインを認識していると考えられた。この中から1種選定してB型の迅速診断が可能なイムノクロマト法の開発を行う予定である。

E. 結論

親和性の高い抗FXIII-A mAbを用いてAH13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AH13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。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親和性の高い抗FXIII-B mAbを用いて現在、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 hemorrhaphilia 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, 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

4. 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

(予定を含む。)

特記事項なし

平成 24～25 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 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。24-25 年度の対象症例において、5/6 例に 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 1 例であったが存在し、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)による機能の障害とともに、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、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、IgA (本年度追加) 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)

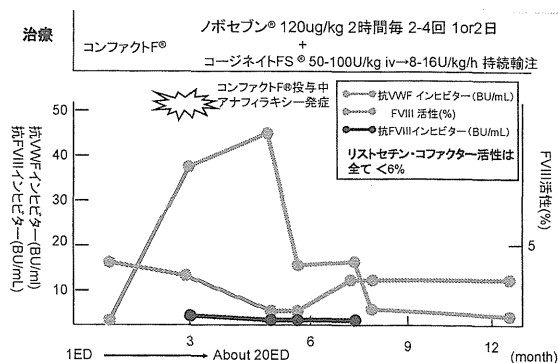
検体はあらかじめ文書による同意を得たあと静脈血より採取したものを参加施設において連結可能匿名化した後測定を行った。なお、各施設における検体採取・送付に関しては当該施設における倫理審査手続きに従って行った。

C. 研究結果

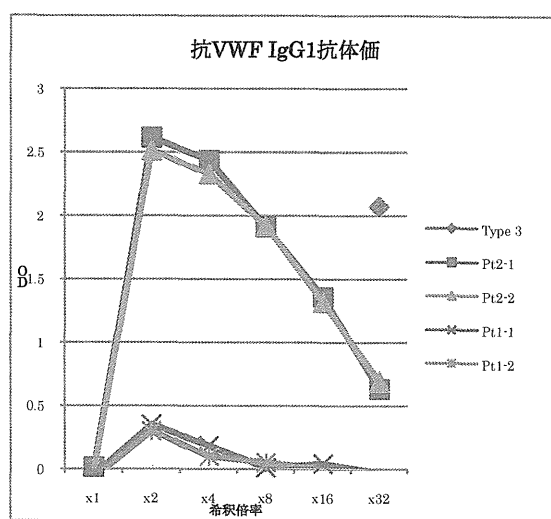
2 解析結果

6 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 (次次項表)。5/6 例が免疫学的機序による発症であることが示唆された。

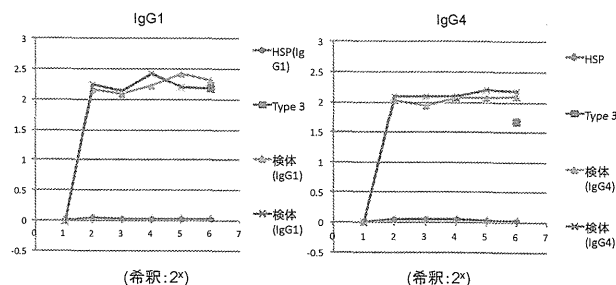
VWD Type 3 with inhibitor



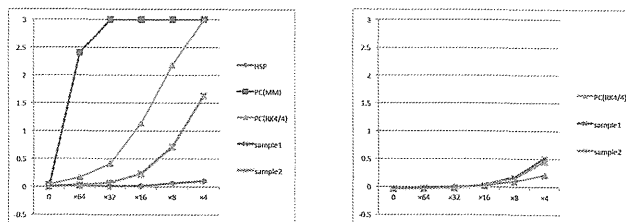
PT-1, 2



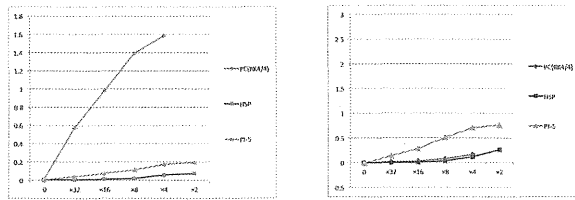
Pt-3



PT-4



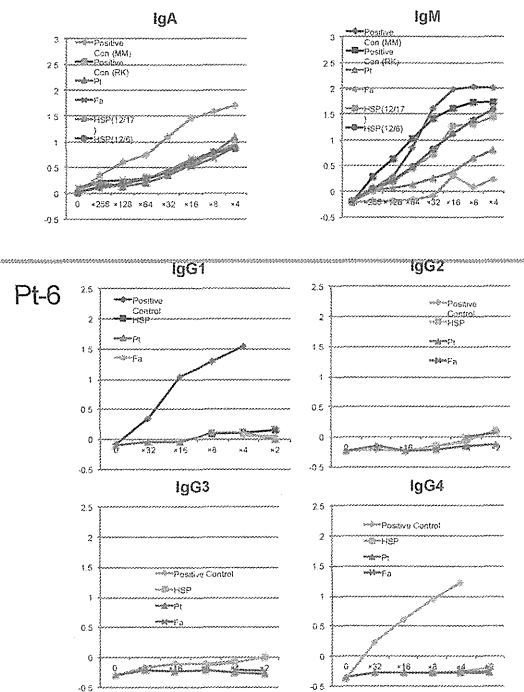
PT-5



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。

Pt-6



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。

E. 結論

2 年間に集積された AvWS6 例を解析し、免疫学的意義を明らかにした。

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 原著論文

- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- Increased von Willebrand Factor to ADAMTS13 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.
- 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.

9. 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

10. Miyawaki Y, Matsushita T (他 13 名 12 番目) Thrombosis from a prothrombin mutation conveying antithrombin resistance. *N Engl J Med*. 2012 Jun 21;366(25):2390-6.

11. Shirahata A, Matsushita T (他 14 名 9 番目) Clinical pharmacological study of a plasma-derived factor VIIa and factor X mixture in haemophilia patients with inhibitors - Phase I trial. *Haemophilia*. 2012 Jan;18(1):94-101.

12. Iwaki T, Matsushita T (他 10 名 7 番目) Life-threatening hemorrhage and prolonged wound healing are remarkable phenotypes manifested by complete plasminogen activator inhibitor-1 deficiency in humans. *J Thromb Haemost*. 2011 Jun;9(6):1200-6.

13. Iwase A, Matsushita T (他 12 名 13 番目) Successful fertility management of a patient with factor V deficiency: planned transfusion of fresh frozen plasma under infertility treatment. *Fertil Steril*. 2011 May;95(6):2124.e5-7.

14. 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

15. 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

16. 松下正. 【術前・術後管理必携】 周術期の一般管理 輸血・自己血輸血. *消化器外科*. 2012;35:570-575

17. 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

2. 学会発表

口演

1. 抗 VWF インヒビター保有 von Willebrand Disease (VWD) Type 3 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,

症例一覧表

		Type 3(インヒビター陽性)	Pt-1	Pt-2	Pt-3	Pt-4	Pt-5	Pt-6
年齢		5	36	42	76	70	40	72
性別		F	F	F	F	M	M	M
基礎疾患		なし	バルプロ酸内服中	不明	ITP	PV、デパゲン内服	なし	Macroglobulinemia
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	消化管出血	広範な皮下出血	APTT延長	鼻出血, IgM 6590, κ
APTT	sec	72.1	48.2	76.3	ND	51.4	42.2	78.4
APTT対照	sec	35	38.2	ND	ND	ND	34.1	ND
FVIII:C	(%)	1.8	20	21.1	22	54.4	54	6
VWF:Rco	(%)	<10	<6	<6	<6	7	37	<6
VWF:Ag	(%)	<5	23	6	282	53	72	9

平成 24～25 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「グローバル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、血中プラスミノー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）基礎データの集積

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。

（2）専用採血管の作成とデータ解析

集積した基礎データを基に、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