

平成26年度血栓塞栓症についての全国アンケート 症例ありの回答のまとめ(1)

2015.3.6現在

No.	①症例のありなし	②症例について性別、年齢、基礎疾患	③D-dimerを測定していた場合の測定年月日	④AT,PC,PSなどいずれかの因子の活性または抗原量測定	⑤ ④の中の重大な異常であった因子の活性値/抗原量	⑥該当する測定項目	⑦血栓・塞栓症状について	⑧血栓症に対する検査、診断、治療について	⑨その他
1	ある	男 59才 基礎疾患(有;大腸癌 多発性肝転移)	2014年10月6日 D-dimer(5.5μg/mL)	測定した		a.2014年10月6日 AT活性(116%)	初発血栓タイプ(a.静脈性) 血栓の部位など(a.深部静脈) 危険因子/誘因(f.悪性腫瘍) 再発イベント;血栓塞栓症のタイプ、部位、危険因子/誘因など → 静脈性(深部静脈)悪性腫瘍	検査(a.超音波エコー、b.CT) 薬剤[a.抗凝固薬(名前 ワーファリン)c.血栓溶解薬(名前 ヘパリン)] 効果・転帰(c.治療中)	
2	ある	男 69才 基礎疾患(無)	2015年1月27日 D-dimer(6.57μg/mL)	測定した	a.測定年月日(2015年1月28日)(PC)因子 活性値(93%) 抗原量(89%) b.測定年月日(2015年1月28日)(PS)因子 活性値(108%) c.測定年月日(2015年1月28日)(AT-III)因子 活性値(96%)	d.2015年1月28日 Fibrinogen量(204mg/dL) e.2015年1月28日 FDP(17.9μg/mL) i.2015年1月28日 抗リン脂質抗体(1.2U/mL未満) 測定項目(抗CLβ ₂ GPI抗体)	初発血栓タイプ(a.静脈性) 血栓の部位など(a.深部静脈、b.肺塞栓) 危険因子/誘因(i.不動/寡動)	検査(a.超音波エコー、b.CT) 薬剤[a.抗凝固薬(名前 リクシアナ)c.血栓溶解薬(名前 ウロキナーゼ)] 効果・転帰(c.治療中)	
3	ある	女 46才 基礎疾患(有;肺塞栓症)	2014年2月6日 D-dimer(5.4μg/mL)	測定した		b.2014年2月6日 PC活性(122%) c.2014年2月6日 PS活性(829%) d.2014年2月6日 Fibrinogen量(250mg/dL) e.2014年2月6日 FDP(7.2μg/mL)	初発血栓タイプ(a.静脈性) 血栓の部位など(b.肺塞栓) 危険因子/誘因(l.糖尿病、o.肥満)	検査(b.CT) 薬剤[c.血栓溶解薬(名前 ヘパリン)] 効果・転帰(c.治療した)	
4	ある	男 15才 基礎疾患(無)	2014年10月21日 D-dimer(1.9μg/mL)	測定した		a.2014年10月23日 AT活性(78%) AT抗原量(75.9%) b.2014年10月23日 PC活性(63%) c.2014年10月23日 PS活性(103%) d.2014年10月21日 Fibrinogen量(273mg/dL) e.2014年10月21日 FDP(4.9μg/mL) h.総ホモシステイン濃度(10.8nmole/mL) i.2014年10月21日 抗リン脂質抗体(8U/mL未満) 測定項目(抗カルジオリピン抗体)	初発血栓タイプ(a.静脈性) 血栓の部位など(i.その他、脳横静脈洞血栓症) 危険因子/誘因(r.その他、喫煙?)	検査(b.CT、c.MRI) 薬剤[a.抗凝固薬(名前 ヘパリン→ワーファリン)] 効果・転帰(c.治療中)	
5	ある	女 39才	2014年12月15日 D-dimer(0.9μg/mL) 測定方法(ラテックス凝集反応)	測定した	a.測定年月日(2014年8月16日)(PC活性)因子 活性値(32.1%) b.測定年月日(2014年8月16日)(AT-III活性)因子 活性値(75.5%)	a.2014年8月16日 AT-III活性(75.5%) b.2014年8月16日 PC活性(32.1%) d.2014年8月16日 Fibrinogen量(192mg/dL) e.2014年8月16日 FDP(166.7μg/mL) i.2014年8月16日 抗リン脂質抗体(0.7U/mL) 測定項目(抗CLβ ₂ GPII抗体)	初発血栓タイプ(b.動脈性) 血栓の部位など(f.脳梗塞) 危険因子/誘因(c.薬剤、r.その他;抗凝固薬の休薬) 再発イベント;血栓塞栓症のタイプ、部位、危険因子/誘因など → 心内血栓	検査(a.超音波エコー) 薬剤[a.抗凝固薬(名前 プラザキサ、ヘパリン)] 処置(d.その他;ヘパリン) 効果・転帰(c.治療中)	
6	ある	女 80才 基礎疾患(有;高血圧)	2014年4月7日 D-dimer(1.02μg/mL)	測定しなかった			初発血栓タイプ(a.静脈性) 血栓の部位など(c.表在性静脈炎 血栓) 再発イベント;血栓塞栓症のタイプ、部位、危険因子/誘因など → 右大伏在静脈	検査(a.超音波エコー) 薬剤[a.抗凝固薬(名前 ワーファリン)] 効果・転帰(c.治療した)	
7	ある	男 58才	2014年3月7日 D-dimer(0.4以下 μg/mL)	測定しなかった			初発血栓タイプ(a.静脈性) 血栓の部位など(a.深部静脈) 再発イベント;血栓塞栓症のタイプ、部位、危険因子/誘因など → 深部静脈血栓症	検査(a.超音波エコー) 薬剤[a.抗凝固薬(名前 ワーファリン)] 効果・転帰(b.因子の値が正常化した)	
8	ある	基礎疾患(有;リウマチ、糖尿病、大腸癌)	2014年9月10日 D-dimer(8.01μg/mL)	測定した		a.2014年9月10日 AT活性(89%) d.2014年9月10日 Fibrinogen量(311mg/dL)	初発血栓タイプ(a.静脈性) 血栓の部位など(a.深部静脈) 危険因子/誘因(a.外傷、f.悪性腫瘍、l.糖尿病) 再発イベント;血栓塞栓症のタイプ、部位、危険因子/誘因など → 深部静脈血栓症、骨折後	検査(a.超音波エコー) 薬剤[a.抗凝固薬(名前 ヘパリン)] 効果・転帰(b.因子の値が正常化した)	

平成26年度血栓塞栓症についての全国アンケート 症例ありの回答のまとめ(2)

2015.3.6現在

No.	①症例の あり/なし	②症例について 性別、年齢、基礎疾患	③D-dimerを測定して いた場合の測定年月 日	④AT,PC,PSな どいずれかの 因子の活性ま たは抗原量測 定	⑤ ④の中の重大な異常の あった因子の活性値/抗原量	⑥該当する測定項目	⑦ 血栓・塞栓症状について	⑧ 血栓症に対する検査、診断、治療について	⑨ その他
9	ある	女 82才 基礎疾患(有;子宮癌)	2014年10月1日 D-dimer(9.16μg/mL)	測定しなかった			初発血栓タイプ(a.静脈性) 血栓の部位など(c.表在性静脈炎) 再発イベント;血栓塞栓症のタイプ、部 位、危険因子/誘因など → ヒラメ筋 静脈	検査(a.超音波エコー) 薬剤[a.抗凝固薬(名前 ワーファリン)] 効果・転帰(b.因子の値が正常化した)	
10	ある	女 73才	2014年1月15日 D-dimer(1.0μg/mL)	測定しなかった			初発血栓タイプ(a.静脈性) 血栓の部位など(a.深部静脈) 危険因子/誘因(g.血栓症の既往) 再発イベント;血栓塞栓症のタイプ、部 位、危険因子/誘因など → 膝窩静脈	検査(a.超音波エコー) 薬剤[a.抗凝固薬(名前 ワーファリン)] 効果・転帰(c.治療中)	
11	ある	女 78才 基礎疾患(有;腎 不全(生体腎移植 後)、悪性〇〇腫)	2014年3月26日 D-dimer(0.73μg/mL)	測定しなかった			初発血栓タイプ(a.静脈性) 血栓の部位など(c.表在性静脈炎) 危険因子/誘因(f.悪性腫瘍) 再発イベント;血栓塞栓症のタイプ、部 位、危険因子/誘因など → ヒラメ筋 静脈中央枝	検査(a.超音波エコー) 薬剤[a.抗凝固薬(名前 ワーファリン)] 効果・転帰(c.治療中)	
12	ある	女 60才 基礎疾患(有;高 血圧、胃ポリープ)	2014年2月5日 D-dimer(0.5以下 μg/mL)	測定しなかった			初発血栓タイプ(a.静脈性) 血栓の部位など(a.深部静脈) 危険因子/誘因(g.血栓症の既往) 再発イベント;血栓塞栓症のタイプ、部 位、危険因子/誘因など → 膝窩静脈	検査(a.超音波エコー) 薬剤[a.抗凝固薬(名前 ワーファリン)] 効果・転帰(c.治療中)	
13	ある	女 65才 基礎疾患(有;悪 性リンパ腫)	2014年2月26日 D-dimer(1.64μg/mL)	測定しなかった			初発血栓タイプ(a.静脈性) 血栓の部位など(a.深部静脈) 危険因子/誘因(f.悪性腫瘍) 再発イベント;血栓塞栓症のタイプ、部 位、危険因子/誘因など → 後脛骨静 脈	検査(a.超音波エコー) 薬剤[a.抗凝固薬(名前 ワーファリン)] 効果・転帰(d.死亡)	
14	ある	男 64才 基礎疾患(有;肝 硬変、ATⅢ欠損 症、肝臓)	2014年11月14日 D-dimer(3.77μg/mL)	測定した		a.2014年11月13日 AT活性(24%)	初発血栓タイプ(a.静脈性) 血栓の部位など(a.深部静脈) 危険因子/誘因(f.悪性腫瘍)	検査(a.超音波エコー) 薬剤[a.抗凝固薬(名前 ワーファリン)] 効果・転帰(d.死亡)	
15	ある	男 90才 基礎疾患(有;大 腸癌)	2014年10月29日 D-dimer(0.93μg/mL)	測定しなかった			初発血栓タイプ(a.静脈性) 血栓の部位など(a.深部静脈) 危険因子/誘因(f.悪性腫瘍) 再発イベント;血栓塞栓症のタイプ、部 位、危険因子/誘因など → 浅大腿静 脈	検査(a.超音波エコー) 薬剤[a.抗凝固薬(名前 ワーファリン)] 効果・転帰(e.その他;followなし)	
16	ある	女 78才 基礎疾患(有;高 血圧、糖尿病、狭心 症)	2014年5月26日 D-dimer(11.29以下 μg/mL)	測定しなかった			初発血栓タイプ(a.静脈性) 血栓の部位など(c.表在性静脈炎) 危険因子/誘因(b.手術、g.血栓の既 往) 再発イベント;血栓塞栓症のタイプ、部 位、危険因子/誘因など → ヒラメ筋 静脈	検査(a.超音波エコー) 薬剤[a.抗凝固薬(名前)] 効果・転帰(c.治療中)	
17	ある	男 59才 基礎疾患(無)	2014年3月31日 D-dimer(19.56μg/mL) 測定方法(シスメックス ラテックス凝集LIA)	測定した	a.2014年3月31日 ATⅢ因子活 性値(58%) b.2014年3月31日 XⅢ因子活 性値(57%)	a.2014年3月31日 AT活性(58%) b.2014年3月31日 PC活性(70%) c.2014年3月31日 PS活性(72%) e.2014年3月31日 FDP(30.1μg/mL) f.2014年3月31日 総PAI-1抗原量 (28ng/mL) g.2014年3月31日 VWF活性(469%) i.2014年3月31日 抗リン脂質抗体 (16U/mL) 測定項目(抗カルジオリピン 抗体 IgG)	初発血栓タイプ(a.静脈性) 血栓の部位など(i.その他;門脈塞栓 (血栓))	検査(a.超音波エコー、b.CT、c.MRI) 薬剤[a.抗凝固薬(名前 アリクストラ、ヘパリン、 ワーファリン)] 効果・転帰(c.治療中)	

平成26年度血栓塞栓症についての全国アンケート 症例ありの回答のまとめ(3)

2015.3.6現在

No.	①症例の ありなし	②症例について 性別、年齢、基礎疾患	③D-dimerを測定して いた場合の測定年月 日	④AT,PC,PSな どいずれかの 因子の活性ま たは抗原量測 定	⑤ ④の中の重大な異常の あった因子の活性値/抗原量	⑥該当する測定項目	⑦血栓・塞栓症状について	⑧ 血栓症に対する検査、診断、治療について	⑨ その他
18	ある	女 81才 基礎疾患(有)	2014年4月17日 D-dimer(34.6以下 µg/mL) 測定方法(シ スメックス ラテックス 凝集LIA)	測定した		a.2014年4月17日 AT活性(103%) b.2014年4月17日 PC活性(90%) pc抗原量 (96%) c.2014年4月17日 PS抗原量(110%) e.2014年4月17日 FDP(55.1µg/mL) f.2014年4月17日 抗リン脂質抗体(8以下 U/mL)	初発血栓タイプ(a.静脈性) 血栓の部位など(a.深部静脈) 危険因子/誘因(b.手術、f.悪性腫瘍)	検査(a.超音波エコー、b.CT、c.MRI) 薬剤[a.抗凝固薬(名前 カブロシン、クレキサ ン)外科大腸手術時、ワーファリン]b.抗血小板薬 (名前 バイアスピリン) 処置(d.その他;下大静脈フィルター留置) 効果・転帰(c.治療中)	
19	ある	男 65才 基礎疾患(有;食 道静脈瘤)	2015年2月4日 D-dimer(10.18µg/mL) 測定方法(シスメックス ラテックス凝集LIA)	測定した	a.2015年2月4日 プロテインC因 子活性値(58%) b.2015年2月4日 XⅢ因子活性 値(40%)	a.2015年2月4日 AT活性(70%) b.2015年2月4日 PC活性(58%) c.2015年2月4日 PS抗原量(67%) d.Fibrinogen量は測定中 e.2015年2月4日 FDP(15.8µg/mL) f.総PAI-1抗原量は測定中 g. VWF活性は測定中 i.抗リン脂質抗体は測定中	初発血栓タイプ(a.静脈性) 血栓の部位など(i.その他:門脈血栓) 危険因子/誘因(r.アルコール性肝硬 変)	検査(a.超音波エコー、b.CT) 薬剤[a.抗凝固薬(名前 ワーファリン) 効果・転帰(c.治療中)	
20	ある	女 28才 基礎疾患(有;子 宮頸癌)	2013年12月16日 D-dimer(3.2µg/mL)	測定した	a.2013年12月12日 AT因子活 性値(47.6%) 抗原量 (13.7mg/dl) b.2013年12月12日 PC因子活 性値(60.7%) 抗原量(48%) c.2013年12月12日 PS因子活 性値(67%) 抗原量(81/106%) (遊離Ag)	a.b.c.は⑤に同じ d.2013年12月12日 Fibrinogen量 (542mg/dL) e.2013年12月12日 FDP(5.4µg/mL)	初発血栓タイプ(a.静脈性) 血栓の部位など(a.深部静脈) 危険因子/誘因(c.薬剤、f.悪性腫瘍、r. その他;子宮頸癌による血管の物理的 閉塞)	検査(b.CT) 薬剤[a.抗凝固薬(名前 ヘパリン、ワーファリン) 処置(d.その他;IVCフィルター) 効果・転帰(a.治療した、b.因子の値が正常化し た)	PVT発症当初AT活性・抗原が持続低値だったが、回 復した。
21	ある	女 50才 基礎疾患(有;先 天性股関節脱臼)	2013年9月4日 D-dimer(23.3以下 µg/mL)	測定した	a.2013年11月15日 プラスミン 因子活性値(54.3%)	* 2013.9.5~2014.4.18ワーファリン加中 a.2013年12月26日 AT活性(91.7%) b.2013年12月26日 PC活性(82.8%) PC抗 原量(80%) c.2013年12月26日 PS活性(59%) PS抗原 量(65/68(遊離)) d.2014年3月14日 Fibrinogen量(332mg/dL) e.2013年12月26日 FDP(4.8µg/mL) h.2013年11月15日総ホモシステイン濃度 (6.4nmole/mL) i.2013年11月15日 抗リン脂質抗体(< 0.7U/mL) 測定項目(a-cc-β ₂ GPI)	初発血栓タイプ(a.静脈性) 血栓の部位など(a.深部静脈) 危険因子/誘因(b.手術) 再発イベント;血栓塞栓症のタイプ、部 位、危険因子/誘因など → 2014/4/18ワーファリン中止→9/19右ヒ ラメ筋PVT再発	検査(a.超音波エコー、b.CT) 薬剤[a.抗凝固薬(名前 ワーファリン、ヘパリン) 効果・転帰(a.治療した)	右股関節置換後の両側PVTです。
22	ある	男 41才 基礎疾患(有;① Upshaw Schulmanman Syndrome ②APS ③高ホモシステン)	2014年1月30日 D-dimer(0.2以下 µg/mL)	測定した		a.2014年1月30日 AT活性(117.4%) b.2014年1月30日 PC活性(130.8%) PC抗 原量(127%) c.2014年1月30日 PS活性(118%) i.抗リン脂質抗体(1.1 U/mL) 測定項目 (β ₂ GPI)	初発血栓タイプ(b.動脈性) 血栓の部位など(f.脳梗塞)	検査(c.MRI) 薬剤[d.その他;FFP輸注で二次予防中 効果・転帰(c.治療中)	初診15年前にITP疑診例とされていた。今日脳梗塞 発症後αCL-Abプラスで紹介 ADAMTS13活性4.2%、 ホモシステン36.2と異常値あり。
23	ある	女 30才 基礎疾患(有; VSP)	2014年3月19日 D-dimer(0.1µg/mL)	測定した		a.2014年3月19日 AT活性(107.5%) b.2014年3月19日 PC活性(117.0%) PC抗 原量(113.0%) c.2014年3月19日 PS活性(102%) PS抗 原量(84/90(遊離)) d.2014年3月19日 Fibrinogen量(292mg/dL) e.2014年3月19日 FDP(1.0µg/mL) h.2014年3月19日総ホモシステイン濃度 (6.5nmole/mL) i.2014年3月19日 抗リン脂質抗体(< 0.7U/mL) 測定項目(β ₂ GPI)	初発血栓タイプ(c.両方) 血栓の部位など(a.深部静脈、f.脳梗 塞)	検査(c.MRI) 薬剤[a.抗凝固薬(名前 ワーファリン、イグザレ ルト)	突然発症の左MCA領域脳梗塞+右下腿PVT

平成26年度血栓塞栓症についての全国アンケート 症例ありの回答のまとめ(4)

2015.3.6現在

No.	①症例のありなし	②症例について性別、年齢、基礎疾患	③D-dimerを測定していた場合の測定年月日	④AT,PC,PSなどいずれかの因子の活性または抗原量測定	⑤ ④の中の重大な異常であった因子の活性値/抗原量	⑥該当する測定項目	⑦ 血栓・塞栓症状について	⑧ 血栓症に対する検査、診断、治療について	⑨ その他
24	ある	女 44才 基礎疾患(有:子宮筋腫、反復脳梗塞)	2014年3月22日 D-dimer(15.8μg/mL)	測定した	a.2014年3月21日 PS因子活性値(55%) 抗原量(67/64%) /遊 b.2014年3月21日 FX II 因子活性値(49.3%)	a.2014年3月21日 AT活性(91%) b.2014年3月21日 PC活性(75.9%) PC抗原量(79%) d.2014年3月21日 Fibrinogen量(228mg/dL) e.2014年3月21日 FDP(22.1μg/mL) h.2014年3月21日総ホモシステイン濃度(9.1nmole/mL)	初発血栓タイプ(b.動脈性) 血栓の部位など(f.脳梗塞) 危険因子/誘因(r.その他:月経) 再発イベント:血栓塞栓症のタイプ、部位、危険因子/誘因など →脳梗塞×4回(いずれも月経時、H18・20・23・26年)	検査(c.MRI) 薬剤[a.抗凝固薬(名前 ワーファリン、イグザレルト)]	
25	ある	男 70才 基礎疾患(有:血小板増多症)	2014年7月16日 D-dimer(4.8μg/mL)	測定した		a.2014年7月16日 AT活性(80.3%) b.2014年7月16日 PC活性(127.1%) PC抗原量(118%) c.2014年7月16日 PS活性(80%) PS抗原量(121/121(遊離)%) d.2014年7月16日 Fibrinogen量(303mg/dL) e.2014年7月16日 FDP(6.6μg/mL) h.2014年7月16日総ホモシステイン濃度(16.8nmole/mL) i.2014年7月16日 抗リン脂質抗体(<0.7U/mL) 測定項目(β ₂ GPI)	初発血栓タイプ(b.動脈性) 血栓の部位など(i.その他:左下肢)	薬剤[b.抗血小板薬(名前 プラビックス)] 処置(d.その他:血栓吸引)	RA, ASO 既往あり
26	ある	男 13才	2014年7月25日 D-dimer(25.1μg/mL)	測定した	a.2014年7月25日 PS因子活性値(47%)	a.2014年7月25日 AT活性(117.4%) b.2014年7月25日 PC活性(104.4%) c.2014年7月25日 PS活性(47%) d.2014年7月25日 Fibrinogen量(405mg/dL) e.2014年7月25日 FDP(36.3μg/mL) i.2014年7月25日 抗リン脂質抗体(<0.7U/mL) 測定項目(β ₂ GPI)	初発血栓タイプ(c.両方) 血栓の部位など(i.その他:上矢状洞)	検査(c.MRI) 薬剤[a.抗凝固薬(名前 ヘパリン)] 効果・転帰(c.治療中)	前医にて頭痛から脳出血と診断され、続いて上矢状洞血栓も判明した。
27	ある	女 20才	2014年9月5日 D-dimer(0.1μg/mL)	測定した		a.2014年9月5日 AT活性(100.9%) b.2014年9月5日 PC活性(117.3%) PC抗原量(109%) c.2014年9月5日 PS活性(93%) PS抗原量(103/96(遊離)%) d.2014年9月5日 Fibrinogen量(312mg/dL) e.2014年9月5日 FDP(0.6μg/mL) h.2014年9月5日総ホモシステイン濃度(9.6nmole/mL) i.2014年9月5日 抗リン脂質抗体(<0.7U/mL) 測定項目(β ₂ GPI)	初発血栓タイプ(b.動脈性) 血栓の部位など(i.その他:網膜分枝動脈)	検査(e.その他:眼底検査)	
28	ある	男 28才	2014年10月10日 D-dimer(0.0μg/mL)	測定した		a.2014年10月10日 AT活性(95.5%) b.2014年10月10日 PC活性(104.2%) PC抗原量(105%) c.2014年10月10日 PS活性(83%) PS抗原量(93/106(遊離)%) d.2014年10月10日 Fibrinogen量(232mg/dL) e.2014年10月10日 FDP(0.3μg/mL) h.2014年10月10日総ホモシステイン濃度(9.5mole/mL) i.2014年10月10日 抗リン脂質抗体(<0.7U/mL) 測定項目(β ₂ GPI)	初発血栓タイプ(b.動脈性) 血栓の部位など(i.その他:網膜中心動脈)	検査(e.その他:眼底検査) 薬剤[d.その他:プロソグランジン]	年齢に比較して脳虚血性変化強いと読影されている。
29	ある		2015年1月7日 D-dimer(0.4μg/mL)	測定した	a.2015年1月7日 PC因子活性値(47.1%) 抗原量(47%)	a.2015年1月7日 AT活性(96.1%) c.2015年1月7日 PS活性(81%) PS抗原量(80.0(遊離)%) d.2015年1月7日 Fibrinogen量(310mg/dL) e.2015年1月7日 FDP(1.2μg/mL)	初発血栓タイプ(a.静脈性) 血栓の部位など(a.深部静脈)	検査(a.超音波エコー、b.CT) 薬剤[a.抗凝固薬(名前 リクシアナ)] 効果・転帰(c.治療中)	LA 1.19 陰性(DRVVT)

平成26年度血栓塞栓症についての全国アンケート 症例ありの回答のまとめ(5)

2015.3.6現在

No.	①症例のあり/なし	②症例について性別、年齢、基礎疾患	③D-dimerを測定していた場合の測定年月日	④AT,PC,PSなどいずれかの因子の活性または抗原量測定	⑤ ④の中の重大な異常のあった因子の活性値/抗原量	⑥該当する測定項目	⑦血栓・塞栓症状について	⑧血栓症に対する検査、診断、治療について	⑨その他
30	ある	女 基礎疾患(有:バセドウ病)	2014年10月31日 D-dimer(0.7 μ g/mL)		a.2014年10月31日 PS因子活性値(25%) 抗原量(54/39%)	a.2014年10月31日 AT活性(101.2%) b.2014年10月31日 PC活性(106.9%) PC抗原量(96%) c.2014年10月31日 PS活性(25%) PS抗原量(54%) d.2014年10月31日 Fibrinogen量(316mg/dL) e.2014年10月31日 FDP(1.0 μ g/mL) h.2014年10月31日 総ホモシステイン濃度(6.8nmole/mL) i.2014年10月31日 抗リン脂質抗体(<0.7U/mL) 測定項目(β_2 GPI)	再発イベント;血栓塞栓症のタイプ、部位、危険因子/誘因など →習慣性流産		流産精査時にPS低下指摘、甲状腺術前にコンサルト
31	ある	女 22才 基礎疾患(有: SLE)	2015年1月30日 D-dimer(8.1 μ g/mL)	測定した		a.2015年1月30日 AT活性(109.6%) b.2015年1月30日 PC活性(140.0%) PC抗原量(140.0%) c.2015年1月30日 PS活性(82%) PS抗原量(140/93(遊離)%) d.2015年1月30日 Fibrinogen量(526mg/dL) e.2015年1月30日 FDP(10.5 μ g/mL)	初発血栓タイプ(c.両方) 血栓の部位など(a.深部静脈、b.肺塞栓) 危険因子/誘因(c.薬剤、r.その他;膠原病既往)	検査(a.超音波エコー、b.CT) 薬剤[a.抗凝固薬(名前 ヘパリン、リクシアナ) b.抗血小板薬(名前 バイアスピリン)] 効果・転帰(c.治療中)	
32	ある	女 30才 基礎疾患(有:AT 欠乏症(Tpe I))	2015年1月30日 D-dimer(0.9 μ g/mL)	測定した		* 以下ワーファリン内服中 a.2013年5月8日 AT活性(50.6%) b.2013年5月8日 PC活性(62.2%) PC抗原量(54%) c.2013年5月8日 PS活性(33%) PS抗原量(37/36(遊離)%) d.2013年5月8日 Fibrinogen量(234mg/dL) e.2013年5月8日 FDP(0.0 μ g/mL)	初発血栓タイプ(a.静脈性) 血栓の部位など(a.深部静脈) 再発イベント;血栓塞栓症のタイプ、部位、危険因子/誘因など →①ビル内服後 ②第1回妊娠8W ③第2回妊娠22W	検査(a.超音波エコー) 薬剤[a.抗凝固薬(名前 ワーファリン → ヘパリン) b.抗血小板薬(名前 バイアスピリン)] 効果・転帰(c.治療中)	

Ⅲ. 準備会ならびに班会議

厚生労働科学研究委託事業 難治性疾患等克服研究事業
[難治性疾患等実用化研究事業(難治性疾患実用化研究事業)]

「後天性凝固異常症の P.O.C.テストによる 迅速診断システムの開発」

平成 26 年度 準備会 プログラム

日時：平成 26 年 7 月 13 日(日) 13:00～16:00

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)

12:50～13:00	受付	
13:00～14:30	1)研究計画概要	資料 1
	2)今年度事業計画	資料 2
	3)検体収集	資料 3
	4)海外派遣計画	資料 4
	(9月18～20日サンディエゴ)	
14:30～16:00	5)現在の凝固系 POCT 情報 (全員)	資料 5
	6)抗体、抗原情報 (全員)	資料 6
	7)研究補助問題	資料 7
	8)経理の注意	資料 8
	9)その他(報告の時期と種類, 次年度申請について)	資料 9

厚生労働科学研究委託費
難治性疾患等実用化研究事業(難治性疾患実用化研究事業)

「後天性凝固異常症の P.O.C.テストによる
迅速診断システムの開発」

平成26年度 班会議 プログラム

日時：平成27年1月25日(日) 13:00～16:00

場所：東京国際フォーラム 6階 G607
(東京都千代田区丸の内3-5-1)

- | | |
|-------------|--|
| 12:50～13:00 | 受付 |
| 13:00～14:10 | 26年度の研究成果とまとめ
自己評価
27年度事業計画(全体)
その他(導入機器、知財対策など) |
| 14:10～14:20 | 休憩 (コーヒーとケーキ) |
| 14:20～16:00 | 26年度の研究進捗状況と27年度事業計画
(研究分担者) <ul style="list-style-type: none">・ 杉山 大輔 先生 (株式会社キューメイ研究所)・ 尾崎 司 先生 (山形大学)・ 惣宇利 正善 先生(山形大学)・ 北島 勲 先生 (富山大学)・ 橋口 照人 先生 (鹿児島大学) |

経理の注意

報告の時期と種類について

その他

IV. 委託業務成果報告（業務項目）

山形大学の業務項目「a. プロジェクトの総合推進」と
「e. 開発研究検討会の実施」は、
それぞれ、総括、班会議の項に記述、掲載した。

FXIII/13活性測定クロマト法に関わる技術開発

担当責任者 一瀬 白帝 山形大学医学部 教授
惣宇利正善 山形大学医学部 准教授
尾崎 司 山形大学医学部 助教

研究要旨

第XIII因子（FXIII）インヒビターを高感度に検出するための、新規のFXIII活性測定法を検討した。自己免疫性出血性血友病XIII/13（AH13）症例の血漿において、 α_2 -プラスミンインヒビター（ α_2 -PI）のフィブリンへの架橋が著しく抑制されていることから、 α_2 -PIの架橋部位を分泌型アルカリフォスファターゼ（AP）に融合した基質タンパク質（PIAP）を構築し、トロンビンおよびカルシウムとともに血漿に加えて、生じたフィブリン塊へのPIAPの取り込みをAP発色基質により測定した。PIAPのフィブリンへの取り込みはFXIIIによく依存し、再現性も良好であった。5段階希釈混合試験の結果から、本法はFXIIIインヒビターの検出に有用であることが示された。

の吸光度を測定した。

A. 研究目的

自己免疫性出血性血友病XIII/13（AH13）は、何らかの原因で第XIII因子（FXIII）に対する抗体を生じてFXIIIが欠乏する結果、重大な出血症状を呈する後天性出血病である。我々のこれまでの研究で、FXIIIの酵素部位であるAサブユニット（FXIII-A）に対するAH13の自己抗体は、FXIIIの活性化（Aa型）もしくは触媒活性（Ab型）を阻害するインヒビターであることを見いだしている。

FXIII酵素活性は、おもにアンモニア放出法（AR）やアミン取り込み法（AI）で測定されるが、測定原理が異なるために、交差混合試験において、ARではAb型を、AIではAa型をそれぞれ見落とし危険性があり、より確実に両型のインヒビターを検出できる活性測定法が望まれている。

AH13症例血漿では、抗線溶因子である α_2 -プラスミンインヒビター（ α_2 -PI）のフィブリンへの架橋が著しく抑制されていることに着目し、本研究では、 α_2 -PIの架橋部位と分泌型アルカリフォスファターゼ（AP）との融合タンパク質（PIAP）を利用したFXIII活性測定法を提案し、検討した。

B. 研究方法

分泌シグナルおよび架橋部位を含む α_2 -PIのN末端50アミノ酸をコードするcDNAをAP cDNAの5'側に連結し、哺乳動物発現ベクターに挿入した。PIAP発現ベクターをBHK細胞に導入して作製した安定高発現細胞株の培養液を回収し、硫酸沈殿法で発現PIAPを濃縮した。血漿にPIAP、トロンビン、塩化カルシウムを同時に加えて一定時間反応させ、生じたフィブリン塊を遠心にて回収した。可溶性の発色AP基質（4-nitrophenyl phosphate）をフィブリン塊と反応させて、発色

（倫理面への配慮）

本研究は、山形大学倫理委員会および山形大学遺伝子組換え実験委員会の承認を得て行った。

C. 研究結果

正常血漿との反応で生じたフィブリン塊にてAP基質が発色したので、PIAPのフィブリンへの取り込みを確認した。正常血漿におけるカルシウム除去やトランスグルタミナーゼ阻害剤存在下での反応、およびFXIII-A欠乏血漿での反応においてはいずれも発色が認められず、FXIII依存性のPIAP取り込みが確認された。FXIII-A欠乏血漿による正常血漿の段階希釈の結果から、PIAP取り込みのFXIII量依存性も確認した。10回以上の反復試験でも、再現性がよく誤差範囲も小さく、AI法との良い相関も確認された。各AH13血漿について、正常血漿との5段階希釈混合試験を行った結果、Aa型、Ab型ともに高感度に阻害が検出された。さらに、抗体反応性やFXIII活性化阻害などのパラメーターと、本法を用いて算出したベセスダ単位との有意な相関も認められた。

D. 考察

既存のARとAIはそれぞれ、FXIIIインヒビターの型によって阻害検出の可・不可があり、見落としを防ぐためには両方の測定法を施行する必要がある。本研究で開発した測定法ではAa型、Ab型のいずれも高感度に阻害を検出できることが示され、FXIIIインヒビターのスクリーニングに極めて有効であると考えられる。また、APには蛍光や発光基質も市販されており、必要に応じてより感度の高い活性測定も可能である。

現法では反応を試験管で行い、フィブリンの回収に遠心操作を必要としているが、Point of

care testに向けては、より簡便にかつ確実に回収することが望まれる。

今後、この基質を使用してFXIII活性のクロマトグラフィー化をキューメイ研究所と協同で実施する予定である。

E. 結論

FXIIIインヒビターの検出に有用なFXIII活性測定法の開発に成功した。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. **Souri M**, Osaki T, Ichinose A. Anti-factor XIII A subunit (FXIII-A) autoantibodies block FXIII-A2 B2 assembly and steal FXIII-A from native FXIII-A2 B2. *J Thromb Haemost.* 印刷中.

2. Kotake T, **Souri M**, Takada K, Kosugi S, Nakata S, Ichinose A. Report of a patient with chronic intractable autoimmune hemorrhaphilia due to anti-factor XIII/13 antibodies who died of hemorrhage after sustained clinical remission for 3 years. *Int J Hematol.* 印刷中.

3. Hayakawa K, Tamura S, Gima H, Hayakawa T, Kurihara T, Ooura M, Nakano Y, **Souri M**, Ichinose A, Fujimoto T. Successful treatment of chronic disseminated intravascular coagulation using recombinant human soluble thrombomodulin in a dialysis patient with dissecting aortic aneurysm. *Rinsho Ketsueki.* 2014; 55:2300-5.

4. Ogawa Y, Mihara M, **Souri M**, Yanagisawa K, Hayashi T, Kobayashi N, Shimizu H, Iriuchishima H, Ishizaki T, Handa H, Osaki T, Nojima Y, Ichinose A. Complete remission achieved by steroid pulse therapy following rituximab treatment in a case with autoimmune haemorrhaphilia due to anti-factor XIII antibodies. *Thromb Haemost.* 2014; 112:831-3.

5. **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.* 2014; 20:255-62.

2. 学会発表

惣宇利 正善、尾崎 司、一瀬 白帝 凝固第XIII因子インヒビターの鋭敏な検出のための新規第XIII因子活性測定法の開発. 第36回日本血栓止血学会学術集会. 2014. 5月 大阪

惣宇利 正善、尾崎 司、一瀬 白帝 先天性凝固第XIII因子Bサブユニット欠損症例に生じた抗Bサブユニット同種抗体による活性阻害. 第87回日本生化学会大会. 2014. 10月 京都

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

抗FXIII/13-Aサブユニット自己抗体検出イムノクロマト法に関わる技術開発

担当責任者 一瀬 白帝 山形大学医学部 教授
惣宇利正善 山形大学医学部 准教授
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/13 (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、昨年度キューメイ研究所と共同で開発したAH13の迅速診断が可能なイムノクロマト法を用いて実地試用を継続して行った。昨年度までに診断を行った検体を含めて、健常人24例とAH13疑い症例43例で解析を行ったところ、従来法であるドットプロットとの一致度 κ 係数は0.79で一致度は十分高いといえる。一方、受信者操作特性 (ROC) 解析を行い、ROC曲線下面積 (AUC) を求めたところ、0.91と非常に高い値を示し、判定にも適しているといえる。AH13-Aa型については15例すべて検出できたが、AH13-Abについては3例中1例検出できなかった。しかし、この1例もトロンビン、カルシウムで活性化することで検出できたので改良を加えることで実用化できる可能性はある。AH13-Bを検出するイムノクロマト法は現在開発中である。

A. 研究目的

後天性/自己免疫性血友病XIII/13 (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疾患である。自己抗体が認識する部位と阻害様式の違いからAa型、Ab型、B型の3群に分類される。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、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、昨年度開発した、抗FXIII-A自己抗体を検出するイムノクロマト法を臨床現場で迅速診断に使用、普及させることを目的とし、最終的には早期診断、早期治療が実現できるようにする。

B. 研究方法

1. AH13 症例の臨床現場迅速検査に向けたイムノクロマト法の試用

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 量が少ないため、偽陰性になることがある。このような症例で自己抗体を検出するためには混合法を用いる必要がある。

1-1. イムノクロマト法

直接患者血漿 (検体) を用いてイムノクロマト法を行う直接法 (30 分) と、予め健常人血漿と検体を 1:1 で混合した後、イムノクロマト法を行う混合法 (2 時間 30 分) で判定を行った。

判定結果は専用の読み取り装置を用いてテストラインの濃さを数値化し、陽性コントロールの値を 1.00 としてそれぞれの相対強度を求めた。

1-2. 再現性の検証

再現性試験として陽性コントロールを 8 回、陰性コントロールを 20 回試行した。

1-3. 症例

今年度は新たに、健常人 7 例、後天性 FXIII 欠乏症 5 例、AH13 症例 7 例についてイムノクロマト法の試用を直接法、混合法で行った。

昨年度までに診断を行った検体を含めて、健常人 24 例、後天性 FXIII 欠乏症 23 例、AH13 症例 20 例 (直接法では 19 例) の結果をもとに解析を行った。

1-4. カットオフ値の設定、感度、特異度の算出

健常人 24 例の平均 $+2x$ 標準偏差 (SD)、および受信者操作特性 (ROC) 解析から得た値をカットオフ値に用いて各々の感度と特異度を算出した。

2. AH13-Ab型症例に対するイムノクロマト法の適用

AH13 は上述のように Aa 型、Ab 型、B 型の 3 群に分類される。このうち Aa 型と Ab 型は抗 FXIII-A 自己抗体陽性である。昨年度混合法で予備検討を行ったところ、Aa 型は調べた 8 例すべて、Ab 型は 3 例中 2 例で検出できたが、Ab 型の 1 例は検出されなかった。

2-1. イムノクロマト法 (混合法、活性化 FXIII (FXIIIa))

AH13-Ab 型症例の自己抗体はおもに活性化 FXIII (FXIIIa)を認識するので正常血漿の代わりに FXIIIa を混合してイムノクロマト法を行い、Ab 型の 3 例すべてで検出されるか検討した。

2-2. イムノクロマト法 (混合法、健常人血漿+トロンビン+カルシウム)

健常人血漿を混合後、トロンビン、カルシウムを用いて FXIII を活性化してイムノクロマト法を行い、Ab 型の 3 例すべてで検出されるか検討した。

(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

1-1. 再現性試験

再現性試験では陽性コントロールで平均±SD =1.00±0.10 (n=8)、陰性コントロールで平均±SD =0.09±0.03 (n=20) だった。

1-2. 感度、特異度の算出

過去に診断を行った検体を含めた健常人24例の平均±SD=0.08±0.05で平均+2SD=0.18だった。この値をカットオフ値にして後天性FXIII欠損症23例、AH13 20例 (直接法では19例) から感度および特異度を算出したところ、直接法では特異度96%、感度73%、ドットプロットとの一致度を示すκ係数は0.77、混合法では特異度87%、感度94%、κ係数は0.79だった。

1-3. 受信者操作特性 (ROC) 解析

1-2.の結果をもとにROC解析を行い、それぞれのROC曲線下面積 (AUC) を求めたところ、直接法でAUC=0.74 (カットオフ値0.14、感度68%、特異度89%)、混合法でAUC=0.91 (カットオフ値0.23、感度80%、特異度98%) だった。

2. AH13-Ab型症例に対するイムノクロマト法の適用

AH13-Ab型3例について健常人血漿を検体と1:1で混合する通常の混合法では2例陽性、1例陰性だった。健常人血漿の代わりにFXIIIaを混合した場合、および健常人血漿を混合後、トロンビンとカルシウムでFXIIIを活性化した場合は3例とも陽性で検出された。

D. 考察

再現性試験で陽性コントロールの変動係数 (CV) =10%、陰性コントロールのCV=33%だった。陰性コントロールでは平均値が小さいのでCV値が大きくなったと考えられる。

イムノクロマト法とドットプロットとの一致度は直接法でκ係数0.77、混合法でκ係数0.79だったので一致度は十分高いといえる。

また、直接法、混合法それぞれのAUCは0.74と0.91だったので、直接法では中程度の診断能があり、混合法は高い診断能があるといえる。

AH13-Ab型はFXIIIaに対する自己抗体があるため、健常人血漿と混合しただけでは反応しない (陰性) 検体も1例あった。FXIIIaを混合すると3例すべて

で陽性で検出された。しかし、FXIIIaは不安定なので臨床現場で用いるには実用的ではない。しかし、健常人血漿と混合後、トロンビンとカルシウムで活性化した場合も、3例とも陽性で検出されたので、実用化できる可能性はある。

E. 結論

イムノクロマト法は従来のドットプロット法とも高い一致度を示し、時間も2時間半と短時間で済むことから迅速診断に使用可能である。また、イムノクロマト法、特に混合法はAUCが0.91と非常に高いので判定に適しているといえる。

AH13-Ab型についても改良を加えることで検出は可能であることが示唆された。

今後は、AH13-B型を検出できるイムノクロマト法を開発する予定である。

F. 研究発表

1. 論文発表

[原著]

1. Osaki T, Sugiyama D, Magari Y, Souri M, Ichinose A : Rapid immunochromatographic test for detection of anti-factor XIII A subunit antibodies can diagnose 90% of cases with autoimmune hemorrhaphilia XIII/13. *Thromb Haemost*, 2015, In Press.
2. Ichinose A, Souri M, Osaki T : Clinical features of 32 new Japanese cases with autoimmune hemorrhaphilia due to anti-factor XIII antibodies. *Haemophilia*, 2015, In Press.
3. Souri M, Osaki T, Ichinose A: Anti-factor XIII A subunit (FXIII-A) autoantibodies block FXIII-A₂B₂ assembly and steal FXIII-A from native F XIII-A₂B₂. *J Thromb Hemost*. 2015 Feb 20. doi: 10.1111/jth.12877. [Epub ahead of print]

[症例報告]

1. Uchida E, Watanabe K, Arai R, Yamamoto M, Souri M, Osaki T, Ichinose A, Miura O, Koyama T: Hemorrhagic Autoimmune Hemorrhaphilia Resulting from Autoantibody against the A Subunit of Factor XIII. *Internal Medicine*, 2015, In Press.
2. Ogawa Y, Mihara M, Souri M, Yanagisawa K, Hayashi T, Kobayashi N, Shimizu H, Iriuchishima H, Ishizaki T, Handa H, Osaki T, Nojima Y, Ichinose A : Complete remission achieved by steroid pulse therapy following rituximab treatment in a case with autoimmune haemorrhaphilia due to anti-factor XIII antibodies. *Thromb Haemost* 112, 831-833, 2014.

2. 学会発表

1. 尾崎 司, 惣宇利 正善, 一瀬 白帝 : Characterization of plasma pro-transglutaminase, coagulation factor XIII, using its synthetic peptides. 第 87 回日本生化学会大会, 京都; 2014 年 10 月 18 日

G. 知的財産権の出願・登録状況

特記事項なし

抗FXIII/13-Bサブユニット自己抗体検出イムノクロマト法の試作に関する研究
(抗FXIII/13-Aサブユニット自己抗体検出イムノクロマト法の試作に関する研究)

担当責任者 曲 泰男 株式会社キューメイ研究所 代表取締役
杉山 大輔 株式会社キューメイ研究所 開発リーダー

研究要旨

後天性血友病13は自己抗体が作られ、FXIIIが働かないため致命的な出血症状を呈する難治性疾患である。現在使用されている検査は高価で時間がかかるため、あまり実施されていない。そこで、本研究ではイムノクロマト法を用いて、安価で短時間に測定可能な評価系の開発を行った。抗FXIII/13-Aサブユニット自己抗体検出イムノクロマト法については、検体の希釈条件と洗浄液の組成を検討することにより非特異反応を軽減することに成功した。抗FXIII/13-Bサブユニット自己抗体検出イムノクロマト法の試作は、FXIII/13-Aサブユニットの評価例を参考に構築し、選別した抗体でヒトプール血漿を用いて測定範囲の検討を行ったところ、幅広い領域で測定可能であった。十分な感度であったため、従来法にて陽性反応が見られた検体に関して検討を行ったところ、陰性コントロールと比べて強い反応が見られた。陰性コントロールにて非特異反応が観測されたので、現在、改良中である。

A. 研究目的

「高齢者」の生命を脅かす出血病と血栓症の診療を均てん化するための基礎となる迅速診断技術の実現を目指し、本研究では自己免疫性出血症を迅速、簡便、安価に診断可能な評価系を開発する。自己免疫性出血症の内、本研究は後天性出血症XIII/13を標的として行った。

B. 研究方法

評価系には迅速簡便に評価可能なイムノクロマト法を用い、先行して試作した抗FXIII/13-Aサブユニット自己抗体検出イムノクロマト法を基に開発を行った。本研究ではまず、先行して試作した抗FXIII/13-A自己抗体の系を改良し、併行して本評価系の構築を行った。

1. 抗FXIII/13-Aサブユニット自己抗体検出イムノクロマト法の改良

抗凝固因子自己抗体検出は自己抗体が患者により多量存在する為、イムノクロマト法の感度と特異性の制御が必要である。これまでに、評価系としてニトロセルロースメンブレンにエピトープマッピングにより認識部位が同定された、マウスモノクローナル抗FXIII-A抗体を固定化し、金コロイド標識した抗ヒトIgG抗体により、発色を行う系を構築した。

本評価系は多種類の自己抗体（ヒトIgG）を認識するために、金コロイド標識側には抗ヒトIgG抗体を用いているため、比較的自由度が高く多種類のヒトIgG抗体と反応する。そのため、特異性を向上させるために、反応過程に洗浄工程を組み込んだ。今回、この洗浄液の組成について検討を行った。

また、イムノクロマトの系では金コロイドの粒径により感度を調節する事が可能である。以前構築した系は金コロイド液の凝集も見られたため、金コロイドの粒径と標識方法に関しても併せて検討を行った。

2. 抗FXIII/13-Bサブユニット自己抗体検出イムノクロマト法の試作

抗FXIII/13-Bサブユニット自己抗体検出イムノクロマト法の試作は、FXIII/13-Aサブユニットの評価例を参考に構築した。

まず、抗FXIII-B抗体の選別を簡易的に製造したイムノクロマトにより評価した。評価に用いた7種類の抗体はエピトープマッピング済みの抗体を用いた。メンブレン側と金コロイド側それぞれに抗体を固定化し、合計49種類の簡易イムノクロマトを構築した。ヒトのプール血漿を用いて評価を行い、それぞれの反応性と反応部位を考慮し、実際の製造を見越して生産性の高い抗体の選別を行った。

反応が見られなかった組合せや非特異反応、反応性が低く抗体産生量が少なかった抗体に関しては除外し、ヒトプール血漿を用いて、測定範囲、感度に関して検討を行った。

また、選別した抗体を用いて評価系を構築し、抗FXIII/13-Aサブユニット自己抗体検出イムノクロマト法と同様の方法で検体の評価を行った。

(倫理面への配慮)

本研究では匿名の検体を用いており、医師の指導の下で検討を行った。

C. 研究結果

1. 抗FXIII/13-Aサブユニット自己抗体検出イムノクロマト法の改良

検体の希釈条件と洗浄液の組成を検討することにより非特異反応が軽減された。

金コロイドの粒径を小さくすることにより、金コロイド粒子当たりの反応性は多少低くはなったが、十分な感度が得られている。金コロイドの分散性は粒径を小さくすることにより向上した。本法の感度は使用する金コロイド量などで調節可能であり、検体を評価していく中でより良い製造条件を決定する。

また、メンブレン側に用いたモノクローナル抗体と患者の自己抗体のFXIII認識部位が同じ場合、偽陰性が観測される恐れがある。本研究にて複数化を試みた。非特異反応も検出されたが、結果から抗体のFc部分を除去する事により非特異反応は軽減されると期待された。

2. 抗FXIII/13-Bサブユニット自己抗体検出イムノクロマト法の試作

抗体の反応性を確認し、実際の製造も考慮して選別した。選別した抗体でヒトプール血漿を用いて測定範囲の検討を行ったところ、低濃度領域から健常値の15倍程度の高濃度領域まで幅広い領域で測定可能であった。

十分な感度であったため、こちらも従来法にて陽性反応が見られた検体に関して検討を行ったところ、陰性コントロールと比べて強い反応が見られた。こちらも陰性コントロールにて非特異反応が観測されたが、抗FXIII/13-Aサブユニット自己抗体イムノクロマト法の例と同様、Fc部分を除去する事でさらに良好な結果が得られると期待される。

D. 考察

抗・凝固因子自己抗体検出イムノクロマト法は従来法で検出された陽性例で反応が認められ、有用性を確認する事ができた。

本評価系では多種多様な自己抗体(ヒトIgG)を認識しなければならないため、通常のイムノクロ

マト法よりも自由度を高くしなければならない。そのため、非特異反応が検出されやすく、実用化のためには非特異反応を除去するための工夫が必要である。また、偽陰性を避けるための抗体の複数化は、抗体のFc部分を除去する事により非特異反応を軽減される事が期待された。既に抗体消化の条件については検討を行っている。

本法は従来法と比べて大幅に時間を短縮する事ができた。さらに操作性を改善する事により、より簡便で迅速に診断可能なキットの創出が期待される。

E. 結論

本研究は当初の計画をほぼ達成する事ができた。抗・凝固因子自己抗体検出イムノクロマト法はこれまでに無く、新規性が高い。測定時間も従来法と比べ短縮された。

更に多くの検体との評価を行う事で問題点などを洗い出し、より良いキットとなるようバージョンアップを図る。

F. 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表
なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

D-dimer全分子量均等測定イムノクロマト法の試作に関する研究

担当責任者 曲 泰男 株式会社キューメイ研究所 代表取締役
杉山 大輔 株式会社キューメイ研究所 開発リーダー

研究要旨

静脈血栓塞栓症や播種性血管内凝固症候群、周術期の血栓症や過剰出血の早期診断などに不可欠なD-dimerの測定系を、イムノクロマト法を用いて構築した。D-dimerは多種多様な分子種が存在しており、正確な診断、病態判定、適切な治療にはこの多種多様な分子種に対して均一に反応することが必須である。今回、性状解析済みですでにラテックス凝集法で有用性が確認されている抗体を活用して、イムノクロマト法の最良条件を検索し、試作した。まず、種々の分子種のD-dimerを用いて反応性について検討したところ、分子種に関係なく均一に反応することが確認され、ラテックス試薬の特長そのままに、イムノクロマト法を構築することができた。また、従来法であるラテックス試薬との検体相関を検討したところ、良好な結果が得られた。

A. 研究目的

静脈血栓塞栓症（エコノミークラス症候群を含む）などの血栓症や播種性血管内凝固症候群、その他、周術期の血栓症や過剰出血の早期診断、早期治療にはD-dimerの測定が不可欠である。しかしながら、正確な診断、病態判定、適切な治療には多種多様な分子種で存在するD-dimerに対して均一に反応する必要がある。

本研究ではすでに性状解析済みでラテックス凝集法にて有用性が確認された抗体を用いて、イムノクロマト法を試作する。

このことにより、迅速、正確に診断が必要な血栓症の除外診断の鍵であるD-dimerを正確に測定できる方法が普及され、医療水準の向上と経済面も大きな利点があると期待される。

B. 研究方法

ラテックス凝集法にて確認された、高分子から低分子の全域にわたって等しく反応する抗体を用いてイムノクロマト法を構築した。

濃度確認済みの標準物質を用いて、構築したイムノクロマト法の感度を評価した。

また、試験管内にてフィブリンクロットを作製、さらに分解を行い、高濃度のD-dimerを用いてプロゾーンについても検討した。

さらに、様々な分子種に均等に反応するか、こちらも試験管内で作製したフィブリンクロットを分解し、それぞれの時間で同じ試験管内からサンプルを回収、プロテアーゼ阻害剤を加えて反応を

停止した。作製した種々の分子種のD-dimerはSDS-PAGEにより確認を行った。これらのサンプルを用いて、構築したイムノクロマト法の反応性について検討した。

また、ラテックス凝集法にてD-dimer濃度を測定した検体を用いて、本法との測定値の比較を行った。

（倫理面への配慮）

本研究では匿名の検体を用いており、医師の指導の下で検討を行った。

C. 研究結果

測定範囲の検討を行ったところ、ラテックス法と比較すると測定範囲は狭いが、診断に有用なカットオフ値付近では十分な感度が得られた。プロゾーンの影響もなく、実際の使用に耐えうる試作品を構築する事ができた。

さらに、種々の分子種のD-dimerを用いて反応性について検討したところ、分子種に関係なく均一に反応することが確認され、ラテックス試薬の特長そのままに、イムノクロマト法を構築することができた。

また、従来法であるラテックス試薬との検体相関を検討したところ、良好な結果が得られた。

D. 考察

構築したD-dimerイムノクロマト法はカットオフ値付近で十分な感度を持ち、実際の使用に耐え

うることを確認した。さらに様々な分子量のD-dimerに対して均一に反応する事も確認され、他にはない迅速D-dimer全分子均等測定イムノクロマト法を構築する事ができた。

E. 結論

これまでに種々のD-dimerに対して均一に反応する、イムノクロマト法の例は無く、本法は唯一の物である。

本研究にて迅速簡便に測定できるイムノクロマト法にて構築されたことで、様々な臨床現場での使用が期待される。

本評価系を用いて、更に多くの検体を測定しながら、ラテックス凝集法との比較を行う事により、より良い試薬の構築を図る。

F. 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表
なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

抗FVIII/8自己抗体検出イムノクロマト法に関わる研究開発

担当責任者 橋口照人
鹿児島大学大学院歯学部総合研究科 血管代謝病態解析学分野 教授

研究要旨

後天性血友病A (Acquired Hemophilia A; AHA)は高齢者に突然発症する致死的な出血性疾患である。迅速な診断ならびに適切な治療により救命できるにもかかわらず、治療の緊急性に見合う確定診断法が存在していないのが実情である。本研究は本症の原因である患者血中の自己抗体を迅速に検出するP.O.Cテストによる迅速診断システムの開発準備を行った。具体的には、後天性血友病A症例のスクリーニングに必須な凝固因子活性測定システムを導入し、開発に必要な検体の収集体制を構築しながら、イムノクロマト法やその前段階のELISAシステムに用いる抗体を選択中である。

A. 研究目的

後天性血友病A (Acquired Hemophilia A; AHA)の原因である患者血中の自己抗体を迅速に検出するP.O.Cテストによる迅速診断システムの開発を目的とする。

B. 研究方法

抗FVIII/8自己抗体検出イムノクロマト法の開発準備；市販の抗体を利用する。多くの種類のモノクローン抗体を購入し、2)と同様の方法で、用いる抗体の最良の組み合わせを検索する。

1. 後天性血友病患者の凝固第VIII因子比活性の測定体制の構築

後天性血友病患者(AHA)の凝固第VIII(8)因子の比活性を明確にするために、AHA患者の凝固第VIII(8)因子抗原量の測定を行う。また、凝固第VIII(8)因子活性については患者発生時に鹿児島大学病院の検査室にて速やかに測定できるように新規機器を導入する。

2. クロスミキシング試験体制の構築

後天性血友病患者発生時にクロスミキシング試験を実施するため凝固第VIII(8)因子の測定を容易に測定できる体制を整える。

3. 抗第VIII因子(FVIII/8)抗体を測定するイムノクロマト法に用いる特異的抗体の作成

実験を進めるための方策を考案し、イムノクロマト法に用いる抗第VIII因子(FVIII/8)抗体の選別を行った上で、選別された抗体に最も優れた抗ヒトIgG抗体を選別する。

(倫理面への配慮)

ヒト検体の研究への使用にあたっては鹿児島大学医学部・歯学部附属病院臨床研究倫理委員会の審査を経て、その承諾事項を遵守して実行する。

C. 研究結果

後天性血友病A症例のスクリーニングに必須な凝固因子活性測定システムを導入し、開発に必要な検体の収集体制を構築しながら、イムノクロマト法やその前段階のELISAシステムに用いる抗体を選択中である。具体的には、

1. 後天性血友病患者の凝固第VIII因子比活性の測定体制の構築

凝固第VIII(8)因子活性については患者発生時に鹿児島大学病院の検査室にて速やかに測定できるように新規機器の導入(全自動血液凝固分析装置『コアグロン-180』)により可能となる体制を整えた。従って、本研究における患者検体の凝固第VIII(8)因子活性は自施設において容易に測定可能となった。

2. クロスミキシング試験体制の構築

後天性血友病患者発生時におけるクロスミキシング試験の体制を整えた。従来の測定法通りに即時法ならびにインキュベーション法の両測定法において患者血漿と健常人血漿の5種類の混合比(0:100、25:75、50:50、75:25、100:0)におけるAPTTの測定に加えて、凝固第VIII(8)因子の測定を容易に測定できる体制を整えた。

3. 抗第VIII因子(FVIII/8)抗体を測定するイムノクロマト法に用いる特異的抗体の作成

次の3段階で実験を進めるという方針を決定した。

- 1) まず、入手した抗ヒト第VIII因子(FVIII/8)抗体の中から、ヒト第VIII因子に対して特異性、感度の優れたものを複数選択する。特異性・感度の判定に関しては、ヒト由来第VIII因子製剤に対する親和性をimmunoblottingにて確認する。
- 2) 入手した抗体の性状の解析に関しては、正常血漿に対する抗体の影響を新規機器(全自動血液凝固分析装置『コアグロン-180』)により、APTTを始めとした凝固関連検査のパラメーター比較、第VIII因子阻害活性をはじめとした各凝固因子活性への影響の解析、第VIII因子活性を指標としたクロスミキシングテストによる第VI

II因子活性の阻害様式の解析等を行う。

- 3) 1)、2)の結果を総合的に判断してイムノクロマト法に用いる抗第VIII因子(FVIII/8)抗体の選別を行った上で、選別された抗体に最も優れた抗ヒトIgG抗体を選別する。

D. 考察

本年度は研究経費の交付通知が1月初めに届いたので、実質的な研究期間が短過ぎたため、試薬、機器を含めた研究体制の構築を完了するに留まった。

E. 結論

本年度は試薬、機器を含めた研究体制の構築までに留まり、具体的な研究成果を出すまでには至らなかった。

F. 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表
なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

抗VWF自己抗体検出イムノクロマト法に関わる研究開発

担当責任者 北島 勲 富山大学大学院医学薬学研究部臨床分子病態検査 教授

研究要旨

出血性疾患における後天性フォンビレブランド症候群（AVWS）の存在が注目されている。とりわけ、後天性VWDの病因に抗フォンビレブランド因子（VWF）自己抗体が関与している可能性が示唆されている。抗VWF自己抗体を迅速・簡便に検出できるイムノクロマトを開発する。その準備段階としてVWF検出に対する感度と特異度の高い抗原-抗体の組み合わせを検索した。その結果、市販の抗VWF抗体の一種類が最も高い特異性と感度を示した。また、本抗体を用いて擬似抗VWF自己抗体血清を作成し、抗VWF自己抗体検出のシミュレーションをウエスタンブロットで検討したところ良好な検出が再現できた。

A. 研究目的

出血性疾患における後天性フォンビレブランド症候群（AVWS）の存在が注目されている。とりわけ、後天性VWD病因に抗フォンビレブランド因子（VWF）自己抗体が多く症例で関与している可能性が示唆されているが、わが国においてその発症頻度等実態は明らかになっていない。そこで本研究では、抗VWF自己抗体の存在をスクリーニングできるイムノクロマト法を確立し、病院検査室で簡便かつ迅速に抗VWF自己抗体を検出できるP. O. C. testを開発することを目的とする。平成26年度は、抗VWF自己抗体検出イムノクロマト作成の準備段階として、VWFに対する特異抗体の検索を行い、その感度と特異度を解析し、最も良好な抗原-抗体の組み合わせを決定することを行った。

B. 研究方法

抗原は、血漿分画製剤コンファクトF（Astellas社）を利用した。抗体は、文献検索（PubMed等）により、国際的に汎用されているanti-VWF monoclonal antibody（MAb, Host:mouse, Species Reactivity:Human）を5種類検討した。2次抗体は、Anti-mouse IgG（GEヘルスケア）を用いてウエスタンブロットにて解析した。感度はVWF含有FVIII濃縮製剤を段階的に希釈してウエスタンブロットでの検出限界濃度を算出した。また、病院検査室における検査調整用使用済み廃棄プール血清に抗体を添加し擬似抗VWF自己抗体血清を作成し、抗VWF抗体検出感度をウエスタンブロットで検証した。（倫理面への配慮）

今年度の研究内容は、市販の抗原と抗体を用いたウエスタンブロット法での検討であり、動物実験やヒトゲノム・遺伝子関連研究、さらにヒトを対象とした臨床研究や疫学研究には該当しない。

（倫理面への配慮）

26年度初頭に山形大学医学部の倫理委員会の承認を得た。臨床検体の提供に当たっては、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た。

C. 研究結果

1. VWF含有FVIII濃縮製剤は、FVIII C 200単位＋VWF（Rcof）400単位/10mLであり、各抗VWF抗体によるウエスタンブロットで、MAb AとMAb Bが270Kdのシングルバンドを検出した。MAb Cでは、260Kdと180Kdの明瞭な2本のバンドが検出された。
2. VWF含有FVIII濃縮製剤の段階希釈による各抗体の検出感度解析では、MAb A, MAb B, MAb Cの3つの抗体がVWF含有FVIII濃縮製剤1000倍希釈（VWF 0.4unit）まで検出可能であった。
3. プール血清中に抗VWF抗体（MAb A）を添加して作成した擬似抗VWF自己抗体血清を1次抗体としてウエスタンブロットを行った結果、抗体濃度100ng/mL in serum, VWF 0.02 unitの条件まで検出できた。

D. 考察

ヒトVWFを検出する抗体は多数市販されているが、ウエスタンブロットによる抗原反応の特異性は多様であり、感度も2桁以上差があることが明らかになった。われわれが検討した中では、コンファクトFを抗原にした場合、MAb Aが最も高い特異性と感度を示した。また、本抗体を用いて作成した擬似抗VWF自己抗体血清で自己抗体検出のシミュレーションをウエスタンブロットで検討したところ良好な検出結果が再現できた。ウエスタンブロット法とイムノクロマト法では反応系が異なるため、今回検索した抗原-抗体の組み合わせがそのままイムノクロマト法へ適応できると判断できないが、ELISA作成などP. O. C. testに向けた準備が一步進んだと思われる。

E. 結論

抗VWF自己抗体検出イムノクロマト作成の準備段階として、VWFに対する特異抗体の検索を行い、その感度と特異度の高い抗原-抗体の組み合わせとして、MAb Aが最も高い特異性と感度を示した。また、本抗体を用いて作成した擬似抗VWF自己抗体血清で自己抗体検出のシミュレーションをウエスタンブロットで検討したところ良好な検出結果が再現できた。