

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患等政策研究事業（難治性疾患政策研究事業））  
分担研究報告書

自己免疫性出血症治療の「均てん化」のための実態調査と「総合的」診療指針の作成  
に関する研究

分担研究課題 自己免疫性出血病XIII/13症例の精査と  
抗XIII因子自己抗体の経過追跡

研究分担者 惣宇利 正善 山形大学医学部 准教授

**研究要旨**

本年度、18例のAH13疑い症例を精査し、7例のAH13を同定した。AH13症例4例のF13抗原及び抗F13抗体の推移について、2例では年を超えて低レベルに抗F13抗体が持続し、また、自己抗体が検出感度以下に減少したにもかかわらずF13抗原が回復しない例もあった。第V因子インヒビター疑い症例1例について、抗V因子自己抗体の検出に成功した。無フィブリノゲン血症疑い症例から、フィブリノゲン 鎖遺伝子の変異を同定した。

**A．研究目的**

自己免疫性出血病XIII/13（AH13）は、第XIII因子（F13）に対する自己抗体を生じた結果血中のF13抗原・活性が著しく低下し、重篤な出血を呈する後天性疾患である。抗F13自己抗体には、不活性型のAサブユニット（F13-A）と結合し活性化を阻害するAa型、活性化したF13-Aを認識し触媒活性を阻害するAb型、Bサブユニット（F13-B）に結合しクリアランスを促進するB型が存在することを我々はこれまでに明らかにしている。AH13の確定診断にあたっては、抗F13-A抗体の検出にAMED事業で開発されたイムノクロマト法について、分担研究者により良好な成績が示されているものの、抗F13-B抗体に対するイムノクロマト法は現在も実用段階には至っておらず、ELISAによる各サブユニットの定量、活性の5段階混合試験、フィブリン架橋反応、抗F13自己抗体のドットプロット解析といった一連の精査が不可欠である。昨年度、F13インヒビターの検出に向けた新しい活性測定法をAMED事業で別途開発したので、その感度と信頼性を実証する必要がある。

本年度は、AH13を疑われた18例について、新規活性測定法を加えた精査を行い、また、4例のAH13症例についてF13抗原及び抗F13自己抗体の推移を検討した。また、第V因子（F5）インヒビターが疑われた症例が現れたことから、抗F5抗体の検出を検討した。さらに、症例のスクリーニングにおいて無

フィブリノゲン（Fbg）血症が疑われた症例について、遺伝子変異の検索を行った。

**B．研究方法**

F13各サブユニットおよび異種四量体はELISAにより定量した。5段階混合試験は、昨年度にAMED事業で開発した<sub>2</sub>-プラスミンインヒビター（<sub>2</sub>-PI）へのビオチン標識アミン取り込みをELISAで測定する活性測定法で行った。フィブリン架橋反応について、血漿にトロンピンとカルシウムを加えて生じたc lotをSDS-PAGE解析した。抗F13抗体は、組換え体F13-A、F13-Bを用いたDot blot法により検出し、また、ELISA法により定量した。

抗F5自己抗体について、Protein A-Sepharoseを用いて症例血漿からIgG分画を調製し、精製F5タンパク質を用いたdot blot法にて検出を検討した。

無Fbg血症疑い症例のFbgの3種類の遺伝子（FGA, FGB, FGG）について、PCR増幅してその塩基配列を決定した。

（倫理面への配慮）

本研究は、山形大学倫理委員会の承認を得て行った。

**C．研究結果**

[AH13疑い症例の精査] AH13疑い18例のうち7例

について、dot blot 解析にて抗F13-A抗体陽性を認め、新規活性測定法による5段階混合試験で著しい阻害を検出したことから、AH13と診断された。別の2例にはdot blot解析にてF13-Bと反応するイムノグロブリンが検出されたが、そのうち1例について、F13-A抗原量が検出感度以下であったことから洗浄血小板のF13-Aを検討したところ、immunoblot解析で検出を認めず先天性F13-A欠乏症が強く示唆された。

[AH13症例の経過追跡] 過去にAH13(Aa型)と診断された4例について、F13抗原および抗F13-A抗体の経過を測定した。1例は診断後5年経過しても結合型抗F13-A抗体が残存していた。1例は診断5ヶ月後に、別の1例は3年半後の血漿に結合型抗体が検出されていたものの、F13抗原量の回復傾向が認められた。残る1例について、1年で抗F13-A自己抗体は検出感度以下に低下していたが、F13抗原は低レベルのままであった。この症例の洗浄血小板内F13-Aは健常者と同レベル存在しており、先天性欠乏症の可能性は低いと考えられた。

[抗F5自己抗体検出の検討] 1例の症例血漿について、交差混合試験によりF5インヒビターが強く疑われた。ニトロセルロース膜にプロットした精製F5抗原を希釈血漿と反応させた場合、正常血漿においても抗F5抗体について偽陽性となった。そこでProtein A-SepharoseによりIgG分画を調製して検討したところ、正常血漿からのIgG分画ではF5との反応を認めず、症例のIgG分画で強い陽性シグナルが検出された。

[無Fbg血症の遺伝子解析]

班研究調査の過程で無Fbg血症が疑われた症例について、Fbg遺伝子(FGA, FGB, FGG)の塩基配列を解析した。FGAのイントロンCからエクソンIVにかけて、大規模な欠失がホモ接合性に同定された。FGB, FGGには遺伝子変異を認めなかった。FGA欠失は母親にもヘテロ接合性に確認されたことから、先天性無Fbg血症であると判断された。

## D. 考察

昨年度に別途AMED事業で開発した活性測定法を本年度の精査に導入し、7例にF13インヒビターを検出した。この7例ともに、Dot blot解析及び抗F13-Aイムノクロマト法のいずれでも抗F13-A抗体陽性と判定されており、的確なAH13診断を裏付けている。過去の症例も合わせて検討したところ、Aa型、Ab型ともに1:1交差混合試験で50%以上の阻害率を示すこと、ROC試験で極めて良好な感度および特異性を表していることから、F13インヒビターの検出に有用であると考えられる。

現在、本法の免疫クロマト化も実現可能であることを実証しており、別途AMED事業で開発を進めている。

本年度精査した症例のうち2例に抗F13-B抗体が

陽性に検出されたが、F13-B抗原量の著しい低下は認めず、活性阻害も検出されていない。過去に抗F13-B抗体陽性に検出された症例のほとんどでF13-B抗原の著しい低下を認めておらず、イムノプロット法ではしばしば健常人血漿でも抗F13-B抗体が陽性に検出されていることから、本法では疾患原因であるか否かの判断は極めて難しい。本年度に抗F13-B抗体が陽性に検出された2例のうち1例は、血漿のみならず血小板内のF13-Aも検出されなかったことから先天性F13-A欠乏症の可能性が極めて高い。後天性F13欠乏症疑いで精査した結果先天性F13-B欠乏症と同定された症例もあり、常に先天性欠乏症も考慮すべきである。

AH13(抗F13-A抗体陽性)の多くの症例では、低レベルの抗体を保持しながらもF13異種四量体の回復が認められている。昨年度にAH13と診断された症例について、抗F13-A自己抗体は検出感度以下に低下していたが、F13-Aおよび異種四量体は正常の20%と低レベルのままであった。洗浄血小板では健常者と同レベルのF13-Aが検出されたことから、先天性欠乏症の可能性は低いと考えられる。細胞外放出の障害、あるいは分子異常によるF13-Bとの結合障害も考えられ、解析を続ける必要がある。

本年度、本研究では初めて抗F5インヒビター症例が同定された。抗F5抗体の検出について、希釈血漿では正常血漿でも陽性に検出されたことから、Protein A-Sepharoseで調製したIgG分画で特異的な自己抗体の検出が可能となった。しかしながら、Protein Aで回収されないアイソタイプの抗F5自己抗体が存在する可能性もあり、F5抗原の安定入手を含め、血漿もしくは血清での抗F5自己抗体の検出法を検討する必要がある。

AH13疑い症例の精査でしばしばフィブリ(ノゲン)が低下した例に遭遇する。本年度は無Fbg血症症例が遺伝子解析で確定診断された。同定された欠失は先に日本人症例で報告があり、日本人の創始者変異である可能性がある。Fbg欠乏についても的確な抽出・診断が望まれる。

## E. 結論

本年度、新たに7例のAH13症例を同定し、また1例の先天性F13-A欠乏症を見出した。抗F13抗体が検出感度以下に低下してもF13抗原の回復が認められない症例が存在した。F5インヒビター症例について、抗F5抗体の検出に成功した。無Fbg血症例から遺伝子変異を同定した。

## F. 健康危険情報

特になし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1) Tsuda M, Kiyasu J, Sugio K, Hidaka D, Ikeda

M, Fujioka E, Souri M, Osaki T, Yufu Y, Ichinose A. Spontaneous splenic rupture accompanied by hepatic arterial dissection in a patient with autoimmune haemorrhaphilia due to anti-factor XIII antibodies. Haemophilia. 2016, 22:e314-7.

- 2) Souri M, Mokuda S, Inanami H, Osaki T, Takasugi K, Ichinose A. Non-autoimmune combined factor XIII A and B subunit deficiencies in rheumatoid arthritis patients treated with anti-interleukin-6 receptor monoclonal antibody (tocilizumab). Thromb Res. 2016, 140:100-5.
- 3) Kojima M, Ichinose A, Souri M, Osaki T, Kawai H, Amaki J, Numata H, Miyamoto M, Ogiya D, Tsuboi K, Ogawa Y, Ozawa S, Ando K. Successful bypass surgery for esophageal carcinoma under adequate factor XIII/13 replacement therapy in a case of intractable autoimmune hemorrhaphilia due to anti-Factor XIII/13 antibodies. Int J Hematol. 2016, 103:341-7.

#### **H . 知的財産権の出願・登録状況**

( 予定を含む。 )

1. 特許取得  
F13活性測定法 ( 出願中 )
2. 実用新案登録
3. その他