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 (AH13) と後天性血友病 A (AHA) の自己抗体検出および自己免疫性後天性フォンヴィルブランド病 (AVWD) の自己抗体検出法の検討

研究分担者　尾崎 司　　山形大学医学部　助教

研究要旨

自己免疫性出血病XIII/13 (AH13) 疑い15症例についてイムノクロマト法を用いて確定診断を行い、新たに7例を同定した。また、後天性血友病A (AHA) 疑い7症例について市販のELISA キットを用いて確定診断を行い、新たに4例を同定した。一方、自己免疫性後天性フォンヴィルブランド病 (AVWD) 疑い5症例についてイムノクロマト法とELISA法を用いて自己抗体の検出を行い、いずれも3例陽性判定が得られた。しかし、いずれもフォンヴィルブランド因子 (VWF) を固相化して遊離の自己抗体を検出する方法で抗VWF自己抗体-VWF複合体は認識しない。今後は、抗VWF抗体を作製し、抗VWF自己抗体-VWF複合体を検出する測定系を確立する予定である。

A．研究目的

自己免疫性後天性凝固因子欠乏症は自己免疫性出血病XIII/13 (AH13)、後天性血友病A (AHA)、自己免疫性後天性フォンヴィルブランド病 (AVWD) からなる難治性出血性疾患である。それぞれ第XIII/13因子 (F13) 、第VIII/8因子 (F8)、フォンヴィルブランド因子 (VWF) に対する自己抗体が原因で出血傾向をきたす疾患である。これらの自己免疫性後天性凝固因子欠乏症の総合的な診断基準・重症度分類、診療指針等の作成を最終的な目的として、まず実態把握のためにAH13疑い15症例とAHA疑い7症例についてそれぞれイムノクロマト法、あるいはELISA法によって確定診断を行った。また、AVWD疑い5症例についてイムノクロマト法、およびELISA法による自己抗体検出法について検討を行った。

B．研究方法

<u>イムノクロマト法による抗 F13 自己抗体の検出</u>

イムノクロマト法は抗 F13A サブユニット (F13-A) モノクローナル抗体を塗布したストリップを用いた。希釈血漿、洗浄液、金コロイド標識抗ヒト IgG 抗体希釈溶液を順次展開した (直接法)。陽性コントロールの吸光度を 1 とした時の吸光度 0.18 をカットオフ値に設定し、判定を行った。F13-A 抗原量が極端に少ない症例での偽陰性を避けるために、健常人血漿と 37℃で 5 分間混合後の検体についてもイムノクロマト法を行った (混合法)。

<u>ELISA キットによる抗 F8 自己抗体の検出</u>

市販の ELISA キットを用いて遊離の抗 F8 自己抗体量を測定し、説明書に従って自己抗体の有無を判定した。

<u>抗 VWF 自己抗体の検出</u>

精製 VWF を用いて遊離の抗 VWF 自己抗体量の測定を行った。

イムノクロマト法は VWF を塗布したストリップを用いて AVWD 疑い症例 5 例、および健常対照 4 例について検討を行った。希釈血漿、洗浄液、金コロイド標識抗ヒト Ig 抗体希釈溶液を順次展開後、テストラインの強度を自動読み取り装置で数値化して、健常対照 4 例の吸光度の平均+2SD をカットオフ値に設定して判定を行った。

ELISA 法は VWF を固相化した 96 ウェルプレートを用いて AVWD 疑い症例 5 例、および健常対照 40 例について検討を行った。ブロッキング後、希釈血漿、HRP 標識抗ヒト Ig 抗体を順次反応し、TMB で発色を行って 450 nm の吸光度を測定した。健常対照

40 例の吸光度の平均+2SD をカットオフ値に設定して判定を行った。
（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

AH13 の確定診断

AH13 疑い 15 症例について直接法、混合法で測定を行ったところ、1 例は混合法でのみ陽性、6 例は直接法、混合法いずれも陽性、8 例は直接法、混合法いずれも陰性であった。

AHAの確定診断

AHA疑い7症例について市販のELISAキットを用いて測定を行ったところ、4例は陽性、3例は陰性であった。

抗VWF自己抗体の測定

イムノクロマト法ではAVWD疑い5症例のうち3例陽性、2例陰性判定であった。また、健常対照は4例すべて陰性判定であった。

一方、ELISA法でもAVWD疑い5症例のうち3例陽性、2例陰性判定であった。また、健常対照は40例のうち2例陽性判定、38例陰性判定であった。

D．考察

AH13 疑い 15 症例のうちイムノクロマト陽性だった 7 例は、抗 F13-A 自己抗体検出のための ELISA 法、ドットブロット法でも陽性だったので、迅速診断に有用であると考えられる。しかし、抗 F13-B 自己抗体陽性の 1 例は検出できなかった。抗 F13-B 自己抗体検出イムノクロマト法は別途 AMED 事業で開発中であり、これが使用できるようになると、より効率良く検出が可能になると考えられる。

AHA 疑い 7 症例のうち、4 例は自己抗体が検出されたが、3 例は検出されなかった。この 3 例遊離の抗 F8 自己抗体は存在しないと考えられるが、抗 F8 自己抗体-F8 複合体については存在する可能性も考えられる。

抗VWF自己抗体検出については症例を増やして検証する必要があるが、健常対照のイムノクロマト法は3例すべて陰性、ELISA法は40例中38例陰性だったことから無病正診率は高いといえる (100%と95%)。一方、AVWD疑い5症例はイムノクロマト法、ELISA法いずれも3例陽性、2例陰性だったことから感度を向上させる必要があると考えられる。今回用いた測定系は遊離抗VWF自己抗体を検出するもので、抗VWF自己抗体-VWF複合体は検出しないことから、今後は抗VWF自己抗体-VWF複合体を検出する系の確立を予定している。

E．結論

AH13 疑い症例の自己抗体の検出については現行のイムノクロマト法が有用であると考えられる。また、現在 AMED 事業で開発中の抗 F13-B 自己抗体検出用イムノクロマト法も使用できるようになるとより効率的に迅速診断が可能になる。

遊離の抗 F8 自己抗体検出には市販の ELISA キットが有用であると考えられるが、今後は抗 F8 自己抗体-F8 複合体を検出できる測定法を確立する必要がある。

遊離の抗 VWF 自己抗体検出は今回確立したイムノクロマト法と ELISA 法で可能であると考えられる。今後は、抗 VWF 自己抗体-VWF 複合体を検出できる測定法を確立する予定である。

F．健康危険情報

特になし。

G．研究発表

1. 論文発表

原著論文

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-e317.
2. Ogawa Y, Yanagisawa K, Souri M, Mihara M, Naito C, Takizawa M, Ishizaki T, Mitsui T, Handa H, Osaki T, Nojima Y, Ichinose A. Successful Management of a Patient with Autoimmune Hemorrhaphilia due to Anti-Factor XIII/13 Antibodies Complicated by Pulmonary Thromboembolism. *Acta Haematol.* 2017; **137**:141-147.

2. 学会発表

1. 後天性血友病 A (自己免疫性第 VIII/8 因子欠乏症) における抗第 VIII/8 因子自己抗体測定の意義, 口頭, 尾崎　司, 惣宇利　正善, 小川　孔幸, 小林　桂子, 平瀬　伸尚, 家子　正裕, 橋口 照人, 山口 宗一, 一瀬　白帝, 東京都港区芝浦 (北日本後天性血友病診療ネットワーク学術集会・ 東北止血血栓研究会 合同学術集会), 2016/10/12, 国内.
2. Anti-factor VIII/8 (FVIII/8) autoantibodies in acquired hemophilia A (autoimmune FVIII/8 deficiency). 口頭, 尾崎　司, 惣宇利　正善, 小川　孔幸, 小林　桂子, 平瀬　伸尚, 家子　正裕, 橋口 照人, 山口 宗一, 一瀬　白帝, 横浜市 (第 78 回日本血液学会学術集会), 2016/10/15, 国内.
3. イムノクロマト法を用いた自己免疫性出血病 XIII/13 と出血性後天性 XIII/13 因子欠乏症の迅速鑑別診断, 口頭, 尾崎　司, 杉山　大輔, 高岡　勇輝, 曲　泰男, 山口　宗

一, 橋口　照人, 北島　勲, 惣宇利　正善, 一瀬　白帝, 東京都千代田区大手町 (第 17 回 TTM フォーラム), 2017/3/4, 国内.

H. 知的財産権の出願・登録状況

（予定を含む。）