

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、  
ならびに自己免疫性第 V/5・第 X/10 因子欠乏症の自己抗体検出

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、5 例の自己免疫性出血病 XIII/13 (AH13) 疑い症例を精査し、2 例の AH13 を同定した。1 例について、FXIII/13 に対する抗体は陰性であるものの、トロンビン作用の阻害が疑われた。4 例の自己免疫性第 V/5 因子欠乏症について、3 例に抗 V/5 因子抗体を検出した。また、後天性第 X/10 因子欠乏症例 1 例について、第 X/10 因子に対する自己抗体を検出した。

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、不活性化型の 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。一昨年度、F13 インヒビターの検出に向けた新しい活性測定法を開発し、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 5 例について、新規活性測定法を加えた精査を行っ

た。また、第 V 因子 (F5) インヒビターが疑われた症例が 4 例、第 X 因子 (F10) インヒビターが疑われた症例 1 例が現れたことから、抗 F5、抗 F10 抗体の検出を検討した。

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、一昨年度に開発した  $\alpha_2$ -プラスミンインヒビター ( $\alpha_2$ -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、血漿にトロンビンとカルシウムを加えて生じた clot 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 タンパク質を固相化したプレートを用いた ELISA により、F5 と反応する IgG を検出した (固相法)。また、あらかじめ精製 F5 と IgG 分画を液相でインキュベートした後、マウス抗 F5 抗体をコートしたプレートに F5 とともに結合する IgG を検出した (液相法)。

抗 F10 自己抗体は、精製 F10 タンパク質を固相化したプレートに希釈した血漿を反応させて検出した。

(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 5 例のうち、1 例は 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 1 例は dot blot 解析では抗 F13 抗体が検出されなかったものの ELISA 法で抗 F13-A 抗体陽性を認め、5 段階希釈試験で強い阻害を示したことから AH13 と判断された。

別の 1 例について、F13-A 抗原量に対する比活性が低いにもかかわらず、5 段階希釈試験で阻害を認めず、抗 F13 抗体も陰性であった。トロンビン処理後の血漿についてフィブリノゲン B 鎖の切断の遅延を認め、F13-A 活性化ペプチドの切断の障害も Western blot 解析で確認された。正常血漿との混合試験で活性化ペプチドの切断が阻害されること、患者血漿をより高濃度のトロンビンで処理した場合に F13 比活性が正常レベルに回復することから、トロンビン活性の阻害(インヒビター)が強く示唆された。

[自己免疫性 F5 欠乏症の抗 F5 自己抗体検出] F5 インヒビターの存在が強く疑われた 4 例について、血漿から IgG 分画を調製し、dot blot 解析を行ったものの、昨年度抗 F5 抗体陽性が確認された症例では抗 F5 IgG が検出されたにもかかわらず、4 例いずれも IgG が検出されなかった。精製 F5 タンパク質を用いた固相法による ELISA を行なったところ、2 例に抗 F5 IgG の存在が確認された。液相法での ELISA も検討したところ、固相法で陰性であった 1 例に F5 と結合する IgG が検出された。

[自己免疫性 F10 欠乏症の抗 F10 抗体検出] F10 インヒビターの存在が疑われた

1 例について、精製 F10 を用いた固相法 ELISA により抗 F10 IgG が検出された。本症例の抗 F10 IgG は、2 ヶ月後に再読された血漿ではほぼ検出不可能なレベルにまで抗 F10 IgG が消失していた。

### D. 考察

一昨年度に開発した活性測定法により、Dot blot で抗体を検出できなかった症例についても強い阻害を検出することができ、ELISA 法で抗 F13-A 抗体を確認するに至った。これまでも、Dot blot で陰性～弱陽性の症例を検出しており、あらためて、的確な AH13 診断に有効であることが示された。本症例での抗 F13-A 抗体は固相法よりも液相法 ELISA でより強く検出されており、Dot blot と ELISA での検出力の相違は、液相と固相とでの反応性の違いを反映している可能性がある。

本年度、F13 抗体が陰性でありながら、F13 の活性化に障害を示し、トロンビンインヒビターの存在が疑われる症例に遭遇した。過去にはフィブリン形成が阻害された症例も経験したが、本症例ではフィブリノーゲン B 鎖の切断も部分的に障害されているものの、フィブリンクロットの形成には遅延を認められなかった。(プロ)トロンビンに対する抗体の検出も試みたが、健常人コントロールでも陽性に検出されるなど、信頼できる検出方法を確立できていない。今後、合成基質を用いた直接的なトロンビン活性測定によるインヒビター検出を検討する必要がある。

今年度、新たに抗 F5 抗体を有する症例 3 例が確認された。昨年度に同定した症例と比べ、dot blot では抗体を検出することができず、固相法の ELISA でも反応性は低かった。3 例のうち一例は固相法では陰性であるものの液相法では陽性に認められ、逆に、昨年度の症例では液相法では著しく反応性が低下するなど、症例(抗体)による液相と固相との反応性の違いは、抗体を検出する上で考慮すべき問題である。また、血漿・血清で直接検出することは今のところ不可能であり、

新たな抗体検出法を検討する必要がある。

本研究事業では初めて F10 に対する自己抗体を有する症例が確認された。本症例の抗 F10 抗体は直接血漿から検出でき、抗 F5 抗体と比べて容易であった。しかしながら、抗 F5 抗体と同様の液相と固相との反応性の問題を生じる可能性は十分予想され、今後の注意が必要である。

2. 実用新案登録  
なし
3. その他  
なし

#### E. 結論

本年度、新たに 2 例の AH13 症例を同定し、また 1 例のトロンビンインヒビター疑い症例を見出した。F5 インヒビター症例 3 例について、抗 F5 抗体の検出に成功した。F10 インヒビター症例について、抗 F10 抗体を検出した。抗体の検出に際して、液相と固相との反応性の違いを考慮すべきであることを指摘した。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1) Arishima H, Neishi H, Kikuta KI, Morita M, Hosono N, Yamauchi T, **Souri M**, Ichinose A. Lobar Hemorrhage Induced by Acquired Factor XIII Deficiency in a Patient with Cerebral Amyloid Angiopathy. J Stroke Cerebrovasc Dis. 2017, 26:e203-e205.

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.

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得  
なし