

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 血液凝固関連von Willebrand因子、血液凝固第XIII/13因子Bサブユニットおよび第V/5因子に  
対するモノクローナル抗体の作製

研究分担者 横山 智哉子 山形大学大学院理工学研究科 助教

研究要旨

自己免疫性von Willebrand因子（VWF）欠乏症、自己免疫性凝固第XIII/13因子（F13）欠乏症および自己免疫性凝固第V/5因子（F5）欠乏症の診断および治療効果判定には、それぞれの因子（抗原）や自己抗体の検出が不可欠である。本年度は、これらの検出に用いる、VWF、F13-BサブユニットおよびF5に対するモノクローナル抗体を作製した。また、作製したモノクローナル抗体を用いたELISA法により、正常血漿および患者血漿中のVWF、F13-Bおよび抗F13-B自己抗体を測定した。

A．研究目的

自己免疫性VWF欠乏症（AVWD）、自己免疫性F13欠乏症（AH13）および自己免疫性F5欠乏症（AH5）の診断および治療効果判定には、それぞれの抗原や自己抗体の検出が不可欠である。これらの診断基準・重症度分類、診療指針等の作成に基準となる有用なモノクローナル抗体の作製と安定供給を目的とした。

B．研究方法

モノクローナル抗体の作製

リコンビナントVWFタンパク質、リコンビナントF13-Bサブユニットタンパク質およびヒト精製F5タンパク質をそれぞれラットに免疫し、腸骨リンパ節法により、モノクローナル抗体産生ハイブリドーマ細胞を樹立した。作製したモノクローナル抗体産生ハイブリドーマ細胞クローンのスクリーニングは、ELISA法およびウェスタンブロット法を用いた。

抗原および自己抗体の検出

作製したラットモノクローナル抗体および市販の抗体を用いたELISA法にて、抗原および自己抗体の検出をおこなった。

（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こなった。

C．研究結果

抗VWFモノクローナル抗体の作製とELISA法による抗原の検出

樹立したモノクローナル抗体産生ハイブリドーマ細胞のスクリーニングにより、内在性VWFを認識するラットモノクローナル抗体を3クローン得た。また、樹立したモノクローナル抗体を2種用いたサンドウィッチELISA法により、正常血漿および患者血漿中のVWF抗原の検出が可能であった。

抗F13-Bモノクローナル抗体の作製とELISA法による抗原および自己抗体の検出

樹立したモノクローナル抗体産生ハイブリドーマ細胞のスクリーニングにより、内在性F13-Bを認識するラットモノクローナル抗体を21クローン得た。また、樹立したモノクローナル抗体と市販のウサギポリクローナル抗体を用いたサンドウィッチELISA法により、正常血漿および患者血漿中のF13-B抗原の検出が可能であった。さらに、作製したモノクローナル抗体を捕捉抗体として用いたELISA法により、患者血漿中の自己抗体の検出が可能であった。

抗F5モノクローナル抗体の作製

樹立したモノクローナル抗体産生ハイブリドーマ細胞のスクリーニングにより、内在性F5を認識するラットモノクローナル抗体を22クローン得た。

D．考察

抗VWFモノクローナル抗体および抗F13-Bモノクローナル抗体は、正常および患者血漿中の抗原の検出に有用であり、抗F13-Bモノクローナル抗体は患者血漿中の自己抗体の検出も可能であった。したがって、これらの抗体はAVWD、AH13およびAH5の診断および治療効果判定に有用であると考えられる。現在、抗VWFモノクローナル抗体による自己抗体の検出の条件検討および抗F5モノクローナル抗体を用いたELISA法の検討をおこなっている。

E．結論

本年度は、ヒト血漿中の内在性の因子を認識するモノクローナル抗体を作製し、抗原および自己抗体の検出のため、これらの抗体を用いたELISA法を確立した。これらはモノクローナル抗体であり、半永久的に均一な品質の抗体が安定供給できる。したがって、正確で確実な診断および治療効果判定において、これらのモノクローナル抗体は

非常に有用であると考えられる。

F . 健康危険情報  
なし

G . 研究発表  
1. 論文発表  
なし

2. 学会発表  
なし

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

2. 実用新案登録  
なし

3.その他

なし