

後天性血友病 A 診断及び治療に関する検討

研究分担者 家子 正裕 北海道医療大学歯学部 教授

研究要旨

AHAと診断において最も難しい鑑別診断は、出血傾向も有するループスアンチコアグラント(LA)、特にLA-hypoprothrombinemia syndrome (LAHPS)である。その鑑別に有用であるのはAPTT交差混合試験(cross-mixing test: CMT)である。CMTの検査方法は標準化されておらず、今回標準化を試みた。即時反応(incubation時間なし)では患者血漿0, 10, 20, 50, 100%と5ポイント、遅延反応(2時間incubation)では患者血漿0, 50, 100%の3ポイントでの検討が有用であることを確認した。LAは遅延反応の10, 20%に表示されやすく、またAHAでは50%の混合血漿で即時反応と遅延反応に差異を認めることが確認された。また、AHAの免疫抑制療法中止時期は、Bethesda法による凝固第VIII因子インヒビター(FVIII-INH)活性の消失(<1.0 BU/mL)のみで判断せずに、ELISA法(Zymutest Anti-VIII IgG Mono Strip; Hyphen, France)によるインヒビター蛋白量の低下を確認する必要があることが示唆された。

A. 研究目的

後天性血友病A(AHA; 凝固第VIII因子自己抗体)の正確な診断方法および有効な治療方法の確立のため、AHA診断における交差混合試験(クロスミキシングテスト)標準化およびAHA治療終了時の判定における抗第VIII因子抗体量の測定意義を確認する。

B. 研究方法

1. 後天性血友病 A(AHA) 治療終了時の判定における抗第 VIII 因子抗体 (FVIII-INH) 量測定意義

1) AHA患者血漿: 当科に検査依頼のあったAHA患者血漿をサンプルとした。

2) FVIII-INH の測定: FVIII-INH 活性をBethesda法で、FVIII-INH(蛋白)量をELISA法(Zymutest

Anti-VIII IgG Mono Strip; Hyphen, France)で測定した。活性は<1.0 BU/mL、また蛋白量は<12.0 AU/mLをインヒビター陰性とした。

3) 凝固因子活性: 目的凝固因子の欠乏血漿(Sysmex, Kobe)を用いて既存の方法に従って測定した。

2. HA診断における交差混合試験(クロスミキシングテスト)の標準化

平成29年度当科に検査依頼あった症例の2例がLupus anticoagulant hypoprothrombinemia syndrome (LAHPS)、およびその類似疾患(LAHPS like syndrome: LLS)であった。LAHPS

及び LLS が時に出血症状をきたすこと、見かけ上FVIII 活性低下や FVIII-INH 活性を示すことを考えれば、AHAとLA 症例の鑑別は極めて難しい。サンプルを希釈処理し活性を測定し、希釈倍数で掛け戻しても区別つかない例も少なくない。交差混合試験(クロスミキシングテスト:CMT)が唯一判別可能と思われる。しかし、CMTは標準化されておらず、患者血漿とコントロール血漿比率やポイント数など明確でない。そこで、CMTの標準化を試みた。

1) AHA患者血漿: 当科に検査依頼のあったAHA患者血漿をサンプルとした。

2) 交差混合試験 (CMT)

(1) APTT試薬: APTT-TC, APTT-TC-SLA(以上Sysmex社), コアグピアAPTT-N(積水メディカル社), PTT-LA (Roche社)を用いた。

(2) コントロール血漿の検討: 日本ミキシングテスト研究会の検討結果より Precision Biological社製コントロール血漿、および健常人10名より作成したHome-made血漿も用いた。

(3) 患者血漿混合比およびポイント数の検討: 患者血漿0, 10, 20, 50, 80, 90, 100%の混合血漿を作成し、即時に測定する即時反応と2時間37°Cインキュベーション後APTTを測定する遅延反応を行なって、変化率(=実測APTT/予想された混合血漿のAPTT)を求めて、凝固因子欠損症(血友病A)、AHAおよびLAで最も有用な混合比を求めた。

(4) 判定方法: 視覚的判定方法(上に凸および

直線はインヒビターパターン、下に凸は因子欠損パターン)と判断した。

(倫理面への配慮)

本研究は、北海道医療大学歯学部倫理委員会で承認されている。

C. 研究結果

1. 後天性血友病 A(AHA)治療終了時の判定における FVIII インヒビター量の測定意義

当科に AHA の検査依頼があった 5 例、17 検体について、Bethesda 法による FVIII-INH 活性と ELISA 法による FVIII-INH 蛋白量を測定し比較した(表 1)。5 例中 1 例(H29-4)において、FVIII-INH 活性が消失した(<1.0 BU/mL)にもかかわらず FVIII 活性低下が持続し、FVIII-INH 蛋白量は陽性であった。軽度だが出血症状も出現しており、治癒とは言えない状況であった。

Table.1 2017年度 北海道 AHA network 依頼サンプルのVIII-INH

Case	sample-No	age	Sex	Day after Therapy (day)	Underlying Dis	VIII:C	VIII-INH		
							activity(BU)	quantity (AU)	
						>60%	<1.0 BU/mL	<24 AU/mL	
H29-1	1	81	F	0	unknown	18.2	14.7	68.2	
	2			7		21.6	7.2	48.8	
	3			14		28.2	7.8	42.5	
	4			28		40.4	0.8	18.4	治癒
H29-2	1	66	F	0	Brest Cancer	8.8	56.1	122.2	
	2			14		7.8	72.8	144.8	死亡
H29-3	1	67	M	0	DM, Hyperlipidemia	18.6	3.2	44.2	
	2			7		24.5	2.2	31.2	予後不明
H29-4	1	86	F	0	unknown	12.7	121.8	865.6	
	2			7		13.6	86.6	791.2	
	3			28		12.5	65.1	306.6	
	4			49		18.2	8.3	106.6	
	5			64		22.4	0.6	48.2	再発?
H29-5	1	76	M	0	RA ?Hypertension	8.3	66.3	256	
	2			14		10.2	40.8	188.3	
	3			28		18.4	8.6	50.8	
	4			42		33.1	0.6	10.6	治癒

(2017.4/1~2018.2/28)

2) 1) で用いた抗第 VIII 因子抗体量測定 ELISA kit 性能評価

Zymutest Anti-VIII IgG Mono Strip (Hyphen) で検出される VIII-INH 性状を調べることを目的に、本 ELISA kit 性能評価を行なった。表 H29-4 患者血漿(0 日目+64 日目)を G200-Gel filtration column を用いて分子量で分画した。各 fraction を上記 ELISA で測定し、FVIII-INH 出現を確認した。分子量約 150 Kd 付近に大ピーク(①ピーク)を、約 500 Kd 付近に微小ピーク(②ピーク)を認めた。①ピークは IgG(おそらく free FVIII-INH)で、②ピークは FVIII-FVIII-INH 複合体である可能性が示唆された。

3) AHA 診断における交差混合試験(クロスミキシングテスト)の標準化

AHA と判別が難しいのは LA であり、LA の CMT における特徴を確認した。患者血漿 10 および 20% 混合血漿で上に凸となる傾向が強く、LA の検出には患者血漿 10 および 20% 混合血漿が重要であった。一方、AHA では混合血漿のインキュベーション時間

(0 分と 120 分)が重要で、AHA を最も顕著に示したのは患者血漿 50%の混合血漿であった。

CMT は視覚的に判断するが、最も判断が難しいのは LA パターンで、同じ LA サンプルでも結果が直線になる試薬と上に凸になる試薬が存在した。視覚的判断上は上に凸が明確である方が有用であり、APTT CMT で使用を推奨される APTT 試薬は LAM 感受性の高い試薬(APTT-TC SLA やコアグピア APTT-N)であった。

また、コントロール血漿としてリン脂質残存血漿を用いると LA パターンが不明瞭になることより、残存血小板数の少ないホームメイドコントロール血漿が最も有用であった。しかし、市販されているコントロール血漿も良好な結果であり、PB 社製のコントロール血漿も推奨できた。

D. 考察

1. 後天性血友病 A(AHA)治療終了時の判定における FVIII インヒビター量の測定意義

AHA 症例で、FVIII-INH の活性と蛋白量に差があった症例では FVIII に対するクリアランス抗体型 FVIII-INH が残存しており、FVIII 活性低下を引き起こしている可能性が示唆された。AHA における免疫抑制療法の中止は FVIII-INH 蛋白量の消失を ELISA にて確認した上で行うことが推奨される。

2. 抗第 VIII 因子抗体量測定 ELISA kit 性能評価

保険等結果より、FVIII-INH のうちクリアランス抗体は複合体を形成後速やかにクリアランスされる可能性を考慮すると、FVIII-INH 蛋白量測定 Kit は FVIII-INH でクリアランス抗体以外の FVIII-INH と FVIII の複合体を検出している可能性が示唆された。AHA 患者血漿中には、様々なタイプの FVIII-INH が存在することが示唆された。

3. AHA 診断における交差混合試験(クロスミキシングテスト)の標準化

APTT-CMT は、コントロール血漿としてホームメイドコントロール血漿または市販コントロール血漿、共に推奨できた。また、APTT 試薬は、LA 感受性の良好な試薬が推奨できる。混合血漿の患者血漿比率は、即時反応では 0, 10, 20, 50, 100%が、遅延反応では 0, 50, 100%が推奨できた。この結果は、秘剣血漿の量も少なく、標準化案として推奨できるものと考えられる。

E. 結論

1. APTT-CMTは、患者血漿比率0, 10, 20, 50, 100%を用いて、即時反応は5ポイントで、遅延反応は3ポイントで行うことが推奨できる。

2. AHAの免疫抑制療法はFVIII-INH量をELISAで確認した上で中止することが推奨できる。

F . 健康危険情報

なし

(分担研究報告書には記入せずに、総括研究報告書にまとめて記入)

G . 研究発表

1. 論文発表

1. 家子正裕 . ループスアンチコアグラント : 測定法から見える謎多き病態 . 日本検査血液学会雑誌 2017; 18: 409-418.

2. 学会発表

1 . 篠沢圭子 , 天野景裕 , 備後眞登 , 鈴木隆史 , 稲葉浩 , 小島奈央 , 橋本祐樹 , 本倉徹 , 家子正裕 , 福武勝幸 . 先天性第V因子欠乏患者に同定した3つのミスセンス変異 . 日本血栓止血学会誌 . 2017: 28: 36.

2 . 内藤澄悦 , 家子正裕 , 吉田美香 , 鈴木健史 , 高橋伸彦 , 若宮信隆 , 森谷満 . Lupus anticoagulant陽性症例に認められる凝固因子インヒビター活性の確認 . 日本血栓止血学会誌 . 2017: 28: 38.

3 . 金谷秀平 , 小川孔幸 , 柳澤邦雄 , 石崎卓馬 , 大崎洋平 , 清水啓明 , 井上まどか , 家子正裕 , 一瀬白帝 , 半田寛 . ステロイド治療中に深部静脈血栓症と腸管気腫症を合併した後天性血友病Aの1例 . 日本検査血液学会雑誌. 2017: 18: S32.

4 . 吉田美香 , 内藤澄悦 , 大村一将 , 高橋伸彦 , 家子正裕 . 凝固因子活性低下を伴うループスアンチコアグラント症例における凝固因子インヒビター量の確認の意義 . 日本検査血液学会雑誌. 2017: 18: S36.

5 . 内藤澄悦 , 家子正裕 , 須長宏行 , 吉田美香 , 福武勝幸 . APTT交差混合試験の標準化への試みーコアプレスタミキングテスト研究会推奨法の普及と課題(第9報) . 日本検査血液学会雑誌. 2017: 18: S37.

6 . 家子正裕 . ループスアンチコアグラント : 測定法から見える謎多き病態 . 日本検査血液学会雑誌 . 2017: 18: S79.

7 . Osaki T, Sourì M, Ogawa Y, Kobayashi K, Ieko M, Hashiguti T, Yamakuchi M, Ichinose A. 臨床血液 2017: 57: 1561.

(発表誌名巻号・頁・発行年等も記入)

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