

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

自己免疫性凝固第 XIII/13 因子欠乏症 (AH13)、後天性血友病 A (AHA)、自己免疫性後
天性フォンウィルブランド因子欠乏症 (AVWD) の自己抗体検出および AHA の FVIII 抗原
量、活性、抗 FVIII 自己抗体量の経時変化の測定

研究分担者 尾崎 司 山形大学医学部 助教

研究要旨

自己免疫性凝固第 XIII/13 因子欠乏症 (AH13; 厚労省指定難病288-1) 疑い32症例 (平成27年度11例、28年度15例、29年度6例) についてAMED研究費で作成したイムノクロマト法を用いて確定診断を行い、新たに11例 (平成27年度2例、28年度7例、29年度2例) を同定した。また、後天性血友病A (AHA; 厚労省指定難病288-2) 疑い17症例 (平成27年度6例、28年度7例、29年度4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11例 (平成27年度5例、28年度4例、29年度2例) を同定した。一方、自己免疫性後天性フォンウィルブランド因子 (von Willebrand factor : VWF) 欠乏症 (AVWD; 厚労省指定難病288-3) 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例の陽性判定を得た。しかし、いずれも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。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の確立が望ましい。

また、AHA 症例 5 例について F8 抗原量、F8 活性、および抗 F8 自己抗体量の経時変化を測定したところ、自己抗体が短期間で消失 (2 週間で半減) し、抗原量、活性が回復した集団 (3 例) と自己抗体が長期間 (2 か月以上) 消失せず、活性が回復しなかった集団 (2 例) に大別されることが判明した。

A. 研究目的

自己免疫性後天性凝固因子欠乏症

は自己免疫性凝固第 XIII/13 因子欠乏症 (AH13)、後天性血友病A (AHA)、自

己免疫性後天性フォンウィルブランド病 (AVWD)、自己免疫性後天性凝固第V/5因子欠乏症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)、フォンウィルブランド因子 (vWF)、第V/5因子 (F5) 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、実態把握のためにAH13疑い132症例 (平成27年度11例、28年度15例、29年度6例) とAHA疑い17症例 (平成27年度6例、28年度7例、29年度4例) についてそれぞれAMED研究費で作成したイムノクロマト法、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。一方、AHAの予後を知るために、AHA症例5例についてF8抗原量、F8活性、および抗F8自己抗体量の経時変化を測定した。

B. 研究方法

イムノクロマト法による抗 F13 自己抗体の検出

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 (キューメイ研究所) を用いた。希釈血漿、洗浄液、金コロイド標識抗ヒト Ig (G+M+A) 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 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実施した (混合法)。

ELISA キットによる F8 抗原量、および抗 F8 自己抗体の検出

市販のELISAキットを用いてF8抗原量 (VisuLize™ FVIII Antigen Kit; Affinity Biologicals Inc.)、および遊離の抗F8自己抗体量 (ZYMUTEST Anti-VIII IgG MonoStrip; HYPHEN BioMed) を測定した。抗F8自己抗体の有無は説明書に従って判定した。

F8 活性の測定

F8 活性測定には合成基質法を原理とした市販の色素生成活性検査キット BIOPHEN FVIII:C (HYPHEN BioMed) を用いた。市販の標準血漿 (コアグトロールN) の活性を100%として算出した。

抗 vWF 自己抗体の検出

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 (キューメイ研究所) 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 (G+M+A) 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 (G+M+A) 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 32 症例について直接法、混合法で測定を行ったところ、21 例は直接法、混合法いずれも陰性であったが、1 例は混合法でのみ陽性、10 例は直接法、混合法いずれも陽性であった。

AHA の確定診断 AHA 疑い 17 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、11 例は陽性、6 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。

AHA 症例の F8 抗原量、F8 活性、抗 F8 自己抗体量の経時変化の測定

AHA 症例 5 例の F8 抗原量、F8 活性、抗 F8 自己抗体量の経時変化を測定したところ、3 例は比較的早期に自己抗体が消失 (2 週間で半減) し、抗原量、活性も回復したのに対して、2 例は長期間 (2 か月以上) 自己抗体が消失せず、活性も全く回復しなかった。

D . 考察

AH13 疑い 32 症例のうちイムノクロマト陽性だった 11 例は、抗 F13-A 自己抗体検出のための ELISA 法、ドットプ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。AHA 疑い 17 症例のうち、11 例は自己抗体が検出されたが、6 例は検出されなかった。この 6 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が望まれる。

AHA 症例 5 例の F8 活性、F8 抗原量、抗 F8 自己抗体量の経時変化を調べたところ、自己抗体が短期間で消失し、抗原量、活性が回復した集団と自己抗体が長期間消失せず、活性が回復しなかった集団に大別されることが判明した。免疫抑制療法などの治療が有効な症例と自己抗体の消失が困難な症例の違いについては今後検討する必要がある。

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。

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、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。しかし、今後は抗 F8 自己抗体-F8 複合体、および抗 VWF 自己抗体-VWF 複合体を検出できる測定法の確立が望まれる。

G . 研究発表

1.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.* 2015; **103**: 341-347.

2.Uchida E, Watanabe K, Arai R, Yamamoto M, Souri M, Osaki T, Ichinose A, Miura O, Koyama T. Autoimmune Hemorrhaphilia Resulting from Autoantibody against the A Subunit of Factor XIII. *Intern Med.* 2015; **54**: 2383-2387.

3.Ichinose A, Osaki T, Souri M; Japanese Collaborative Research Group (JCRG) on AH13 (supported by the Japanese Ministry of Health, Labor, and Welfare). Clinical features of 32 new Japanese cases with autoimmune haemorrha-phia due to anti-factor XIII antibodies. *Haemophilia.* 2015; **21**: 653-658.

4.Souri M, Osaki T, Ichinose A. Anti-factor XIII A subunit (FXIII-A) autoantibodies block FXIII-A2 B2 assembly and steal FXIII-A from native FXIII-A2 B2. *J Thromb Haemost.* 2015; **13**: 802-814.

5.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.

6. 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. 尾崎 司、杉山 大輔、曲 泰男、惣宇利 正善、一瀬 白帝: 指定難病「自己免疫性出血病 XIII/13」のイムノクロマト法による確定診断. 第1回山形血液研究会, 山形; 2015年9月25日

2. 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.

3. 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.

4. 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

5. イムノクロマト法による A 型自己免疫性出血病 XIII/13 の迅速診断, 口頭, 尾崎 司, 高岡 勇輝, 杉山 大輔, 曲 泰男, 惣宇利 正善, 一瀬 白帝, 愛知県名古屋市 (第39回日本血栓止血学会学術集会), 2017/6/10, 国内.

(発表誌名巻号・頁・発行年等も記入)

G. 知的所有権の取得状況
該当なし