

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 研究的精密検査（主に F13）

研究分担者 惣宇利正善 国立大学法人山形大学大学院医学系研究科 准教授

研究要旨：

- ・ 4 例の自己免疫性第 XIII 因子欠乏症 (AiF13D) 疑い症例を精査し、Aa 型 XIII 因子インヒビター 2 例、Ab 型インヒビター 1 例を同定した。
- ・ 過去に AiF13D と診断された症例 1 例について、4 年経過後にインヒビターは消失しているものの、XIII 因子 A サブユニット結合型 IgG の残存と XIII 因子活性低値の持続が観察された。
- ・ 4 例の自己免疫性第 V 因子欠乏症について、抗 V/5 因子抗体の存在を確認した。

A. 研究目的

自己免疫性第 XIII 因子欠乏症 (AiF13D) 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。AiF13D 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、他の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 自己抗体の免疫プロット解析といった一連の精査が不可欠である。

F13 の活性測定にはアンモニア放出法 (AR 法) が広く使われているが、特に Ab 型インヒビターを検出することが困難であった。本分担研究者は Aa 型・Ab 型を問わず阻害を検出できる新たな F13 活性測定法を開発し、良好なインヒビター検出実績を積み上げている。

自己免疫性第 V 因子欠乏症 (AiF5D) は、自己免疫性出血症の中でも後天性血友病 A に次いで頻度が高いとされている。活性測定によりインヒビターの検出が可能であるものの、確定診断にあたっては抗第 V 因子 (F5) 自己抗体の検出が不可欠であり、一昨年度から、少なくとも血漿から調製した IgG 分画について、ELISA 法による抗 F5 自己抗体の検出が可能であることを確認している。

本年度は、AiF13D を疑われた 4 例について精査し、過去に AiF13D と診断された 1 症例の経過測定を行なった。また、AiF5D が疑われた症例 4 例について、抗 F5 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。F13 活性およびその 5 段階混合試験について、 α_2 -プラスミンインヒビター (α_2 -PI) へのビオチン標識アミン取り込みを ELISA で測定した (PI-BAPA 法)。フィブリン架橋反応について、血漿にトロンピ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)。

(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

[AiF13D 疑い症例の精査] AiF13D 疑い 4 例のうち、2 例は dot blot 解析にて抗 F13-A 抗体陽性を認め、PI-BAPA 法による 5 段階混合試験で著しい阻害を検出したこと、 A_2B_2 異種四量体が検出されない

ことから、Aa 型の AiF13D と診断された。

別の 1 例について、dot blot 解析では抗 F13 抗体が検出されず、PI-BAPA 法による 5 段階混合試験でも阻害を認めなかったものの、F13-A 抗原量に対する PI-BAPA 活性（比活性）の明らかな低値を示した。正常血漿と混合した場合にフィブリン 鎖の架橋反応に明らかな阻害を認めたこと、活性化 F13-A に結合する IgG が ELISA 法で検出されたことから、Ab 型の AiF13D と判断された。

残る 1 例は F13 抗原・活性の低下を認めるものの比活性は正常であり、抗 F13 抗体が検出されないことから、AiF13D ではないと判断した。

[AiF13D 症例の経過測定] 症例は 4 年前に AiF13D (Aa 型) と診断された。2018 年 10 月時点の血漿について、A₂B₂ 異種四量体の回復は認められるものの、F13-A 抗原と同様正常より低値であった。PI-BAPA 比活性も低値であったが、5 段階混合試験での阻害は認められなかった。総抗 F13-A 抗体は 4 年前と比べて大きく減少していたものの、F13-A 結合型抗体の残存が検出された。

[AiF5D の抗 F5 自己抗体検出] AiF5D が強く疑われた 4 例について、血漿から IgG 分画を調製し、ELISA を行なったところ、4 例ともに抗 F5 IgG が強く検出された。これら 4 例では、1,000 倍に希釈した血漿でも抗 F5 抗体の検出が可能であった。3 例については 1～4 ヶ月の抗 F5 抗体の推移も測定し、1 ヶ月以内に健常対照レベルへの低下を確認した。

D. 考察

[AiF13D 診断における PI-BAPA 法の有用性] 本年度、新たに 4 例目の Ab 型 AiF13D 症例を同定した。Ab 型インヒビターの特徴として、
・不活性型 F13 との反応が弱く、通常の免疫学的手法では自己抗体を検出できない例がある
・AR 法では活性阻害がほとんど検出されない
・フィブリン 鎖二量体化の遅延は認められないなどが挙げられ、症例を見落とす危険性をこれまで指摘してきた。PI-BAPA 法は Aa 型と同等に Ab 型インヒビターを鋭敏に検出する活性測定法として開発し、過去の 3 例いずれも、5 段階混合試験での明白な阻害を確認している。今回の症例では、5 段階混合試験において阻害を検出することはできなかったものの、AR 法で正常値を示した比活性が PI-BAPA 法では著しい低値を認めたことが、インヒビター（自己抗体）検出の大きな手がかりとなった。ELISA で比較した場合に不活性型 F13-A に結合する IgG は健常対照レベルであり、活性化 F13 に対する抗体の反応性も他の Ab 型症例と比べて極めて低いことから、自己抗体量が非常に少ないことが、5 段階混合試験で阻害が検出されなかった

原因であると考えられる。

[AiF13D における抗 F13 自己抗体の推移] 今回経過測定した AiF13D 症例では、確定診断から 4 年が経過し、インヒビターの消失は確認され、一定程度の異種四量体形成の回復も認められた。しかしながら、F13-A 結合型の自己抗体の残存が検出され、F13 抗原量も正常の半分程度にとどまっていることから、クリアランス亢進型の抗体が持続的に産生されているものと思われる。

[AiF5D の抗 F5 自己抗体検出] 本年度解析した 4 例はいずれも F5 に対して高い反応性を示す自己抗体が検出され、希釈血漿でも十分に陽性判定が可能であった。Protein A-Sepharose などを用いて調製した IgG 分画で自己抗体を検出・測定する場合、サブクラスによって回収効率が異なること、異なる検体間での量的比較が的確ではないこと、多検体を同時に調製・測定するのが困難なことなどが問題としてあげられる。今回、血漿を十分に希釈することで、健常対照検体の偽陽性（非特異）反応を抑えつつ抗 F5 自己抗体を検出できることが示され、自己抗体の経過推移を測定できるようになった。しかし、一昨年度に同定した弱陽性例については陽性判定が難しく、感度・特異度のさらなる改善を検討する必要がある。

E. 結論

本年度、AiF13D について Aa 型 2 例と Ab 型 1 例を、AiF5D について 4 例を同定した。AiF13D Ab 型症例は現在の F13 活性測定に広く用いられている AR 法では検出できず、また自己抗体量が少ない場合免疫学的手法でも見落とす危険性を指摘した。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Mori M, Mochizuki K, **Souri M**, Nakamura Y, Tokuman N, Kanouchi K, Morikane K, Ichinose A: Complete remission in a bleeding patient with idiopathic autoimmune factor X deficiency caused by non-neutralizing anti-factor X autoantibody. Haemophilia.2019; 25(2):e106-e109
- 2) Ogawa H, **Souri M**, Kanouchi K, Osaki T, Ohkubo R, Kawanishi T, Wakai S, Morikane K, Ichinose A: A high titer of acquired factor V inhibitor in a hemodialysis patient who developed arterial thrombosis. Int J Hematol.2019; 109(2):214-220

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得
2. 実用新案登録
3. その他