

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 尾崎 司 国立大学法人山形大学大学院医学系研究科 助教

研究要旨

自己免疫性凝固第 XIII/13 因子欠乏症 (AiF13D; 厚労省指定難病 288-1) 疑い 4 症例についてイムノクロマト法を用いて確定診断を行い、新たに 2 例を同定した。また、4 年前と 1 年前に同定した 2 例について自己抗体が消失したかイムノクロマト法を用いて確認したところ、自己抗体が検出されたことから抗体は消失していないことが確認された。

自己免疫性凝固第 VIII/8 因子欠乏症 (AiF8D; 厚労省指定難病 288-2) 疑い 2 症例について市販の ELISA キットを用いて確定診断を行い、新たに 2 例を同定した。

自己免疫性後天性フォンヴィルブランド因子 (vWF) 欠乏症 (AiVWF; 厚労省指定難病 288-3) 疑い 2 症例について ELISA 法による自己抗体の検出を試みたがいずれも陰性だった。vWF 抗原量は 1 例低値、1 例正常値であった。

AiF8D や自己免疫性凝固第 V/5 因子欠乏症 (AiF5D; 厚労省指定難病 288-4) では凝固法で測定すると F8 活性や凝固第 IX/9 因子 (F9) 活性はいずれも阻害されるため、鑑別診断が困難になる。そこで AiF8D 13 例、AiF5D 2 例について各々の F8、F9 活性を合成基質法で測定した。AiF8D ではいずれも F8 活性は低値を示したが、F9 活性は 1 例を除いて正常値であった。AiF5D ではいずれも F8 活性、F9 活性ともに正常値を示した。合成基質法では各々の凝固因子に特異的な阻害が検出されたことから、鑑別診断に有用であると考えられた。

A. 研究目的

自己免疫性後天性凝固因子欠乏症は AiF13D、AiF8D、AiVWF、AiF5D からなる難治性出血性疾患である。それぞれ F13、F8、vWF、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、AiF13D 疑い 5 症例、AiF8D 疑い 2 症例、AiVWF 疑い 2 症例についてイムノクロマト法、あるいは ELISA 法によって確定診断を行った。

また、凝固因子に対して高力価の自己抗体が存在する場合、凝固法で測定すると自己抗体が認識する凝固因子以外の凝固因子に対しても見かけ上活性阻害が認められることがあり、自己抗体が認識する凝固因子の特定が困難になる。そこで、合成基質法を用いた検査で特異的な阻害が検出されるか検討した。

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 抗原量の測定、および抗 F8 自己抗体の検出

市販の ELISA キットを用いて F8 抗原量の測定、および遊離の抗 F8 自己抗体の検出を行った。抗 F8 自己抗体の有無は説明書に従って判定した。

F8 活性、および F9 活性の測定

合成基質法を測定原理として用いた市販のキットにより、F8 活性、および F9 活性を測定活性を 100% として算出した。

ELISA 法による vWF 抗原量の測定、および抗 vWF 自己抗体の検出

vWF 抗原量の測定はラット抗ヒト vWF モノクローナル抗体を用いて実施した。モノクローナル抗体を固相化したプレートに希釈検体を入れ、結合した vWF をペルオキシダーゼ標識した別のモノクローナル抗体と TMB により検出した。

遊離の抗 vWF 自己抗体は市販の精製 vWF をプレートに固相化して測定した。vWF を固相化したプレートに希釈検体を入れ、結合した抗 vWF 自己抗体をペルオキシダーゼ標識抗ヒト Ig (G+M+A) 抗体と TMB により検出した。vWF-抗 vWF 自己抗体複合体は上述のモノクローナル抗体を固相化したプレートを用いた。希釈検体を入れ、プレートに結合した vWF-抗 vWF 自己抗体複合体の検出は上述の抗 vWF 自己抗体の検出と同様に実施した。判定のカットオフ値は健常対照の平均+2SD を用いた。

(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

#### AiF13D の確定診断

AiF13D 疑い 4 症例について直接法、混合法を実施し、判定を行ったところ、2 例は直接法、混合法いずれも陽性、2 例は直接法、混合法いずれも陰性であった。

4 年前と 1 年前に同定した 2 例について自己抗体が消失したか調べるためにイムノクロマト法を実施したところ、直接法、混合法いずれも陽性であった。

#### AiF8D の確定診断

AiF8D 疑い 2 症例について市販の ELISA キットを用いて自己抗体の有無を判定したところ、2 例とも陽性であった。F8 活性はそれぞれ 3%、12%、F8 抗原量は 0.47 IU/mL、0.56 IU/mL で F8 比活性は 0.06、0.22 であった。

#### AiVWFD の確定診断

AiVWFD 疑い 2 症例について ELISA 法を用いて自己抗体の有無を判定したところ、遊離型、複合体型とも 2 例とも陰性であった。vWF 抗原量はそれぞれ、97% と 14% だった。

#### AiF8D、AiF5D の F8 活性、および F9 活性

AiF8D 13 例、AiF5D 2 例について合成基質法により F8 活性を測定したところ、AiF8D は 1-12% (中央値 4%: 基準値 50-200%) と非常に低値を示したのに対し、AiF5D はそれぞれ 91%、186% と正常値を示した。

一方、F9 活性は AiF8D の 1 例は 6% と非常に低値を示した (基準値 60-140%) のに対し、残り 12 例は正常値、あるいはやや高値 (85-145%; 中央値 107%) を示した。AiF5D はそれぞれ 94%、116% と常値を示した。

### D. 考察

AiF13D 疑い 4 症例のうちイムノクロマト陽性だった 2 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、陰性だった 2 例のうち、1 例はインヒビター陽性で微量の自己抗体が存在することが後に判明した。感度の問題で偽陰性になる可能性も考慮に入れる必要がある。

AiVWFD 疑い 2 症例はいずれも自己抗体が検出されなかった。しかし、1 例は vWF 抗原量が低値を示しており、クリアランスされている可能性は考えられる。vWF-抗 vWF 自己抗体複合体は健常対照でも高値を示すものがあり、カットオフ値についてはさらなる検討が必要である。

AiF8D と AiF5D の合成基質法による F8 活性、F9 活性測定の結果、AiF8D では F8 活性は非常に低値を示したが、F9 活性は 1 例を除き、正常値で、AiF5D では F8 活性、F9 活性いずれも正常値だったことから、鑑別に有用であると考えられた。

### 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が、感度の問題で偽陰性になる可能性も考慮に入れる必要がある。

抗 vWF 自己抗体検出には健常対照でさらに検討し、最良のカットオフ値を設定する必要がある。

合成基質法による F8 活性、F9 活性の測定は自己免疫性後天性凝固因子欠乏症の鑑別診断、除外診断にも有用であると考えられる。

### G. 研究発表

#### 1. 論文発表

##### 症例報告

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.

#### 2. 学会発表

##### 研究会

尾崎司, 惣宇利正善, 一瀬白帝: 厚労省指定難病 288-2 自己免疫性第 VIII/8 因子欠乏症 (後天性血友病 A) の凝血学的解析, 第 4 回山形県血液研究会, 山形; 2018 年 10 月 5 日

### H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

該当なし