

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 VWF）

研究分担者 横山 智哉子 国立大学法人山形大学大学院理工学研究科 助教
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
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

自己免疫性後天性凝固第 XIII / 13 因子 (F13) 欠乏症、自己免疫性凝固第 V/5 因子 (F5) 欠乏症 (AH5) および後天性血友病 A (AHA) などの診断および治療効果判定に用いる F5 および第 VIII/8 因子 (F8) に対するモノクローナル抗体を作製し、抗原量測定、自己抗体検出に使用するための解析を実施した。

A. 研究目的

AH5 および AHA 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

組換えヒト F13B タンパク質、精製ヒト F5 タンパク質および半減期延長型遺伝子組換え F8 製剤 アドベイトなどを抗原として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。

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。

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こなった。

C. 研究結果

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

抗 vWF 抗体を使用したヒト血中 vWF 濃度測定と抗 vWF 抗体の検出を試みて、その有用性を検証、確

認した。また、樹立した抗 vWF モノクローナル抗体について、その有用性を検討した成果を学会にて発表した。

AiVWFD の確定診断

複合体型抗 vWF 自己抗体は 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。

抗 F13-B サブユニット (F13B) 抗体の作製と性伏の解析

これまで使用してきた市販の抗 F13B 抗体の供給が途絶したのでラットモノクローナル抗体を作成し、10 以上のクローンを得た。その内、8 クローンはヒト F13B と反応することが確認され、測定に有用であることが示唆された。

抗 F5 モノクローナル抗体の作製と ELISA 法による抗原の検出

前年度作製したモノクローナル抗体を用いたサンドウィッチ ELISA 法により、4 クローンがヒト正常血漿中の F5 を認識するモノクローナル抗体として得られた。

抗 F8 モノクローナル抗体の作製

ラット腸骨リンパ節法により、ELISA 法およびウェスタンブロット法において、抗原であるアドベイトを認識する抗体を 6 クローン得た。

D. 考察

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。

樹立した抗 vWF、F13B、F5 モノクローナル抗体を用いた、正常血漿中の抗原の検出法が確立できたため、今後患者血漿を用いた検査や診断に用いられると期待される。また、抗 F8 モノクローナル抗体につ

いては、血漿中のF8抗原量が非常に少ないため、樹立した抗体の評価系の確立が必要である。

E. 結論

本年度は、別途作成した抗 vWF、F13B モノクローナル抗体を試用し、新たに抗 F5 および F8 モノクローナル抗体を作製した。

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。

抗 F5 モノクローナル抗体について、抗原および自己抗体の検出のための ELISA 法を確立した。モノクローナル抗体は、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

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

ヒト血液凝固関連 von Willebrand 因子特異的ラットモノクローナル抗体の樹立と性状解析、横山智哉子、尾崎司、惣宇利正善、一瀬白帝、京都市（第91回日本生化学会大会）、2018年9月

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