

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 実験の実施（主に XIII/13 因子抗体症例）：  
自己免疫性第 XIII/13 因子欠乏症例の精査、  
ならびに自己免疫性第 V/5・第 X/10 因子欠乏症の自己抗体検出

研究分担者 惣宇利正善 山形大学大学院医学系研究科 准教授

研究要旨

- ・ 10 例の自己免疫性第 XIII/13 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 3 例を同定した。また、1 例は B 型抗体陽性が疑われた。
- ・ 過去に AiF13D と診断された症例 24 例の追跡解析をまとめた。
- ・ 4 例の自己免疫性第 V/5 因子欠乏症について、抗第 V 因子抗体の存在を確認した。
- ・ 1 例の自己免疫性第 X/10 因子欠乏症疑い症例については、抗第 X 因子抗体は検出されなかった。

A．研究目的

自己免疫性第 XIII/13 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。

自己免疫性第 V/5 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。また、頻度は低いものの自己免疫性第 X/10 因子欠乏症（AiF10D）症例も存在する。いずれも、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）、抗第 X 因子（F10）自己抗体の検出が不可欠である。

本年度は、AiF13D を疑われた 10 例について精査し、AiF5D が疑われた症例 4 例および AiF10D 疑い症例 1 例について、抗 F5/F10 抗体

の検出を検討した。また、過去に AiF13D と診断された症例の自己抗体・インヒビター消失と FXIII 抗原・活性の回復について詳細に解析した。

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、 $\alpha_2$ -プラスミンインヒビター（ $\alpha_2$ -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 および抗 F10 自己抗体について、精製 F5/F10 タンパク質を固相化したプレートをを用いた ELISA により、F5/F10 と反応する IgG を検出した（固相法）

（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 10 例のうち、1 例に 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

体が検出されなかったものの、PI-BAPA 法による 5 段階混合試験で阻害を認め、 $A_2B_2$  異種四量体が検出されないこと、ELISA 法で F13-A と反応する IgG が検出されたことから、Aa 型 AiF13D と判断された。

さらに別の 1 例では、症状発症後数ヶ月後の血漿を用いて精査を行ったところ dot blot 陰性、5 段階希釈試験で欠乏パターンを示したものの、フィブリン架橋反応は遅延を認めた。そこで、発症直後の血清を正常血漿と混合したところ、明らかな PI-BAPA 活性の阻害が認められ、また、ELISA において抗 F13-A IgG が検出されたことから、AiF13D と判断された。

残る 7 例のうち 1 例について、F13-B と反応する IgG が検出され、 $A_2B_2$  異種四量体も正常の約半分に低下していたものの、PI-BAPA 活性は正常範囲であり、フィブリン架橋の異常も認められなかった。

[AiF13D 症例の経過解析] 経過測定を行なった Aa 型 24 例について、抗 F13 -A IgG 半減期の平均は 84 日 (中央値 50 日) であり、AiF5D 4 例の抗 F5 IgG の半減期 (平均 19 日) と比べて有意な長期化が認められた。6 例では、追跡期間 (平均 457 日、中央値 298 日) 終日に 10% 以上の抗 F13-A 自己抗体が残存していた。インヒビターの消失と比活性の回復は自己抗体の消失とほぼ同期していた一方で、 $A_2B_2$  異種四量体の回復は著しく遅延しており、追跡期間終日において、15 例に渡り  $A_2B_2$  異種四量体抗原量が未回復 (70%未満) であった。

[AiF5D/AiF10D 疑い症例の抗 F5/F10 自己抗体検出] AiF5D が強く疑われた 4 例について、ELISA により 4 例ともに抗 F5 IgG が強く検出された。1 例については、3 ヶ月にわたって抗 F5 IgG の消失が認められず、長期化が懸念された。AiF10D 疑い症例 1 例について、抗 F10 抗体は検出されなかった。

#### D . 考察

[AiF13D における抗 F13 自己抗体の推移と F13 抗原・活性の回復]

Aa 型 AiF13D において、抗 F13-A 抗体が長期にわたって残存し、特に  $A_2B_2$  異種四量体抗原量の回復が著しく遅延していることが今回改めて浮き彫りとなった。F13 活性の阻害は見かけ上抗 F13-A 抗体の消失と同期しており、出血症状の軽減・回復につながっているものと考えられ

る。しかし、およそ 1/3 の症例では比活性が正常レベルに回復しておらず、インヒビターの残存が検出されている。さらに、 $A_2B_2$  異種四量体にいたっては 2/3 の症例で回復が認められず、クリアランス型抗体の長期持続が強く疑われる。免疫抑制療法の有無や出血症状の推移について現在調査中であるが、AiF13D について長期にわたる経過観察の必要性は明白である。

今年度同定された AiF13D 3 例のうち、2 例は精査において Dot blot 偽陰性であった。1 例は 5 段階希釈試験で阻害が検出されたものの、もう 1 例は発症後数ヶ月を経て採血された血漿であったため、阻害も認められなかった。確実に症例を捉える上で、極力発症から間を置かずに精査する必要がある。

#### E . 結論

本年度、AiF13D について Aa 型 3 例を、AiF5D について 4 例を同定した。Aa 型 AiF13D では自己抗体が長期にわたって持続する傾向があり、経過観察の必要性が示された。

#### G . 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Yokoyama C, Ikeda S, Osaki T, Souri M, Ichinose A: Generation and Application of Rat Monoclonal Antibodies Specific for a Human Blood Coagulation Protein: von Willebrand Factor. Monoclon Antib Immunodiagn Immunother. 2019;38(3):133-136.

#### 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

令和2年3月11日

国立保健医療科学院長 殿

機関名 山形大学

所属研究機関長 職名 学長

氏名 小山 清人



次の職員の令和元年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

- 1. 研究事業名 難治性疾患政策研究事業
- 2. 研究課題名 自己免疫性出血症治療の「均てん化」のための実態調査と「統合的」診療指針の作成
- 3. 研究者名 (所属部局・職名) 大学院医学系研究科・准教授  
(氏名・フリガナ) 惣字利 正善・ソウリ マサヨシ

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無		左記で該当がある場合のみ記入 (※1)		
	有	無	審査済み	審査した機関	未審査 (※2)
ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	山形大学	<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
人を対象とする医学系研究に関する倫理指針 (※3)	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	山形大学	<input type="checkbox"/>
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称: )	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

(※1) 当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他 (特記事項)

(※2) 未審査に場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」や「臨床研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/>
-------------	---

6. 利益相反の管理

当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由: )
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合は委託先機関: )
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由: )
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (有の場合はその内容: )

(留意事項) ・該当する□にチェックを入れること。  
・分組研究者の所属する機関の長も作成すること。