

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 実験の実施（主に von Willebrand 因子抗体症例） 研究的精密検査：
（特に免疫学的自己抗体検出法）の改良

研究分担者 横山 智哉子 山形大学大学院理工学研究科 助教
惣宇利 正善 山形大学大学院医学系研究科 准教授
尾崎 司 山形大学大学院医学系研究科 助教

研究要旨

自己免疫性 von Willebrand 因子（VWF）欠乏症（AiVWD）、自己免疫性凝固第V/5 因子（F5）欠乏症（AiF5D）、後天性血友病A（AiF8D）および自己免疫性後天性凝固第XIII / 13因子（F13）欠乏症（AiF13D）などの診断および治療効果判定に用いる免疫学的自己抗体検出法を改良し、維持するために抗ヒト血液凝固因子モノクローン抗体を作製し、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。また、前年度までに作製した抗VWFラットモノクローン抗体を用いた研究結果を学術論文としてまとめた。

A．研究目的

AiVWD、AiF5D、AiF8DおよびAiF13Dの診断および治療効果判定には、それぞれの抗原量の測定や自己抗体の検出が不可欠である。これらの疾患の診断基準・重症度分類、診療指針等に必要で、確定診断の基準となる精密検査の一般化に必須なモノクローン抗体の作製と安定供給を目的とした。

B．研究方法

前年度までに作製した抗ヒトF5ラットモノクローン抗体を用いたサンドウィッチ ELISA 法による抗原の検出系を確立した。また、抗ヒトF8ラットモノクローン抗体について、サンドウィッチ ELISA 法による抗原の検出系を確立した。さらに、リコンビナントヒトF13Aタンパク質を抗原としてラットに免疫し、腸骨リンパ節法により、モノクローン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ン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。

（倫理面への配慮）

山形大学医学部の倫理委員会より研究実施の承認を得た。また、動物実験は山形大学動物実験センターより研究実施の承認を得た。

C．研究結果

抗F5モノクローン抗体を用いたELISA法による抗原の検出

これまでに作製したモノクローン抗体4クローンのうち、3クローンの組み合わせによるサンドウィッチ ELISA 法の改良により、この中で最も高感度な検出法を確立した。現在、これらを学術論文としてまとめており、来年度投稿する予定である。

抗F8モノクローン抗体を用いたELISA法による抗原の検出

前年度作製したモノクローン抗体を用いたサンドウィッチ ELISA 法により、6クローンが半減期延長型遺伝子組換えF8製剤アドベイトを認識するモノクローン抗体として得られた。しかし、ヒト正常血漿中のF8の検出には至っておらず、さらなる検出系の改良を実施する必要がある。

抗F13Aモノクローン抗体の作製

抗F13A抗体の安定供給のためラットモノクローン抗体を作製し、10以上のクローンを得た。来年度より、性状解析を実施する予定である。

抗F13Bモノクローン抗体の活用

ラット抗F13Bサブユニットモノクローン抗体を作製し、AMEDプロジェクトで開発した抗F13Bサブユニット自己抗体検出ELISAシステムを高感度化する実験に提供した。

D．考察

樹立した抗F5モノクローン抗体を用いたサンド

ウィッチ ELISA 法の改良により、抗原の検出感度を高めることに成功した。今後、患者血漿を用いた診断基準に用いられると期待される。また、抗 F8 モノクローン抗体については、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、抗 F5、F8、F13A モノクローン抗体を作製した。抗 F5 モノクローン抗体について、抗原および自己抗体の検出のための ELISA 法を改良した。モノクローン抗体は、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ン抗体は非常に有用であると考えられる。

また、本年度はこれまでに実施した抗ヒト VWF ラットモノクローン抗体の樹立とこれらを用いた検出系の確立を学術論文としてまとめた。この成果により、AVWD および AiVWF D の検出系の一般化に貢献すると期待する。

F . 健康危険情報

なし

G . 研究発表

I. 論文発表

1) 原著

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.

2) 総説・著書

なし

.学会発表

1) 特別講演等

なし

2) 一般演題

なし

H . 知的財産権の出願・登録状況

1) 特許取得

なし

2) 実用新案登録

なし

3) その他

なし

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 印



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「総合的」診療指針の作成
- 3. 研究者名 (所属部局・職名) 大学院理工学研究科・助教
(氏名・フリガナ) 横山 智哉子・ヨコヤマ チカコ

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。
・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。