

## 総括研究報告書

1. 研究開発課題名： 後天性凝固異常症の P. O. C. テストによる迅速診断システムの開発

2. 研究開発代表者： 一瀬 白帝 (国立大学法人山形大学 医学部)

3. 研究開発の成果

### 1) 抗 FXIII/13-A サブユニット自己抗体検出イムノクロマト法

偽陰性を防ぐため現行キットを改良し、特異性と感度を向上させた。

- a. 性能試験：測定方法検証のため、山形大学で試用している現法を富山大学と鹿児島大学にて残余検体で実施したところ、目視結果が 100%一致し、3 大学に一括導入した濃度読取装置で定量化して、再現性を確認した。
- b. 現在は研究用試薬だが、PMDA との事前相談の結果、「新規品目に該当するのでクラス未定で承認申請」することとなった。
- c. 臨床統計専門家 (京都府立医大) に、臨床性能試験の実施のためのプロトコールの作成への支援を依頼した。

### 2) 抗 FXIII/13-B サブユニット自己抗体検出イムノクロマト法

捕捉抗体を酵素処理して特異性を向上させた。

- a. 測定方法確立のため、試作した検査キットを山形大学で試用した。
- b. 使用する捕捉抗体を複数化して、更に感度と特異性を改良するため、ELISA 法で 7 種類の捕捉抗体の性状を比較した。
- c. 世界初なので山形大学に発明届を提出し、特許を出願した。
- d. 現在は研究用試薬であるが、PMDA との事前相談の結果、「新規品目に該当するのでクラス未定で承認申請」することとなった。

### 3) 抗第 VIII/8 因子自己抗体イムノクロマト法

凝固活性中和法と Western blot 法により検出に最適な抗体を複数選抜し、ELISA で 5 例に遊離型抗 FVIII/8 自己抗体を検出した。

- a. 4 種類のモノクローン抗体と 1 種類のポリクローン抗体を捕捉抗体として用いて、イムノクロマトキットとドットプロット法を試作し、山形大学にて試用した。
- b. 既存のドットプロット法は存在しないので発明届を提出し、特許申請準備中である。
- c. 現在は研究用試薬だが、PMDA との事前相談の結果、「新規品目に該当するのでクラス未定で承認申請」することとなった。

### 4) 抗 von Willebrand 因子自己抗体イムノクロマト法

検出に最適な抗体を 2 種類決定し、Western blot 法で自己免疫性 VWD 疑いの 2 症例の検体で自己抗体を検出した。

- a. VWF 抗原をマイクロプレートに塗布して ELISA 法を、メンブレンに塗布してイムノクロマトキットを試作した。
- b. 上述した抗体を捕捉抗体として塗布したイムノクロマトキットを試作し、改良中である。
- c. 既存の自己抗体検出キットは存在しないので、特許を出願した。
- d. 現在は研究用試薬だが、PMDA との事前相談の結果、「新規品目に該当するのでクラス未定で承認申請」することとなった。

### 5) FXIII/13 活性測定クロマト法

昨年度開発した新規基質 (PI-AP) を使用して鋭敏な FXIII/13 活性測定を可能にし、FXIII/13 インヒビターを検出することに成功した (平成 27 年 6 月国際血栓止血学会で発表)。

- a. 「新規性喪失の例外措置」を利用してフィルター法の特許出願して、製品化企業探しを TLO に委託した。
- b. 別途、種々の抗体や基質を用いて、ELISA 法を試作し、イムノクロマト化中である。
- c. 一般の FXIII/13 欠乏症の検査にも使用する既存項目なので、PMDA との事前相談の結果、「クラス II で登録認証機関に認証申請」することとなった。

### 6) D-dimer 全分子量均等測定キット

測定原理を確立し、既存キットによる臨床データのある出血性疾患症例の残余検体の D-dimer を測定・比較した。完成しており、製品化の準備中である。

- a. 検体滴下後 10 分で結果が分かるイムノクロマトキットを完成させ、規格書を作成した。
- b. 抗リン脂質抗体症候群以外の血栓塞栓症の診断にも使用可能な既存項目なので、PMDA との事前相談の結果、「クラス II で登録認証機関に認証申請」することになった。

4. その他

開発研究検討会を 4 半期ごとに合計 4 回開催した。また、ワークショップを開催し、新規検査の実施体制を整備した。