

抗リン脂質抗体症候群における  
血栓塞栓症発症機序の解明と臨床検査診断法の確立  
に関する研究

学位申請者

山口大学大学院医学系研究科保健学専攻  
生体情報検査学分野

本木 由香里

# 目次

要旨 .....	1
<b>第1章 緒論</b>	
1.1 抗リン脂質抗体症候群の疾患概念 .....	3
1.2 抗リン脂質抗体症候群の診断 .....	3
1.3 抗リン脂質抗体症候群の臨床所見 .....	5
1.4 抗リン脂質抗体症候群の検査診断 .....	5
1.5 代表的な抗リン脂質抗体 .....	5
1.6 抗リン脂質抗体症候群の検査診断における問題点 .....	10
1.7 抗リン脂質抗体による血栓形成機序 .....	10
1.8 本研究の目的 .....	10
<b>第2章 抗リン脂質抗体による動脈血栓塞栓症発症機序の解明</b>	
2.1 研究背景および目的 .....	11
2.2 対象および方法 .....	11
2.3 結果 .....	14
2.4 考察 .....	21
2.5 小括 .....	22
<b>第3章 抗リン脂質抗体症候群の臨床検査診断法の確立</b>	
3.1 研究背景および目的 .....	23
3.2 対象および方法 .....	23
3.3 結果 .....	28
3.4 考察 .....	34
3.5 小括 .....	35
総括 .....	36
結語 .....	37
謝辞 .....	38
引用文献 .....	39

# 要旨

【背景および目的】抗リン脂質抗体症候群（APS）は抗リン脂質抗体の出現に伴い、動・静脈血栓症や習慣流産といった多彩な合併症を繰り返し発症する自己免疫性血栓塞栓性疾患である。患者の多くは全身性エリテマトーデス（SLE）に代表される膠原病を基礎疾患に有する二次性 APS であると言われている。

APS の多彩な病態の中でも、動脈血栓塞栓症は発症率が高く、死因の上位を占める重篤な合併症である。APS では、高血圧症や脂質異常症といったリスクファクターの有無に係わらず血栓症を起こすことから、一般的な血栓症の発症機序とは異なる機序が存在すると考えられており、近年、抗リン脂質抗体が種々の細胞を活性化し、組織因子（TF）の発現を亢進させる作用が注目されている。本研究では、抗リン脂質抗体が血栓症を引き起こす機序の解明を目的に、SLE 患者における単球の TF 発現と抗リン脂質抗体との関連を明らかにするとともに、抗リン脂質抗体が末梢血単核球の TF 発現および炎症性サイトカイン産生に及ぼす影響を検討した。

また、抗リン脂質抗体はリン脂質とリン脂質結合タンパクが複合体を形成した際に、リン脂質結合タンパク分子上に出現するエピトープを認識する抗体の総称であり、APS 患者血中には複数種類の抗リン脂質抗体が存在する。APS の検査診断においては、血中の抗リン脂質抗体の検出が要となり、現在、ループスアンチコアグラント（LA）活性による定性検査と ELISA による定量検査が行われている。しかし、LA 活性は検査手順が煩雑であり、判定困難な例が少なくないことや、ELISA による検査では検出される抗体が 1 種類のみであることから、多くの APS 症例が見逃されている可能性がある。そこで、複数の抗体測定による新規検査診断法の開発を目的に、種々の抗リン脂質抗体の測定系を確立し、APS 合併症と各種抗体との関連を統計学的に解析した。

【方法】① SLE 患者 89 例（男女比＝3：86，平均年齢 39.8 歳 [8～76 歳]）を対象として、血中の TF 発現単球の割合をフローサイトメトリーにて、血漿中の抗リン脂質抗体（aCL/β<sub>2</sub>GP I）を市販の ELISA キットにて測定し、閉塞性動脈硬化症（ASO）との関連を統計学的に解析した。また、抗リン脂質抗体陽性 SLE 患者、抗リン脂質抗体陰性 SLE 患者、健常人の血漿より IgG を純化・精製し、健常人末梢血単核球への添加実験を行った。細胞および培養上清を回収し、TF および炎症性サイトカインの mRNA 発現量とタンパク産生量をリアルタイム PCR 法と ELISA キットにて測定した。

② 8 種類の抗リン脂質抗体（aCL, aCL/β<sub>2</sub>GP I, aβ<sub>2</sub>GP I, aPS, aPS/PT, aPT, aANXA2, aANXA5）を検出する ELISA 系をそれぞれ確立し、SLE 患者 184 例（男女比＝10：174，平均年齢 45.4 歳 [19～82 歳]）を対象に各種抗体測定を実施した。対象には、血栓症 71 例（動脈血栓症 32 例，静脈血栓症 39 例），習慣流産 24 例，さらに APS 関連血小板減少症 19 例が含まれており、各種抗体と APS 合併症との関連を統計学的に解析した。

【結果】① ASO 発症者では単球の TF 発現率が高く、また、TF が高発現している症例群において抗リン脂質抗体陽性率が高かった。さらに、*in vitro*において抗リン脂質抗体陽性 SLE 患者由来の IgG は正常単核球の TF 発現と炎症性サイトカイン産生を惹起した。② 今回測定したいずれの抗体も、APS 合併症のない SLE 患者群に比べ、合併症のある患者群では高値を示す傾向が認められた。多重ロジスティック解析の結果、特に a $\beta_2$ GP I および aPS/PT が動・静脈血栓症や血小板減少症の発症に強く関連していた。また、aCL/ $\beta_2$ GP I は習慣流産発症のリスクファクターであることが示唆された。さらに、LA 活性には、a $\beta_2$ GP I ・ aPS/PT ・ aPT が強く関与する可能性が示された。

【考察】APS 患者に発症する動脈血栓塞栓症の発症には、抗リン脂質抗体の働きによる TF 依存性の血栓形成と炎症反応の増幅が責任の一端を担うことが示唆された。また、APS の診断においては、a $\beta_2$ GP I および aPS/PT が APS 合併症との関連が強く、測定意義が高いと考えられる。今回の検討により、抗リン脂質抗体の種類によって疾患特異性が異なることが明らかとなった。したがって、抗体の認識エピトープの違いにより、種々の細胞に対する作用が異なることが予想される。本研究では、一部の抗リン脂質抗体について、細胞に対する作用および APS 合併症への関与を明らかにしたが、今後、今回検討しなかった抗体も含めた各種抗リン脂質抗体について、APS 合併症との関連や種々の細胞に対する作用の解明を進める必要があると考えられる。

【結語】APS の多彩な病態は、複数の抗リン脂質抗体が持つ様々な作用が絡み合って形成されると考えられる。APS の病態発症機序は複雑であるが、一つひとつの抗リン脂質抗体について、その作用を詳細に解明していくことで、将来、患者の有する抗体の種類をスクリーニングすることにより、患者ごとに発症しやすい合併症やそのリスクを的確に推測する新たな APS 鑑別診断法の確立、さらには抗体に応じた治療選択を可能にするエビデンスの確立が期待できる。

# 第 1 章

## 緒論

### 1.1 抗リン脂質抗体症候群の疾患概念

抗リン脂質抗体症候群 (Antiphospholipid syndrome: APS) は、血中に抗リン脂質抗体が出現し、それに伴って動・静脈血栓症や習慣流産といった多彩な病態を呈する自己免疫性血栓塞栓性疾患である<sup>1-4)</sup>。本疾患は、1983年に Hughes ら<sup>5)</sup>により抗リン脂質抗体の出現が血栓症や血小板減少症と関連していることが報告されたことを発端に、1986年に提唱された比較的新しい疾患概念である<sup>6)</sup>。

APS は基礎疾患の有無により、原発性抗リン脂質抗体症候群 (primary APS) と二次性抗リン脂質抗体症候群 (secondary APS) とに大別される。原発性抗リン脂質抗体症候群は、既知の膠原病や明らかな基礎疾患・誘因を持たない APS で、動・静脈血栓症や原因不明の習慣流産を呈し、抗リン脂質抗体の出現を認める<sup>7)</sup>。一方、二次性抗リン脂質抗体症候群は膠原病などの基礎疾患を持つ APS であり、基礎疾患としては全身性エリテマトーデス (Systemic lupus erythematosus: SLE) が代表的である<sup>8)</sup>。SLE に合併する APS は血中に出現する抗リン脂質抗体の種類も多様であり、抗体により引き起こされる合併症は軽微な静脈血栓症から重篤な動脈血栓症まで極めて多彩である。また、稀ではあるが APS の特殊型に劇症型抗リン脂質抗体症候群があり、本症は全身に広範な血栓症を起し、多臓器不全・重症呼吸不全・重篤な血小板減少症など急激な経過をたどる極めて予後不良な APS である<sup>9)</sup>。

現在、APS は後天性血栓性素因の代表として位置づけられており、近年注目されている疾患である。

### 1.2 抗リン脂質抗体症候群の診断

APS の診断には、1998年に札幌で開催された第 8 回国際抗リン脂質抗体カンファレンスで提唱された分類基準案 “Sapporo Criteria” が世界的に広く用いられてきた<sup>10)</sup>。その後、2005年にシドニーで開催された第 11 回国際抗リン脂質抗体カンファレンスで “Sapporo Criteria” が討議され、翌 2006年に発表された APS 診断分類基準 (“Sapporo Criteria” Sydney 改訂版)<sup>11)</sup>が現在有用である (表 1)。

“Sapporo Criteria” Sydney 改訂版では、診断は臨床所見と検査所見の双方から為される。まず、臨床所見としては、画像検査や病理所見により確定診断された動脈および静脈の血栓塞栓症、あるいは分類基準に従って診断された流死産等妊娠合併症のうち一つ以上

が確認される必要がある。さらに、検査所見としては、①国際血栓止血学会の診断ガイドラインに基づいた測定法でループスアンチコアグラント (LA) 活性が陽性であること、②IgG型またはIgM型の抗カルジオリピン抗体 (aCL) が陽性 (健常人の99パーセンタイル以上または40単位以上) であること、③IgG型またはIgM型の抗 $\beta_2$ グリオプロテイン I 抗体 (a $\beta_2$ GP I) が陽性 (健常人の99パーセンタイル以上) であること、のいずれかの抗リン脂質抗体を12週間以上の間隔をあけて2度以上確認することが必要となる。以上の臨床所見と検査所見が各々一つ以上確定した場合にAPSと診断される。

表1. 抗リン脂質抗体症候群診断分類基準 (“Sapporo Criteria” Sydney 改訂版)

**臨床所見**

1. 血栓症 (画像診断, ドップラー検査または病理学的に確認されたもので血管炎による閉塞を除く)
  - a. 動脈血栓症: 脳血管障害, 虚血性心疾患など
  - b. 静脈血栓症: 深部静脈血栓症, 肺塞栓症, 網膜中心静脈血栓, 腸間膜静脈血栓, 副腎静脈血栓など
2. 妊娠合併症
  - a. 妊娠10週以降で, 他に原因の無い正常形態胎児の死亡
  - b. 妊娠中毒症, 子癇または胎盤機能不全による妊娠34週以前の形態学的異常の無い胎児の1回以上の早産
  - c. 妊娠10週以前の3回以上続けての流産 (母体の解剖学的異常, 内分泌学的異常, 染色体異常を除く)

**検査所見**

Category 1: リン脂質依存性凝固反応による定性検査

1. ループスアンチコアグラント (LA): 国際血栓止血学会のガイドラインに基づいた測定法で, 12週間以上の間隔をあけて, 2回以上陽性であること

Category 2: 各種固相化抗原を用いたELISAによる定量検査

2. 抗カルジオリピン抗体 (aCL): IgG型またはIgM型のaCLが中等度以上の力価 (> 健常人の99%tile, > 40単位) で, 12週間以上の間隔をあけて, 2回以上陽性であること
3. 抗 $\beta_2$ グリオプロテイン I 抗体 (a $\beta_2$ GP I): IgG型またはIgM型のa $\beta_2$ GP I が中等度以上の力価 (> 健常人の99%tile) で, 12週間以上の間隔をあけて, 2回以上陽性であること

※ 臨床所見が一つ以上確認され, かつ検査所見が一つ以上確定した場合に抗リン脂質抗体症候群と診断する

### 1.3 抗リン脂質抗体症候群の臨床所見

抗リン脂質抗体により引き起こされる疾患は動脈血栓症や静脈血栓症、さらには妊娠合併症と、非常に多彩であり、APS ではこれらの疾患を繰り返し発症するという特徴がある。

APS に関連する血栓性病態は極めて多彩であるが、好発部位が存在する<sup>12,13)</sup>。動脈血栓症としては脳梗塞（単発性から多発性まで様々）や一過性脳虚血発作などの脳血管障害が最も多く、次いで、心筋梗塞などの虚血性心疾患も重要な動脈血栓症である。一方、静脈血栓症としては下肢深部静脈血栓症が最も多く、しばしば肺塞栓症を併発する重篤な合併所を呈する。また、網膜中心静脈血栓症や腸間膜静脈血栓、腎静脈血栓なども認められ、APS では多彩な静脈血栓症が起こる。さらに、APS では罹患患者の多くが若い女性ということもあり、習慣流産などの妊娠合併症も重要な病態であるが、その発症機序は詳細には解明されていない。

“Sapporo Criteria” Sydney 改訂版では、APS 診断の臨床所見には含まれないものの、APS に比較的特異的な臨床症状として、血小板減少症・心弁膜症・神経症状・皮膚疾患（特に網状皮斑）・腎疾患の 5 つが APS 関連症状として記載されている。その中でも、血小板減少症は APS 患者の約 30%で確認され、APS を疑うきっかけとなる重要な所見である。APS に発症する血小板減少症は、血小板数 5~10 万/ $\mu$ l と中等度の減少であることが多く、出血傾向を呈することはほとんどない。APS における血小板減少の機序としては、血小板膜表面に抗リン脂質抗体が結合することにより、脾臓や網内系による処理が亢進する免疫学的な機序が考えられるが、脳梗塞などの動脈血栓症の発症に先行して血小板減少を来す症例が認められることから、血栓症の発症に伴って血小板が消費的に減少する可能性も指摘されている。

### 1.4 抗リン脂質抗体症候群の検査診断

APS の検査診断では、血中の抗リン脂質抗体を検出することが必須であり、抗リン脂質抗体は検出方法の違いにより大きく二つに分けられる。まず一つ目は、リン脂質依存性凝固反応における阻害活性として検出する LA 活性である。これは、抗リン脂質抗体が示す「*in vitro* の凝固時間をリン脂質依存性に延長させる」という性質を利用し、その活性を検出することにより血漿中に抗リン脂質抗体が存在していることを間接的に証明する定性検査である。二つ目は、標準化された ELISA を用いて検出する aCL および a $\beta_2$ GP I である。これらは、aCL と a $\beta_2$ GP I にそれぞれ対応する固相化抗原を用いて抗体そのものを直接検出する定量検査である。

### 1.5 代表的な抗リン脂質抗体

#### 1.5.1 LA 活性

APS 患者では、しばしば APTT の延長が確認される。これは、抗リン脂質抗体がリン脂質の量が限られた試験管内において、リン脂質を介する反応を阻害することによ

り、凝固時間を延長させるためと考えられている<sup>14,15)</sup>。

LA 活性は、①スクリーニング試験 (*in vitro* でのリン脂質依存性凝固反応の延長を確認)、②クロスミキシング試験 (凝固時間延長の原因がインヒビターであることを証明)、③確認試験 (存在するインヒビターが個々の凝固因子に対するものではなく、リン脂質に特異的であることを証明)、の順に実施し確認する (図 1-1)。

まず、スクリーニング試験ではプロトロンビン時間 (PT)、活性化部分トロンボプラスチン時間 (APTT)、希釈ラッセル蛇毒試験 (dRVVT) などの測定系を用いて、リン脂質依存性凝固時間が延長することを確認する。測定法により、検出できる LA が若干異なっているため、複数の測定系を組み合わせるスクリーニング試験を行うことが推奨されている。多くの検査室では APTT を第一選択としているが、APTT は使用する試薬 (リン脂質の組成や配合比の違い) により LA に対する感受性が大きく異なるため、APS を疑う症例では、LA の検出感度が高い測定系にて確認する必要がある。

スクリーニング試験で凝固時間の延長が確認された場合、次にクロスミキシング試験にて、その延長が個々の凝固因子活性の低下ではなく、インヒビターによるものであることを証明する。クロスミキシング試験では、被検血漿と正常血漿を種々の割合で混和し、被検血漿 100% と正常血漿 100% の凝固時間を直線で結んだ際に、混合血漿の凝固時間が直線より上に凸になるかを確認する。

クロスミキシング試験でインヒビターの存在が疑われた場合、さらに確認試験を行う。確認試験では、被検血漿に過剰なリン脂質を添加し、延長していた凝固時間が一定レベル以上短縮することを確認することで、インヒビターがリン脂質に特異的であることを証明する。

スクリーニング検査 ※リン脂質依存性凝固時間の延長を確認する



Activated Partial Thromboplastin time: APTT (PTT-LA)  
Kaolin Clotting time: KCT  
diluted Russell's Viper Venom time: dRVVT

ミキシング試験 ※凝固時間延長の原因がインヒビターであることを証明する



スクリーニング検査で健常人プール血漿を混和したミキシング試験を行っても凝固時間の短縮が認められないことを確認する

確認試験 ※インヒビターがリン脂質に特異的であることを証明する

血小板中和試験 (Platelet Neutralization Procedure: PNP)  
Hexagonal (II)リン脂質による中和試験: Staclot-LA  
dRVVT改法によるLA確認試験: Gradipore

図 1-1. 国際血栓止血学会のガイドラインに基づいたループスアンチコアグラントの診断手順



### 1.5.2 抗カルジオリピン抗体 (anti-cardiolipin antibodies: aCL)

抗カルジオリピン抗体 (aCL) は梅毒患者血清中に検出される抗体として発見され<sup>16, 17)</sup>, その後, SLE をはじめとする膠原病患者において多く検出されることが報告された<sup>18)</sup>. 当時, aCL は梅毒血清反応の生物学的偽陽性として位置づけられていたが, 固相化カルジオリピンを用いたラジオイムノアッセイ (RIA) や固相酵素免疫測定法 (ELISA) による測定法が確立され<sup>5, 19)</sup>, aCL と血栓症や血小板減少症との関連を指摘する報告が相次いだ. さらに, aCL は当初, ミトコンドリア膜の主要な構成リン脂質であるカルジオリピンに対する自己抗体であると考えられていたが, 1990 年, 膠原病患者において検出される aCL はカルジオリピンに直接結合するのではなく, カルジオリピンと結合する際に  $\beta_2$ -glycoprotein I ( $\beta_2$ GP I) という血漿タンパクを必要とすることが明らかとなった<sup>20-22)</sup>. したがって, 本抗体の本質は, 抗カルジオリピン/ $\beta_2$  グリコプロテイン I 抗体である.

さらにその後, aCL は  $\beta_2$ GP I そのものに結合するのではなく, カルジオリピンなどの酸性リン脂質に結合することによって構造変化を起こした  $\beta_2$ GP I 分子上に新たに出現するエピトープを認識し, 結合する抗体であることが示された<sup>23-26)</sup>.

$\beta_2$ GP I は 326 個のアミノ酸残基で構成される分子量約 50kDa の塩基性糖タンパク質であり, 5つのドメイン (ドメイン I - V) により構成されている<sup>27, 28)</sup>. 近年, 欠失変異タンパクや合成ペプチドを用いた研究により,  $\beta_2$ GP I のドメイン V にリン脂質結合部位が存在することが明らかとなった<sup>29-33)</sup>.  $\beta_2$ GP I は血中においてほぼ全て, ドメイン I とドメイン V が結合した環状構造をとっているが, ドメイン V が酸性リン脂質に結合すると, この結合が外れ, 開環し伸展した構造をとる<sup>34)</sup>. この構造変化により, aCL の認識エピトープが露出すると考えられている<sup>34, 35)</sup>.

本抗体は, 固相化カルジオリピンにウシ血清 (ABS) を添加し, ABS 中の  $\beta_2$ GP I を結合させたものを抗原とした ELISA にて測定される (図 1-2).

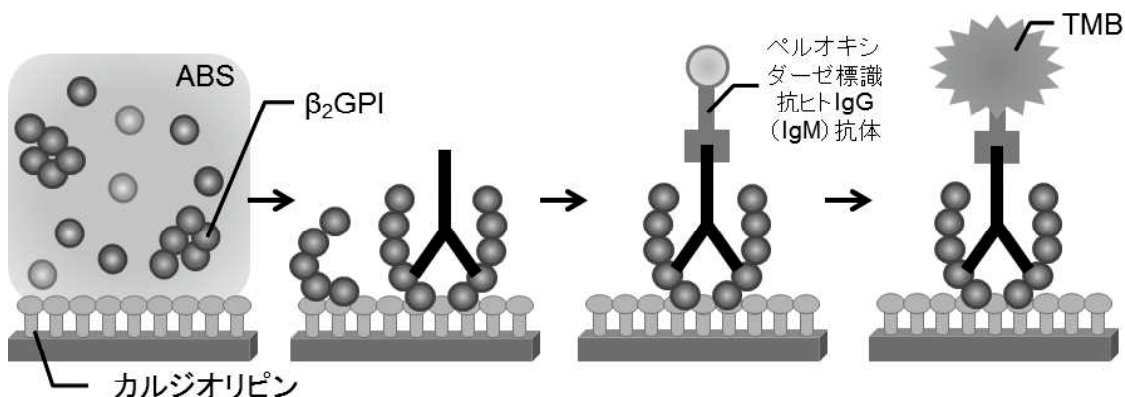


図 1-2. ELISA による抗カルジオリピン抗体の反応様式

### 1.5.3 抗 $\beta_2$ グリコプロテイン I 抗体 ( $\alpha\beta_2$ -glycoprotein I : $\alpha\beta_2$ GP I)

$\beta_2$ GP I は強力な酸化処理を施したプレートに物理吸着した際にも、酸性リン脂質に結合した際と同様の構造変化が生じ、抗体に対するエピトープを発現することが明らかとなっている。これを利用して、固相化リン脂質を用いない ELISA が考案され、この ELISA で測定される抗リン脂質抗体を  $\alpha\beta_2$ GP I と呼ぶ (図 1-3)。

現在 ELISA による抗リン脂質抗体の検出に広く用いられている aCL-ELISA は、その測定原理上、APS との関連が強い抗体以外にも、固相化カルジオリピンに直接結合する抗体なども含めて総合的に測定されている。一方、 $\alpha\beta_2$ GP I -ELISA では  $\beta_2$ GP I 分子上のエピトープに特異的な抗体のみを測定することができ、APS の診断においてその測定意義は高いと考えられる。しかしながら、本抗体の測定キットは国内販売されておらず、一般の検査室には普及していない。

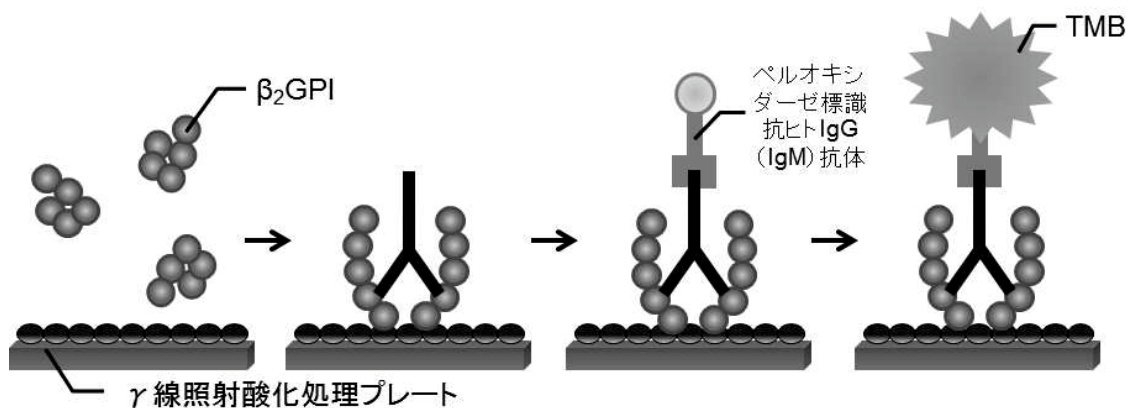


図 1-3. ELISA による抗  $\beta_2$  グリコプロテイン I 抗体の反応様式

#### 1.5.4 抗ホスファチジルセリン/プロトロンビン抗体 (anti-phosphatidylserine/prothrombin antibody : aPS/PT)

抗リン脂質抗体とは、種々のリン脂質結合タンパクに対する抗体の総称であり、“Sapporo Criteria” Sydney 改訂版において APS 診断基準に採用されている抗体以外にも、いくつかのタイプが存在する。

抗ホスファチジルセリン/プロトロンビン抗体 (aPS/PT) は、細胞膜の主要なリン脂質であるホスファチジルセリンにプロトロンビンが結合した際に、プロトロンビン分子上に発現するエピトープを認識する抗体であり<sup>36)</sup>、ホスファチジルセリンを固相化したプレートに、Ca<sup>2+</sup> イオン存在下でプロトロンビンを結合させたものを抗原とする ELISA によって検出することができる (図 1-4)。

本抗体は、LA 活性の原因抗体とも言われ<sup>37)</sup>、近年注目されている抗体であるが、現時点で APS 診断に用いられる検出抗体には採用されておらず、臨床における認知度は未だ低い。

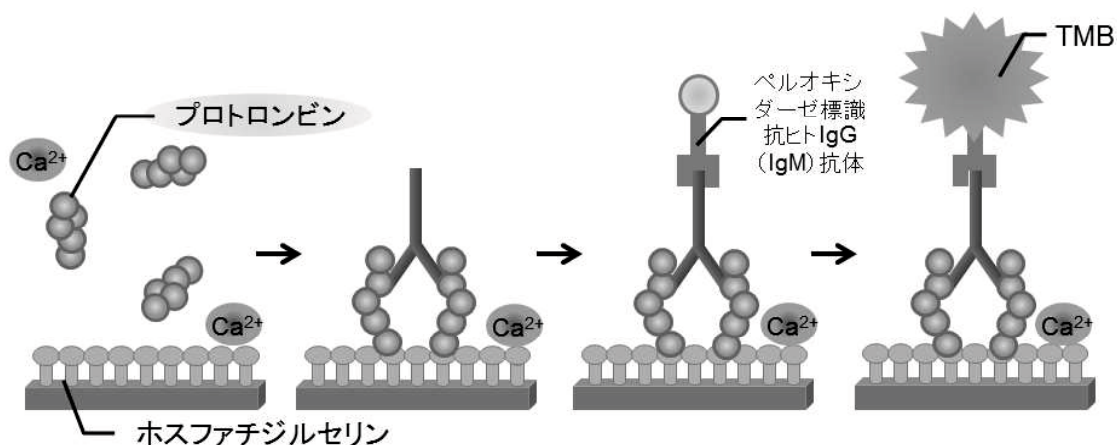


図 1-4. ELISA による抗ホスファチジルセリン/プロトロンビン抗体の反応様式

## 1.6 抗リン脂質抗体症候群の検査診断における問題点

現在、一般の臨床検査部においては、主に LA 活性の検出による検査診断が行われている。しかしながら、LA 検査はスクリーニング試験、クロスミキシング試験、確認試験と多段階の測定系による判定が必要であり、さらに、測定試薬の選択や特別な血漿検体の処理方法が必要である<sup>38)</sup>ことから、非常に煩雑な検査であり、標準化には程遠い。

また、ELISA による抗リン脂質抗体の直接定量に関しても、抗リン脂質抗体は抗原特異性が多様な抗体群であることが明らかとなっており<sup>39)</sup>、一種類の ELISA による抗体測定のみでは、多くの症例が見逃される可能性がある。しかしながら、日本で保険収載・販売されている ELISA キットは aCL-IgG を検出するキットのみであり、ELISA による検査では他の抗リン脂質抗体により引き起こされる APS 症例を検知できないのが現状である。

## 1.7 抗リン脂質抗体による血栓形成機序

近年の研究により、抗リン脂質抗体は血管内皮細胞表面においてリン脂質を介した抗血栓機構を阻害する<sup>40)</sup>ことや、血小板や単球・マクロファージ、血管内皮細胞などを活性化し、種々の血栓形成作用を示すことが明らかとなってきた<sup>41-47)</sup>。

抗リン脂質抗体が活性化プロテイン C (APC) 系凝固制御機構を阻害することが多くの研究者により報告されている<sup>48,49)</sup>。APS 患者では後天性に APC レジスタンス反応を示す症例がしばしば確認され、このような患者では静脈血栓症が好発する<sup>50)</sup>。また、抗リン脂質抗体が活性化血小板の膜表面に結合することにより血小板の活性化を亢進し、トロンボキサン A2 の産生を促すことも証明されている<sup>42,43)</sup>。APS において多発する脳血管障害の発症に、血小板活性化促進による血小板血栓の形成が強く関連していると推測される。

さらに、最近注目されている血栓形成機序として、抗リン脂質抗体が単球・マクロファージや血管内皮細胞表面に結合して細胞を活性化させることにより、細胞表面組織因子 (Tissue Factor: TF) の発現や炎症性サイトカインの産生を亢進させることが考えられている<sup>41-47)</sup>。特に抗リン脂質抗体が細胞表面 TF 発現を増幅させる作用は、動脈血栓症と静脈血栓症の両方の発症機序に関連していることが示唆されており、APS に関連する多彩な血栓性合併症の中心的な病因と推測される。

しかしながら、抗リン脂質抗体が単球・マクロファージや血管内皮細胞の TF 発現を招く詳細な機序は未だ解明されておらず、抗リン脂質抗体による血栓形成機序には不明な点が多い。

## 1.8 本研究の目的

本研究では、臨床研究と基礎研究の双方から抗リン脂質抗体の血栓形成作用を検討し、APS の病態発症機序の解明を進めるとともに、各種抗リン脂質抗体を種類別に測定できる ELISA を開発して、APS の臨床病態に関連の強い抗体を特定し、ELISA を用いた APS の新たな臨床検査診断法の確立を目指す。

## 第2章

# 抗リン脂質抗体による動脈血栓塞栓症発症機序の解明

### 2.1 研究背景および目的

APSは患者の多くが30代から40代の比較的若い女性であり、高血圧症や脂質異常症といったリスクファクターの有無に関わらず、患者のおよそ半数が動脈血栓塞栓症を発症しており、その発症機序の解明は重要な課題である。近年、血管内の種々の細胞表面における組織因子(TF)の発現がAPSにおける血栓形成に関与していることが指摘されている<sup>47,51)</sup>。そこで、本研究では、抗リン脂質抗体の存在と動脈血栓塞栓症発症との関連を明らかにするとともに、抗リン脂質抗体が血栓形成を惹起する機序について、TF発現に及ぼす影響を中心に検討を行った。

### 2.2 対象および方法

#### 2.2.1 対象

APSの基礎疾患として最も代表的なSLE患者89例(男女比=3:86, 平均年齢39.8歳[8~76歳])を対象とした。ABIおよび各種画像検査の結果、89例中16例において閉塞性動脈硬化症(ASO)が確定診断されている。

患者の血漿検体は、採血後、静脈血9容に対し3.13%クエン酸ナトリウム1容を添加することにより抗凝固し、速やかに2800gにて15分遠心して分離した血漿を-80℃にて保管したものをを用いた。なお、本検討には、多施設から「抗リン脂質抗体の診断および研究」を目的とした旨の説明文にて、患者さんからインフォームドコンセントを取得した上で、集積・保存された過去の血漿サンプルを用いた。

#### 2.2.2 フローサイトメトリー

EDTA-2K加真空採血管に末梢血を採取し、全血100 $\mu$ lにPE標識抗ヒトCD14抗体(Dako Cytomation)を5 $\mu$ l, FITC標識抗human TF抗体(#4508CJ; American Diagnostica)を10 $\mu$ l添加し、室温暗所にて20分間反応させた。また、陰性コントロールとして、抗human TF抗体の代わりに、FITC標識マウスIgG1を添加した。IMMUNOPREPT<sup>TM</sup>試薬システム(Beckman Coulter)とTQ-Prep<sup>TM</sup>ワークステーション(Beckman Coulter)を用いて溶血固定し、PBSを2ml加え、600gにて5分間遠心し、上清を取り除いた。細胞をPBSにて洗浄後、PBS 500 $\mu$ lに再浮遊させ、フローサイトメトリーで解析した。解析にはBeckman Coulter FC500 cytometer(Beckman Coulter)を用い、CD14-PE陽性細胞分画(単球分画)にゲーティングをかけ、マウス

IgG1-FITC を陰性コントロールとして、細胞表面に TF を発現している単核球の割合を測定した。

### 2.2.3 抗リン脂質抗体の検出

抗カルジオリピン/ $\beta_2$  グリコプロテイン I 抗体 (aCL/ $\beta_2$ GP I) の測定には、anti-CL/ $\beta_2$ -GP I ELISA kit (ヤマサ醤油株式会社) を用いた。

また、抗ホスファチジルセリン/プロトロンビン抗体 (aPS/PT) の測定には、anti-PS/PT IgG ELISA kit (コスミック株式会社) を用いた。

LA 活性の有無については、Staclot LA<sup>®</sup> (Roche Diagnostics 社) と Gradipore-LA (MBL 社) にて実施した。

### 2.2.4 IgG 精製

Protein G Sepharose カラム (Pharmacia LKB Biotechnology) を用いて、代表的な SLE 患者および健常人血漿より IgG 分画を分離・精製した。IgG の純度は SDS-PAGE により確認し、使用時まで $-80^{\circ}\text{C}$ にて保存した。

### 2.2.5 末梢血からの単核球分離

健常人より末梢血を採取し、ヘパリンで抗凝固処理したのち、血液をその 2 倍量の phosphate-buffered saline (PBS) で希釈した。Leucosep<sup>®</sup>チューブ (greiner bio-one) に分離液 (Ficoll-Paque<sup>™</sup> Plus: 比重 1.077g/ml, GE Healthcare) を 15ml 入れ、1000g・30 秒間遠心し前処理したチューブに、希釈した血液を 30ml 加えて、さらに 1000g・10 分間遠心分離した。分離液と上清の境界部にある単核球層を回収し、PBS 10ml を加え希釈した細胞浮遊液を 400g・5 分間遠心し、上清を除去した。沈殿した細胞を PBS 5ml で 2 回洗浄した後、適量の培養液で浮遊させ、細胞数を調整し、単核球浮遊液とした。培養液は 10% Fetal Bovine Serum (GIBCO) 加 RPMI-1640 (GIBCO) にペニシリン・ストレプトマイシン (ペニシリン G: 100 unit/ml, ストレプトマイシン: 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ , GIBCO) を加えたものを使用した。

### 2.2.6 mRNA 発現解析

正常単核球に各 IgG を添加し、TF・TNF- $\alpha$ ・IL-18 の各 mRNA 発現量をリアルタイム PCR 法にて定量した。

単核球浮遊液を細胞数  $30 \times 10^4$  個/ml に調整し、6well プレートに 2ml/well (細胞数:  $60 \times 10^4$  個/well) で加え、 $37^{\circ}\text{C}$ ・5%CO<sub>2</sub> にて一晩インキュベートした。ウェルから培養液を取り除き、刺激剤 (IgG: 5mg/ml, LPS: 50ng/ml) を加え、 $37^{\circ}\text{C}$ ・5%CO<sub>2</sub> にて 2 時間インキュベートしたのち、ウェルを PBS で洗浄して TRIzol<sup>®</sup> Reagent (invitrogen) にて細胞を溶解し、RNA の抽出まで $-80^{\circ}\text{C}$ にて凍結保存した。

RNA の抽出は, TRIzol® Reagent の添付書に従った. 抽出した RNA は ReverTra Ace® qPCR RT Kit (TOYOBO) を用いて cDNA に変換し, 測定まで  $-20^{\circ}\text{C}$  にて凍結保存した.

リアルタイム PCR には, プライマー・プローブに TaqMan® Gene Expression Assays (TF : Hs01076032\_m1, TNF- $\alpha$  : Hs99999043\_m1, IL-18 : Hs99999029\_m1, Applied Biosystems) を用い, マスターミックス試薬に TaqMan® Gene Expression Master Mix (Applied Biosystems) を用いて, StepOnePlus™ リアルタイム PCR システム (Applied Biosystems) にて解析した. なお, 内在性コントロールとして GAPDH (プライマー・プローブ : Pre- Developed TaqMan® Assay Reagents Human GAPDH, Applied Biosystems) を使用した.

### 2.2.7 サイトカイン産生量解析

正常単核球に各 IgG を添加し, 培養上清中に産生される TNF- $\alpha$ ・IL-18・IL-6 の濃度を ELISA にて定量した.

単核球浮遊液を細胞数  $4 \times 10^4$  個/ml に調整し, 24well プレートに 500 $\mu\text{l}$ /well (細胞数 :  $2 \times 10^4$  個/well) 入れ,  $37^{\circ}\text{C}$ ・5%CO<sub>2</sub> にて 2 時間インキュベートした. 刺激剤を終濃度 IgG : 5mg/ml, LPS : 10ng/ml になるよう調製して 500 $\mu\text{l}$ /well 加え, さらに 4 時間インキュベートした後, 上清を回収し, TNF- $\alpha$ ・IL-18・IL-6 濃度を各 ELISA キット (Beckman Coulter) により定量した. 測定手順はキット添付の方法に従った. なお, 培養上清は測定まで  $-80^{\circ}\text{C}$  にて凍結保存した.

### 2.2.8 統計解析

ASO の有無による単球 TF 発現率の比較には, Mann-Whitney U 検定を実施した. また, TF 高発現群と通常群の各群における ASO 発症率および aCL/ $\beta_2$ GP I 陽性率については,  $\chi^2$  乗検定を実施した. なお, 各種統計解析は Stat Flex® ver.6 にて行い,  $P < 0.01$  を統計学的に有意とした.

## 2.3 結果

### 2.3.1 閉塞性動脈硬化症の発症と単球表面組織因子発現との関係

閉塞性動脈硬化症 (arteriosclerosis obliterans: ASO) は動脈血栓塞栓症発症のベースとなりうる病態であり, APS 患者において, その罹患率が高いことが報告されている. そこで, SLE 89 例を対象に, ASO の発症と単球表面 TF 発現率との関係を検討した.

本検討には, 採血直後に溶血固定した検体を用いた. フローサイトメーターを用い, CD14 陽性細胞を単球として, 単球における細胞表面 TF 陽性細胞の割合を測定した. SLE 症例における TF 発現単球の割合を, ASO を有する症例 (16 例) と有さない症例 (73 例) とで比較した.

結果, TF 発現単球の割合は, ASO を有する SLE 症例では  $37.5 \pm 26.1\%$  (mean $\pm$ SD) となり, ASO でない SLE 症例の  $11.6 \pm 15.3\%$  に比べ, 有意に高値を示した ( $P < 0.0001$ , Mann-Whitney U 検定, 図 2-1).

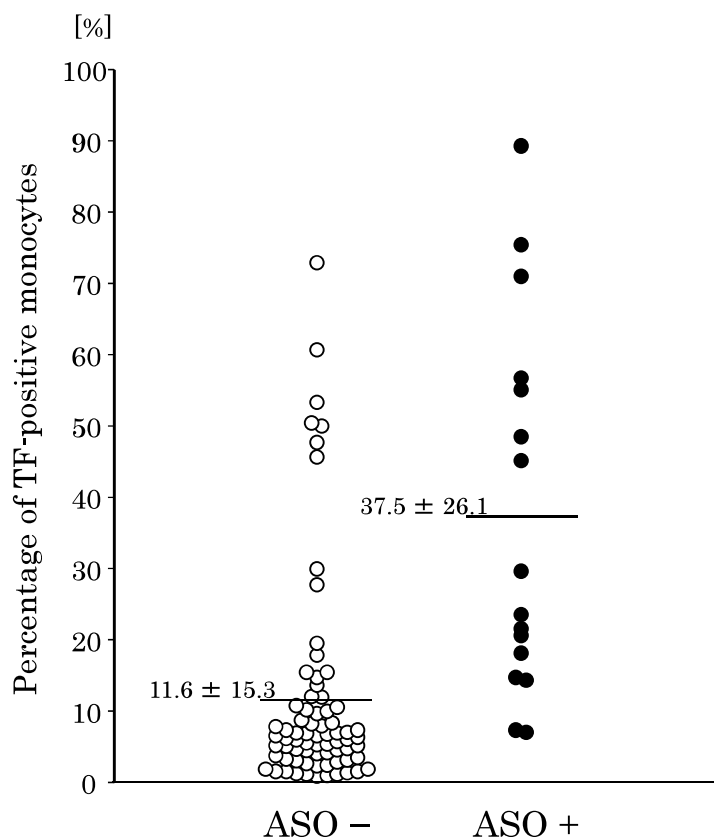


図 2-1. ASO の有無による 単球 TF 発現率の比較

SLE 患者 89 例を対象に, 閉塞性動脈硬化症 (ASO) を認めなかった 73 例と ASO を認めた 16 例の 2 群に分け, 細胞表面に組織因子 (TF) を発現している単球の割合を比較した. 図中の数値は各群における mean  $\pm$  SD を示している.



次に、血栓症の既往がなく、血液検査や自己抗体検査等に異常を認めなかった健常人 47 名（男女比=10 : 37, 平均年齢 44.4 歳 [22~74 歳]）を対象に測定した細胞表面 TF 発現単球の割合から、平均値+3SD（11.2%）をカットオフ値と定め、11.2%以上の単球に TF 発現が認められた場合を TF 高発現とした。SLE 症例を TF 高発現群と TF 通常群とに分け、TF 発現と ASO 発症との関連を  $\chi^2$  乗検定にて検討した。

結果、ASO 発症率は TF 通常群では 3.4%であったのに対し、TF 高発現群では 45.2%と非常に高かった（オッズ比 23.1 [95%CI : 6.5~81.3],  $P < 0.0001$ , 表 2-1）。

表 2-1. 単球表面の TF 発現と ASO の有無との関連

TF expression	ASO		P value
	Positive	Negative	
High expression	14 (45.2%)	17 (54.8%)	< 0.0001
Normal expression	2 (3.4%)	56 (96.6%)	

ASO, arteriosclerosis obliterans; TF, tissue factor.

### 2.3.2 単球表面組織因子発現と抗カルジオリピン/ $\beta_2$ グリコプロテイン I 抗体との関連

先の検討により、SLE では単球表面の TF 発現が亢進している症例において ASO の発症率が高いことが明らかとなった。そこで、TF 発現の亢進に抗リン脂質抗体が関与しているのかを調べるために、SLE 患者血漿中の抗カルジオリピン/ $\beta_2$ グリコプロテイン I 抗体（aCL/ $\beta_2$ GPI）を測定し、SLE 患者における単球表面 TF 発現と本抗体の有無との関連を検討した。

結果、TF 高発現群における aCL/ $\beta_2$ GPI 陽性率は 64.5%であり、TF 通常群の 10.3%に比べ有意に高値であった（オッズ比 15.8 [95%CI : 5.7~43.2],  $P < 0.0001$ , 表 2-2）。また、SLE89 症例における細胞表面 TF 発現単球の割合と血漿中 aCL/ $\beta_2$ GPI 抗体価の相関は、スピアマンの順位相関係数 0.5203 となり、正の相関を認めた。

表 2-2. 単球表面の TF 発現と aCL/ $\beta_2$ GPI の有無との関連

TF expression	aCL/ $\beta_2$ GPI		P value
	Positive	Negative	
High expression	20 (64.5%)	11 (35.5%)	< 0.0001
Normal expression	6 (10.3%)	52 (89.7%)	

aCL/ $\beta_2$ GPI, anti-cardiolipin/ $\beta_2$ -glycoprotein I antibodies; TF, tissue factor.

### 2.3.3 抗リン脂質抗体が単核球のTFおよび炎症性サイトカインmRNA発現に及ぼす作用

抗リン脂質抗体が、健常人末梢血由来単核球のTF発現および炎症性サイトカイン産生にどのような影響を及ぼすのか、*in vitro*の実験系にて検討した。

実験には健常人より末梢血単核球(PBMC)を採取し、使用した。2種類の代表的な抗リン脂質抗体であるaCL/β<sub>2</sub>GP IおよびaPS/PTがともに陽性のSLE患者血漿より精製したIgG [aPLs(+) IgG] 8例、aCL/β<sub>2</sub>GP IおよびaPS/PTがともに陰性のSLE患者血漿より精製したIgG [aPLs(-) IgG] 6例、主要な臨床検査値に異常を認めず血栓症の既往がない健常人血漿より精製したIgG [Normal IgG] 6例(表2-3)を用いて、PBMCへの添加実験を行い、PBMCにおける各種mRNAの発現量をリアルタイムPCR法にて測定した。

まず、各種IgG添加後2時間におけるTF mRNA発現量を検討した。Normal IgGおよびaPLs(-) IgGの添加時には、今回使用した各6例全てにおいてTF mRNA発現はあまり認められなかったが、aPLs(+) IgG添加時では、8例全てにおいて明らかなTF mRNA発現の増幅が認められた(図2-2)。

次に、炎症性サイトカインであるTNF-αおよびIL-1βについて、各種IgG添加後2時間におけるPBMCのmRNA発現量について検討した。TNF-α mRNA, IL-1β mRNAとも、TF mRNAと同様にNormal IgGおよびaPLs(-) IgGの添加時にはあまり発現が認められず、aPLs(+) IgG添加時のみ明らかな発現増幅を認めた(図2-2)。

### 2.3.4 抗リン脂質抗体が単核球の各種炎症性サイトカイン産生に与える影響

PBMCに各種IgG [aPLs(+) IgG : 4例, aPLs(-) IgG : 4例, Normal IgG : 5例]を添加した際に、PBMCから産生・分泌される各種炎症性サイトカイン、TNF-α・IL-1β・IL-6について、培養上清中の濃度をELISA kitにて測定した。

いずれの炎症性サイトカインについても、Normal IgGおよびaPLs(-) IgG添加時の産生量はごくわずかであったのに対し、aPLs(+) IgG添加時ではTNF-α・IL-1β・IL-6の明らかな産生を認めた(図2-3)。

PBMCによる反応性の差異を検討するため、3名の健常人より採取したPBMCについてaPLs(+) IgGの添加実験を行ったところ、培養上清のTNF-α濃度はPBMCの由来により差が認められたものの、いずれのPBMCからも明らかなTNF-αの産生が認められた(図2-4)。

表 2-3. 各 IgG の由来患者および健常人データ

IgG	Age/Sex	LA activity	aCL/ $\beta_2$ GPI (U/ml)	aPS/PT (U/ml)	Thromboembolic complications
aPLs(+)-1 <sup>a</sup>	48/F	+	556.85	121.55	IHD, CVD, ASO
aPLs(+)-2	55/F	+	38.91	100.28	IHD, ASO
aPLs(+)-3	39/F	+	72.55	21.93	IHD, CVD, ASO
aPLs(+)-4	57/M	+	825.40	32.95	IHD, ASO
aPLs(+)-5	32/F	+	105.21	88.24	IHD, ASO
aPLs(+)-6	58/F	+	34.37	26.32	IHD, ASO
aPLs(+)-7	51/M	+	115.30	43.98	IHD, ASO
aPLs(+)-8	38/F	+	251.85	35.69	IHD, CVD, ASO
aPLs(-)-1 <sup>b</sup>	74/F	-	< 1.30	<1.56	CVD
aPLs(-)-2	26/F	-	< 1.30	<1.56	
aPLs(-)-3	38/F	-	< 1.30	1.62	
aPLs(-)-4	10/F	-	< 1.30	<1.56	
aPLs(-)-5	48/F	-	< 1.30	<1.56	
aPLs(-)-6	60/F	-	< 1.30	9.26	
Normal-1 <sup>c</sup>	34/F	-	< 1.30	<1.56	
Normal-2	25/F	-	< 1.30	<1.56	
Normal-3	38/F	-	< 1.30	<1.56	
Normal-4	42/M	-	< 1.30	<1.56	
Normal-5	51/M	-	< 1.30	<1.56	
Normal-6	55/F	-	< 1.30	<1.56	

ASO, arteriosclerosis obliterans; CVD, cerebral vascular disorder; IHD, ischemic heart disease; LA, lupus anticoagulant.

<sup>a</sup>aPLs(+) IgG は 8 名の APS 患者血漿より精製した.

<sup>b</sup>aPLs(-) IgG は 6 名の SLE 患者血漿より精製した.

<sup>c</sup>Normal IgG は 6 名の健常人血漿より精製した.

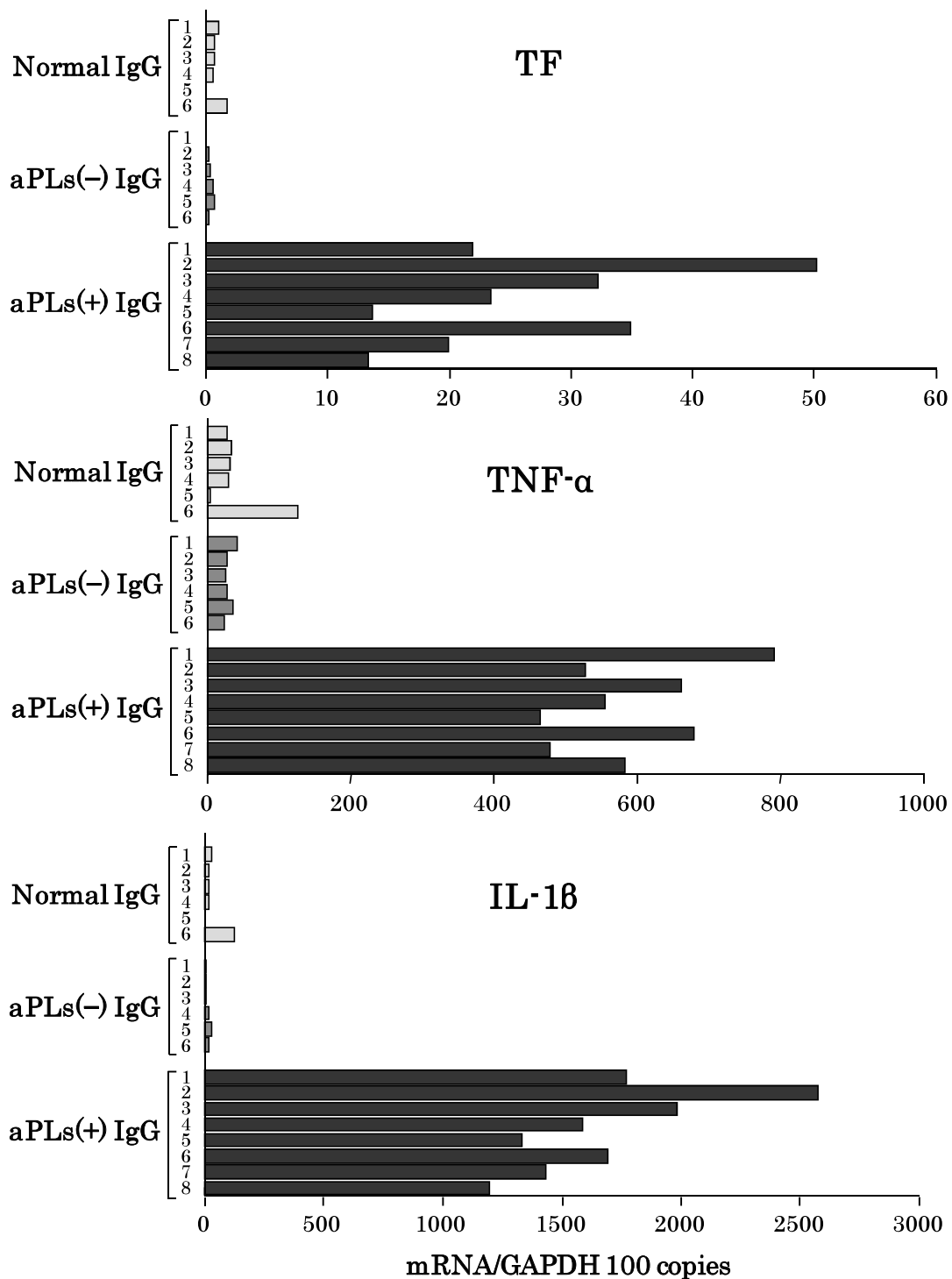


図 2-2. PBMC における TF, TNF- $\alpha$ , IL-18 mRNA 発現に対する各種 IgG の影響  
 aPLs(+) IgG, aPLs(-) IgG または Normal IgG の添加後 2 時間における PBMC 中の TF, TNF- $\alpha$ , IL-18 mRNA 量を定量 PCR にて測定した. aPLs(-) IgG や Normal IgG の添加では, いずれの mRNA 発現にも変化は見られなかったが, aPLs(+) IgG 添加により, TF, TNF- $\alpha$ , IL-18 mRNA の発現が著しく増加した.

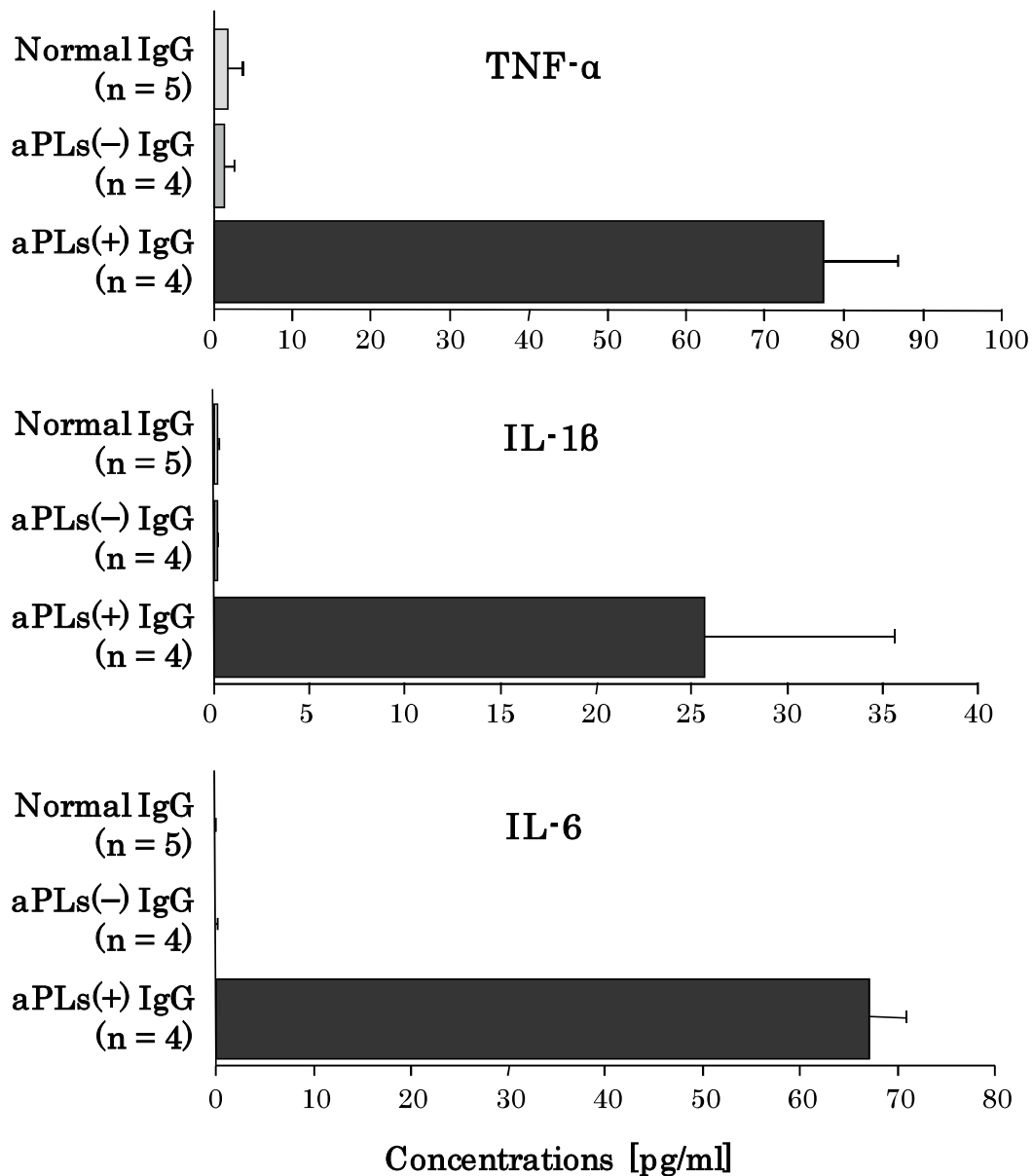
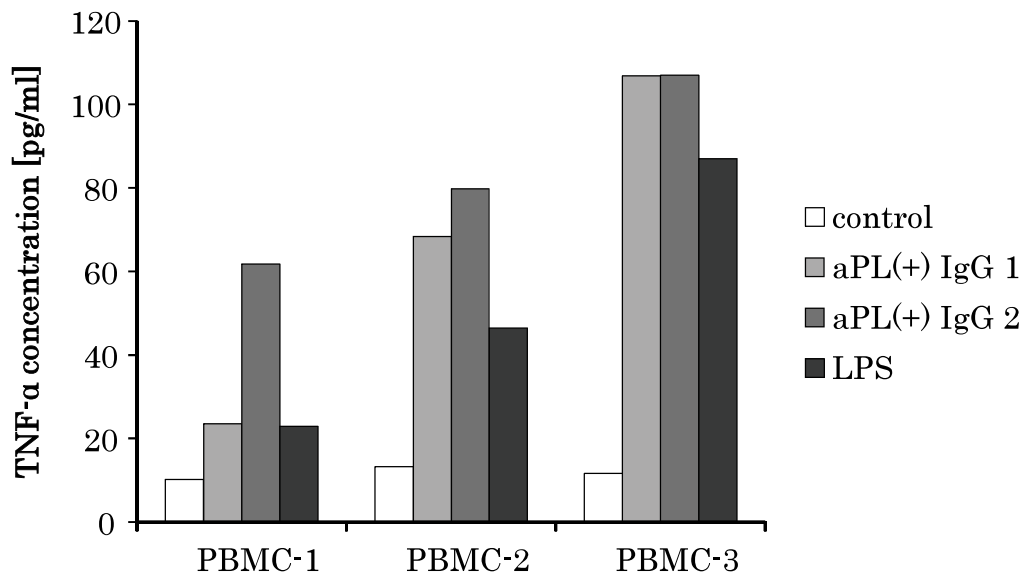


図 2-3. PBMC の TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 産生に対する各種 IgG の影響

PBMC を aPLs(+) IgG, aPLs(-) IgG または Normal IgG にて 4 時間刺激した際の培養上清における TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  および IL-6 濃度を ELISA にて測定した。Normal IgG と aPLs(-) IgG では TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 濃度に違いは見られなかったが, aPLs(+) IgG 添加時には Normal IgG や aPLs(-) IgG 添加時に比べ TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 の産生が著しく増加した。結果は mean  $\pm$  SE にて示している。



**図 2-4. PBMC の由来の違いによる TNF- $\alpha$  産生量の比較**

3名の異なる健康人より採取したPBMCをそれぞれaPLs(+)IgGにて4時間刺激し、培養上清のTNF- $\alpha$ 濃度をELISAにて測定した。PBMCにより産生量に差はあるが、いずれのPBMCにおいても明らかなTNF- $\alpha$ の産生を認めた。

## 2.4 考察

APS は動脈・静脈を問わず全身の血管に繰り返し血栓を生じる特徴的な疾患である。中でも、脳血管障害をはじめとする動脈血栓塞栓症は APS において発症率が高く、その発症機序の解明は強く望まれるところである。一般に動脈血栓塞栓症のリスクファクターとしては、高血圧症や脂質異常症、糖尿病、肥満、喫煙などが挙げられるが、APS 患者においてはこれらの所見はあまり認められず、抗リン脂質抗体の存在こそが発症のリスクファクターとなることが明らかとなっている<sup>52)</sup>。本検討では、抗リン脂質抗体が血栓症の発症を促進する可能性として TF 発現の惹起と炎症の誘発に焦点をあて、臨床検討と基礎検討の双方から解析を試みた。

本検討により、APS の代表的な基礎疾患である SLE 患者において、単球表面 TF の高発現が ASO の発症や aCL/β<sub>2</sub>GP I の存在と強く関連していることが明らかとなった。このことから、SLE 患者の ASO 発症には、抗リン脂質抗体による単球の TF 発現が一つの要因となる可能性が考えられる。今回の症例において、ASO 発症者のうち 24%が脳血管障害、36%が虚血性心疾患を発症しており、抗リン脂質抗体が ASO の発症、ひいては動脈血栓塞栓症の重要なリスクファクターとなることが示唆される。また、他の臨床研究においても、単球の TF 発現が心血管疾患のリスクとなることが報告されている<sup>53-55)</sup>。さらに、aCL/β<sub>2</sub>GP I 陽性者における TF 発現の亢進と、aCL/β<sub>2</sub>GP I による単球の TF 発現が APS 患者における凝固活性の上昇を引き起こす可能性についても多数報告されており<sup>53,54,56)</sup>、aCL/β<sub>2</sub>GP I の存在は血栓塞栓症発症の重大なリスクとなることが示唆される。

抗リン脂質抗体と単球 TF 発現との間に関連が認められたことから、患者由来の IgG を用いた検討を行ったところ、抗リン脂質抗体陽性 SLE 患者由来 IgG には正常 PBMC の TF 発現を惹起する作用が認められた。この作用は、抗リン脂質抗体陰性 SLE 患者由来 IgG には認められなかったことから、SLE 患者が有する他の自己抗体ではなく、抗リン脂質抗体によるものと考えられる。*in vitro*において抗リン脂質抗体が単球の TF 発現を引き起こすことを示し、本結果を支持する報告がいくつかある。主たるものとして、Roubey らが原発性の APS 患者から分離・精製した IgG や aβ<sub>2</sub>GP I のモノクローナル抗体により、正常単球の TF 発現 が促進されたことを報告している<sup>54,55)</sup>。また、APS 患者の B 細胞から樹立した aβ<sub>2</sub>GP I モノクローナル抗体が、β<sub>2</sub>GP I 依存性に単球の TF 活性および TF mRNA 発現を上昇させたことも報告されている<sup>57,58)</sup>。aCL/β<sub>2</sub>GP I と aβ<sub>2</sub>GP I はともに、β<sub>2</sub>GP I 分子上のエピトープを認識する抗体であり、β<sub>2</sub>GP I を介した単球表面への抗体の結合が、TF の発現を招くと考えられる。

さらに、抗リン脂質抗体には炎症性サイトカイン TNF-α・IL-18・IL-6 の産生を誘導する作用があることも明らかとなった。他の報告を見ても、aβ<sub>2</sub>GP I モノクローナル抗体が単球の TNF-α 産生を促進することや、原発性 APS および二次性 APS 患者では血清中 TNF-α 濃度が高いことが示されている<sup>59,60)</sup>。血清中 TNF-α 濃度の増加は、活性化プロテイン C による凝固制御作用および炎症制御作用を阻害することが知られており<sup>61)</sup>、APS 患者におけ

る TNF- $\alpha$  をはじめとした炎症性サイトカインの産生増加は、易血栓性や炎症反応を招くと推測される。

本検討で得られた知見から、APS 患者では、抗リン脂質抗体の慢性的な刺激により、単球表面の TF 発現や種々の炎症性サイトカインの産生が亢進し、TF 依存性の血栓形成やサイトカイン誘発性の炎症反応が増幅されることにより、動脈血栓塞栓症を繰り返し発症すると考えられる。

## 2.5 小括

APS 患者における血栓塞栓症の発症には、一般に知られている脂質異常症等を伴う機序に加え、別の機序の存在が考えられている。今回、APS の基礎疾患である SLE 患者を対象に、その機序の一端の解明を試みた。結果、抗リン脂質抗体を有する患者では、生体内単球の TF 発現が亢進していることや、単球の TF 発現が動脈血栓塞栓症の発症に関連していることが明らかとなった。また、抗リン脂質抗体の作用を *in vitro* で検討した結果、抗リン脂質抗体には単核球の TF 発現や炎症性サイトカイン産生を促進する作用があることが示唆された。これらの結果から、APS 患者の動脈血栓塞栓症には TF 依存性の血栓形成と炎症反応との相乗効果という機序の存在が考えられる。今回の検討では単核球に焦点をあてたが、今後、血管内腔を覆う血管内皮細胞に対する抗リン脂質抗体の作用や、単核球と血管内皮細胞との相互作用を詳細に解明し、血栓塞栓症発症のキーとなる現象およびそれに至るシグナル伝達系を明らかにすることで、APS 患者における血栓塞栓症再発の予防や APS の治療につながる事が大いに期待される。



## 第3章

# 抗リン脂質抗体症候群の臨床検査診断法の確立

### 3.1 研究背景および目的

APS の検査診断には抗リン脂質抗体の検出が必須であり、現在の APS 診断分類基準改定案、“Sapporo Criteria” Sydney 改訂版では、ガイドラインに基づいた測定手順による LA 活性の定性試験と、標準化された ELISA による抗カルジオリピン抗体 (aCL) および抗  $\beta_2$  グリコプロテイン I 抗体 (a $\beta_2$ GP I) の定量試験が採用されている。LA 検査は、判定までにスクリーニング試験・クロスミキシング試験・確認試験と多段階の測定系を必要とし、一般の検査室ではルーチン検査に組み込むことが難しいとされている。また、本検査は血漿中の残存血小板の影響を受けることや、測定に用いる試薬により検出感度が大きく異なることから、LA 検査用の血漿検体処理や試薬の選択が必要となり、標準化には程遠いのが現状である。一方、ELISA による定量試験についても問題がある。APS の発症に重要な意味を持つとされる抗リン脂質抗体は、リン脂質に直接結合する抗体ではなく、リン脂質に結合したタンパクを認識する抗体であり、リン脂質とリン脂質結合タンパクの組合せにより、認識するエピトープの異なる多数の抗リン脂質抗体が存在する<sup>39)</sup>。APS 患者血中には複数の抗体が混在していることが知られているが、“Sapporo Criteria” Sydney 改訂版に採用されている 2 種類の抗リン脂質抗体はいずれも  $\beta_2$ GP I 分子上のエピトープを認識する抗体であり、他の抗原を認識する抗体は測定されない。したがって、 $\beta_2$ GP I に対する抗体以外の抗リン脂質抗体のみを有する患者は診断基準を満たさず、見逃されていることが危惧される。

そこで、本検討では、種々の抗リン脂質抗体を検出する ELISA 系を確立し、各種抗体と APS の多彩な合併症との関連を統計学的に解析することで、APS 検査診断に際し、有用性の高い抗体を検討する。

### 3.2 対象および方法

#### 3.2.1 対象

SLE 患者 184 例 (平均年齢 45.4 歳[19~82 歳], 男女比=10 : 174) を対象とした。本検討には、多施設から「抗リン脂質抗体の診断および研究」を目的とした旨の説明文にて患者さんからインフォームドコンセントを取得した上で、集積・保存された過去の血漿サンプルを用いた。各症例は、臨床経過を 10 年間以上追跡調査されており、各種画像

診断および臨床所見により，血栓症 71 例（動脈血栓症 32 例，静脈血栓症 39 例），習慣流産 24 例，さらに APS 関連血小板減少症 19 例が確定している（表 3-1）。

表 3-1. 対象症例（SLE 患者 184 例）

	症例数 [男:女]	平均年齢 [最小～最大]
APS症状のないSLE群	97 [5:92]	44.8 [20～80]
動・静脈血栓症群(①)	71 [5:66]	46.3 [19～82]
習慣流産群(②)	24 [0:24]	40.7 [22～66]
血小板減少症群(③)	19 [2:17]	47.3 [27～78]
全症例	184 [10:174]	45.4 [19～82]
①②③重複例	5 [0:5]	44.4 [35～66]
①②重複例	7 [0:7]	38.0 [22～49]
①③重複例	10 [2:8]	45.3 [27～66]

### 3.2.2 ELISA による測定法の確立

プレートは，96 穴ポリスチレンプレートである Nunc イムノプレートポリソープ，または， $\gamma$  線照射により酸化処理が施されたプレートである Nunc イムノプレートマキシソープを用いた。測定に際し，基本バッファーとして 0.01M PBS または 0.02M TBS (0.02M Tris-HCl, 0.1M NaCl, 5mM CaCl<sub>2</sub>) を用いた。なお，バッファーの選択はエピトープ提供タンパクの種類によって決定し，カルシウム依存性にリン脂質に結合することが知られているプロトロンビン・アネキシン A2・アネキシン A5 を抗原とする測定系では TBS を用いた。well の洗浄は 0.05% Tween20 加 PBS または TBS を用い，200 $\mu$ l/well にて 4 回行った。各種抗リン脂質抗体の標準物質が存在しないため，ELISA 毎に全 184 症例を同一試薬にて同時に測定し，吸光度にて抗体価を比較できるよう配慮した。

#### ① aCL (図 3-1A)

ポリソーププレートにカルジオリピン (50 $\mu$ g/ml) を 30 $\mu$ l/well 添加し，冷風にてドライアップ後，0.5 %ウシ血清アルブミン (BSA) 加 PBS にて 2 時間ブロッキングした。well を洗浄後，患者血清 (0.5%BSA および 0.05% Tween20 加 PBS にて 101 倍希釈) を 50 $\mu$ l/well 添加して 1 時間室温にて静置した。well を洗浄後，ペルオキシダーゼ標識抗ヒト IgG 抗体を添加し，1 時間反応させた。well を洗浄後，TMB を 100 $\mu$ l/well 添加し 30 分間反応させ，1N HCl を 100 $\mu$ l/well 添加することで反応停止後，450nm における吸光度を測定した。

本測定系で検出される抗体は、APS 診断基準中の aCL/ $\beta_2$ GP I とは異なり、固相化 CL に直接結合する抗体 aCL である。

② aCL/ $\beta_2$ GP I (図 3-1B)

ポリソーププレートにカルジオリピン (50 $\mu$ g/ml) を 30 $\mu$ l/well 添加し、冷風にてドライアップ後、0.5 %BSA 加 PBS にて 2 時間ブロッキングした。well を洗浄後、 $\beta_2$ GP I (5 $\mu$ g/ml, SCIPAC) を 50 $\mu$ l/well 添加、30 分静置した後に患者血清 (0.5%BSA および 0.05%Tween20 加 PBS にて 101 倍希釈) を 50 $\mu$ l/well 添加、室温にて 1 時間静置した。well を洗浄後、TMB を 100 $\mu$ l/well 添加し 30 分間反応させ、1N HCl を 100 $\mu$ l/well 添加し、450nm における吸光度を測定した。

③ a $\beta_2$ GP I (図 3-1C)

マキシソーププレートに  $\beta_2$ GP I (5 $\mu$ g/ml) を 50 $\mu$ l/well 添加し、4 $^{\circ}$ C にて一晩静置した。well を洗浄後、0.5 %BSA 加 PBS にて 2 時間ブロッキングした。well を洗浄し、患者血清 (0.5%BSA および 0.05%Tween20 加 PBS にて 101 倍希釈) を 50 $\mu$ l/well 添加して室温にて一時間静置した。well を洗浄後、ペルオキシダーゼ標識抗ヒト IgG 抗体を添加し、1 時間反応させた。well を洗浄後、TMB を 100 $\mu$ l/well 添加し 10 分間反応させ、1N HCl を 100 $\mu$ l/well 添加後、450nm における吸光度を測定した。

④ aPS (図 3-1D)

ポリソーププレートにホスファチジルセリン (50 $\mu$ g/ml) を 30 $\mu$ l/well 添加し、冷風にてドライアップ後、0.5 %BSA 加 TBS にて 2 時間ブロッキングした。well を洗浄後、患者血清 (0.5%BSA および 0.05%Tween20 加 PBS にて 101 倍希釈) を 50 $\mu$ l/well 添加して室温にて 1 時間静置した。well を洗浄後、TMB を 100 $\mu$ l/well 添加し 30 分間反応させ、1N HCl を 100 $\mu$ l/well 添加し、450nm における吸光度を測定した。

⑤ aPS/PT (図 3-1E)

ポリソーププレートにホスファチジルセリン (50 $\mu$ g/ml) を 30 $\mu$ l/well 添加し、冷風にてドライアップ後、0.5%BSA 加 TBS にて 2 時間ブロッキングした。well を洗浄後、プロトロンビン (5 $\mu$ g/ml) を 50 $\mu$ l/well 添加、30 分静置後、患者血清 (0.5%BSA および 0.05%Tween20 加 PBS にて 101 倍希釈) を 50 $\mu$ l/well 添加し、室温にて 1 時間静置した。well を洗浄後、TMB を 100 $\mu$ l/well 添加し 10 分間反応させ、1N HCl を 100 $\mu$ l/well 添加後、450nm における吸光度を測定した。

⑥ aPT (図 3-1F)

マキシソーププレートに、プロトロンビン (5 $\mu$ g/ml) を 50 $\mu$ l/well 添加し、4 $^{\circ}$ C にて一

晩静置した。well を洗浄後、0.5 %BSA 加 TBS にて 2 時間ブロッキングした。well を洗浄し、0.5%BSA および 0.05%Tween20 加 TBS にて 101 倍希釈した患者血清を 50 $\mu$ l/well 添加して室温にて一時間静置した。well を洗浄後、TMB を 100 $\mu$ l/well 添加し 10 分間反応させ、1N HCl を 100 $\mu$ l/well 添加後、450nm における吸光度を測定した。

⑦ aANXA2 (図 3-1G)

マキシソーププレートに、アネキシン A2 (5 $\mu$ g/ml) を 50 $\mu$ l/well 添加し、4 $^{\circ}$ C にて一晩静置した。well を洗浄後、0.5 %BSA 加 TBS にて 2 時間ブロッキングした。well を洗浄し、0.5%BSA および 0.05%Tween20 加 TBS にて 101 倍希釈した患者血清を 50 $\mu$ l/well 添加して室温にて一時間静置した。well を洗浄後、TMB を 100 $\mu$ l/well 添加し 10 分間反応させ、1N HCl を 100 $\mu$ l/well 添加後、450nm における吸光度を測定した。

⑧ aANXA5 (図 3-1H)

マキシソーププレートに、アネキシン A5 (5 $\mu$ g/ml) を 50 $\mu$ l/well 添加し、4 $^{\circ}$ C にて一晩静置した。well を洗浄後、0.5 %BSA 加 TBS にて 2 時間ブロッキングした。well を洗浄し、0.5%BSA および 0.05%Tween20 加 TBS にて 101 倍希釈した患者血清を 50 $\mu$ l/well 添加して室温にて一時間静置した。well を洗浄後、TMB を 100 $\mu$ l/well 添加し 10 分間反応させ、1N HCl を 100 $\mu$ l/well 添加後、450nm における吸光度を測定した。

### 3.2.3 LA 検査

LA 活性の判定は、Roche Diagnostics 社の Staclot LA<sup>®</sup>と MBL 社の Gradipore-LA (dRVVT テスト) にて実施した。

### 3.2.4 統計解析

動・静脈血栓症群，習慣流産群，血小板減少症群，APS 症状を有さない SLE 群（無合併症群）における各種抗リン脂質抗体価の比較は，Mann-Whitney U 検定にて実施した。また，各種抗リン脂質抗体出現と各種合併症発症および LA 活性発現との関連については，多重ロジスティック解析（各 ELISA 測定値はべき乗変換にて分布を正規化した後，解析）および ROC 解析を実施した。なお，各種統計解析は Stat Flex<sup>®</sup> ver.6 にて行い， $P < 0.01$  を統計学的に有意とした。

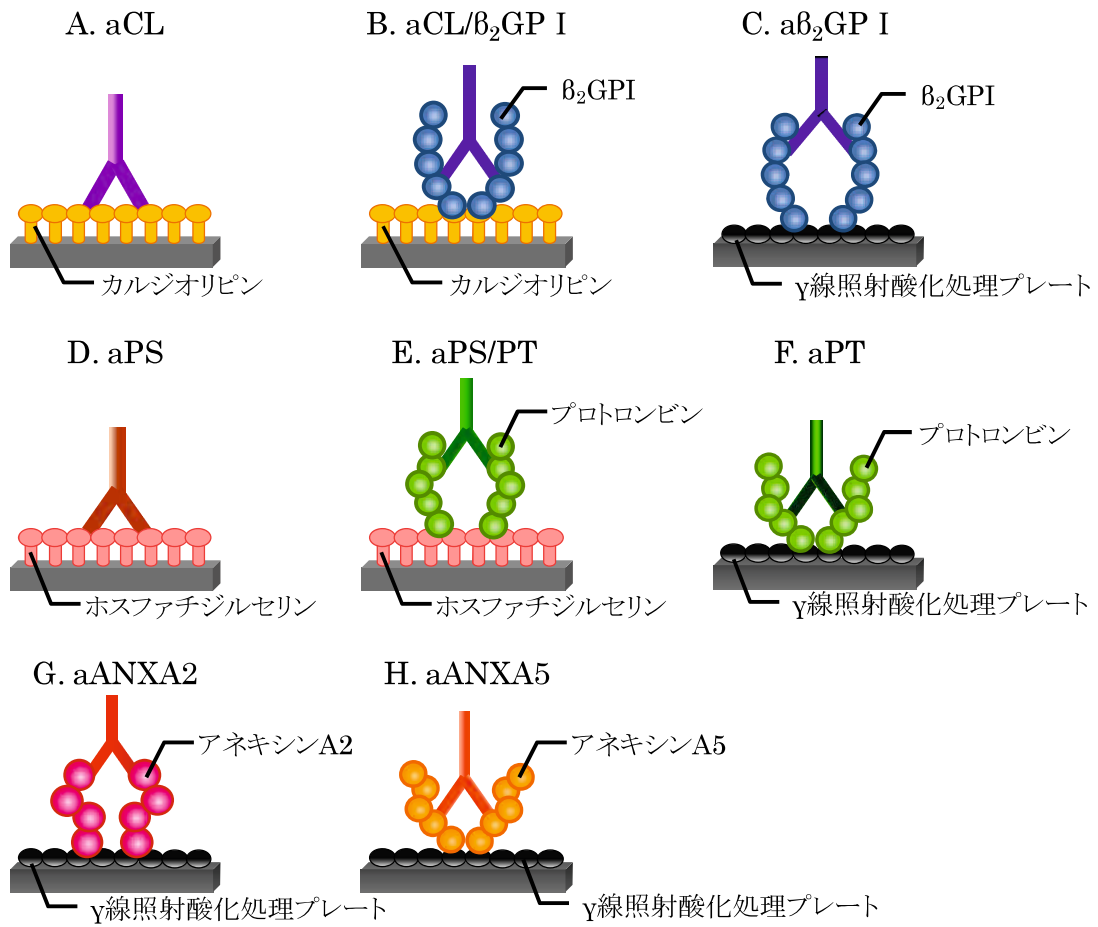


図 3-1. 各種抗リン脂質抗体の測定系における対応抗原

### 3.3 結果

#### 3.3.1 APS 臨床病態別における各種抗リン脂質抗体価の比較

まず、現在の APS 検査診断に用いられている aCL/ $\beta_2$ GP I に関連した抗体について、APS 症状発症の有無別に (A) aCL, (B) aCL/ $\beta_2$ GP I, (C) a $\beta_2$ GP I 抗体価を比較した (図 3-2)。結果、aCL は、APS 症状のない SLE 群 (無合併症群) に比較し、動・静脈血栓症群と習慣流産群で統計学的には有意に高い結果であったが、無合併症群においても高値を示す症例が多数認められ、合併症群との間に明確な違いは認められなかった。aCL/ $\beta_2$ GP I は、無合併症群に比較して、動・静脈血栓症群、習慣流産群、血小板減少症群の全ての群で有意に高値を示した ( $P < 0.001$ , Mann-Whitney U)。しかし、aCL と同様に無合併症群でも比較的抗体価が高い症例が多く認められた。一方、a $\beta_2$ GP I は、無合併症群に比較して、全ての合併症群で明らかな高値を示し ( $P < 0.001$ )、3 種類の抗体の中で最も無合併症群と合併症群との分布に違いが認められた。

次に、近年 LA 活性の責任抗体として注目されている aPS/PT に関連した抗体について、各種合併症別に (A) aPS, (B) aPS/PT, (C) aPT 抗体価を比較した (図 3-3)。結果、aPS は、無合併症群と各種合併症群との間に統計学的有意差が認められなかった。一方、aPS/PT および aPT は、動・静脈血栓症群、習慣流産群、血小板減少症群の全ての群で無合併症群に比較して有意に高値を示した ( $P < 0.001$ )。

さらに、新規抗リン脂質抗体のエピトープ提供タンパクとして報告されているアネキシン A2 およびアネキシン A5 に対する抗体 (抗アネキシン A2 抗体 : aANXA2, 抗アネキシン A5 抗体 : aANXA5) についても、酸化処理プレートにアネキシン A2 およびアネキシン A5 を物理吸着させたものを抗原とする ELISA にて測定系を確立し、各種合併症別に抗体価を比較した (図 3-4)。結果、aANXA2 は無合併症群に比し、動・静脈血栓症群および習慣流産群で有意に高値を示し ( $P < 0.001$ )、血小板減少症群でも高値を示した ( $P < 0.01$ )。一方、aANXA5 は習慣流産群でのみ、無合併症群に比較して有意に高値であった ( $P < 0.01$ )。aANXA2 および aANXA5 は群間での抗体価に有意差が認められたものの、無合併症群と合併症群の分布は大きく重なっていた。

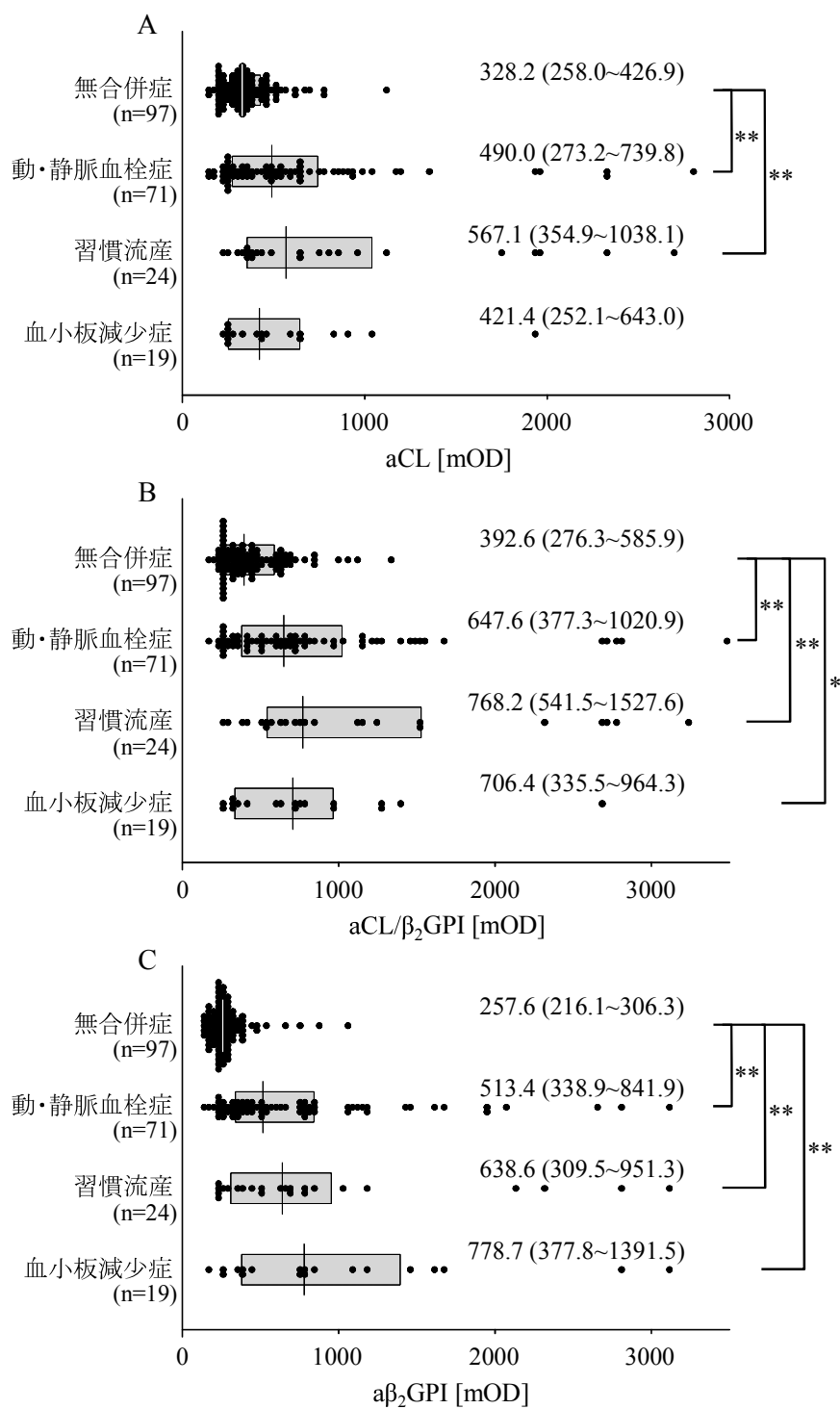


図 3-2. APS 臨床病態別 aCL, aCL/β<sub>2</sub>GPI, aβ<sub>2</sub>GPI 測定値の比較

SLE 患者 184 例について ELISA にて aCL (A), aCL/β<sub>2</sub>GPI (B), aβ<sub>2</sub>GPI (C) 測定を実施し、合併症別に吸光度を比較した。

図中の数値は各群における中央値であり、括弧内に 50%信頼区間を示している。

\* :  $P < 0.01$ , \*\* :  $P < 0.001$  (Mann-Whitney U 検定)

aCL : 抗カルジオリピン抗体, aCL/β<sub>2</sub>GPI : 抗カルジオリピン/β<sub>2</sub>グリコプロテイン I 抗体, aβ<sub>2</sub>GPI : 抗 β<sub>2</sub>グリコプロテイン I 抗体

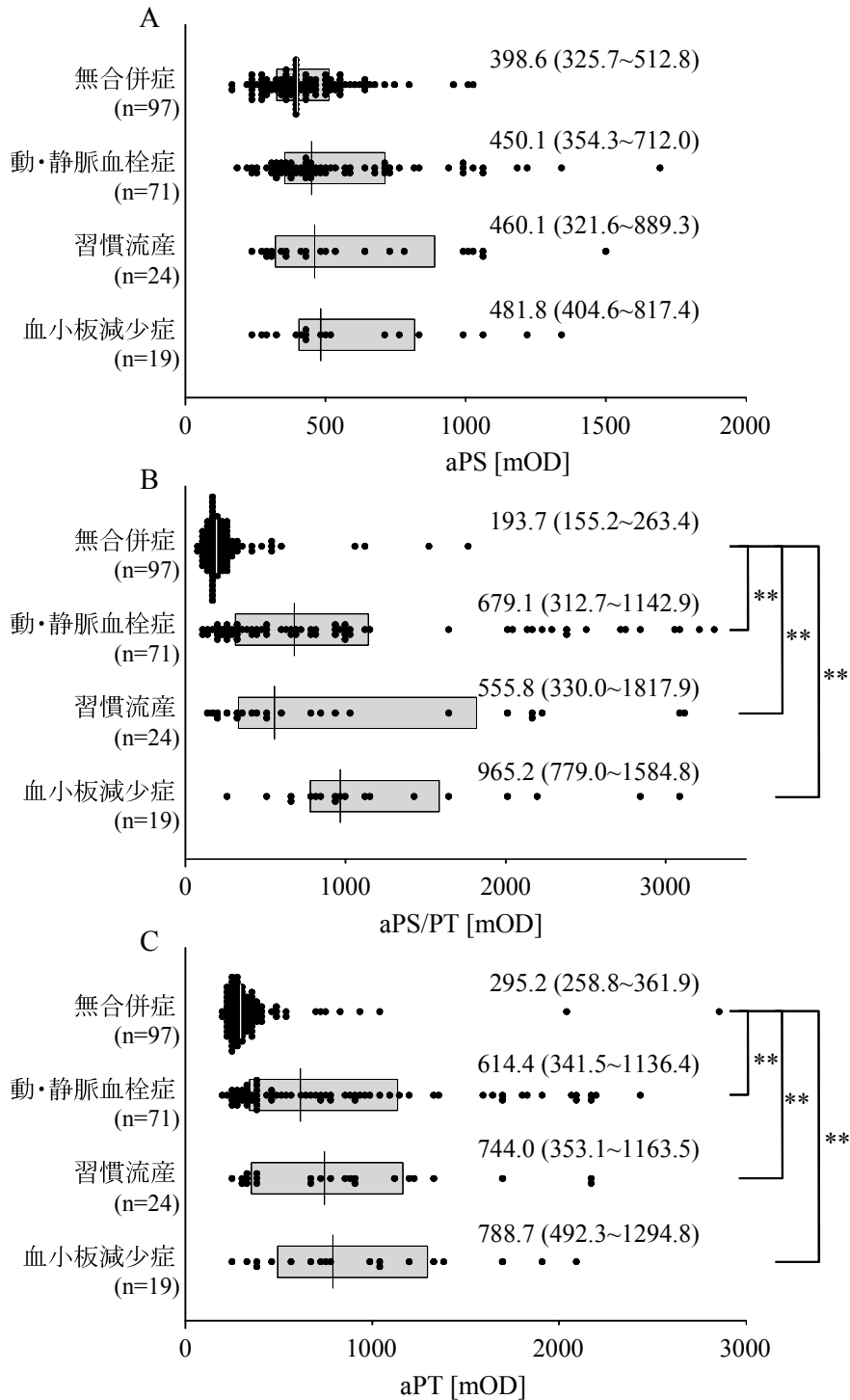


図 3-3. APS 臨床病態別 aPS, aPS/PT, aPT 測定値の比較

SLE 患者 184 例について ELISA にて aPS (A), aPS/PT (B), aPT (C)測定を実施し、合併症別に吸光度を比較した。

図中の数値は各群における中央値であり、括弧内に 50%信頼区間を示している。

\* :  $P < 0.01$ , \*\* :  $P < 0.001$  (Mann-Whitney U 検定)

aPS : 抗ホスファチジルセリン抗体,

aPS/PT : 抗ホスファチジルセリン/プロトロンビン抗体, aPT : 抗プロトロンビン抗体



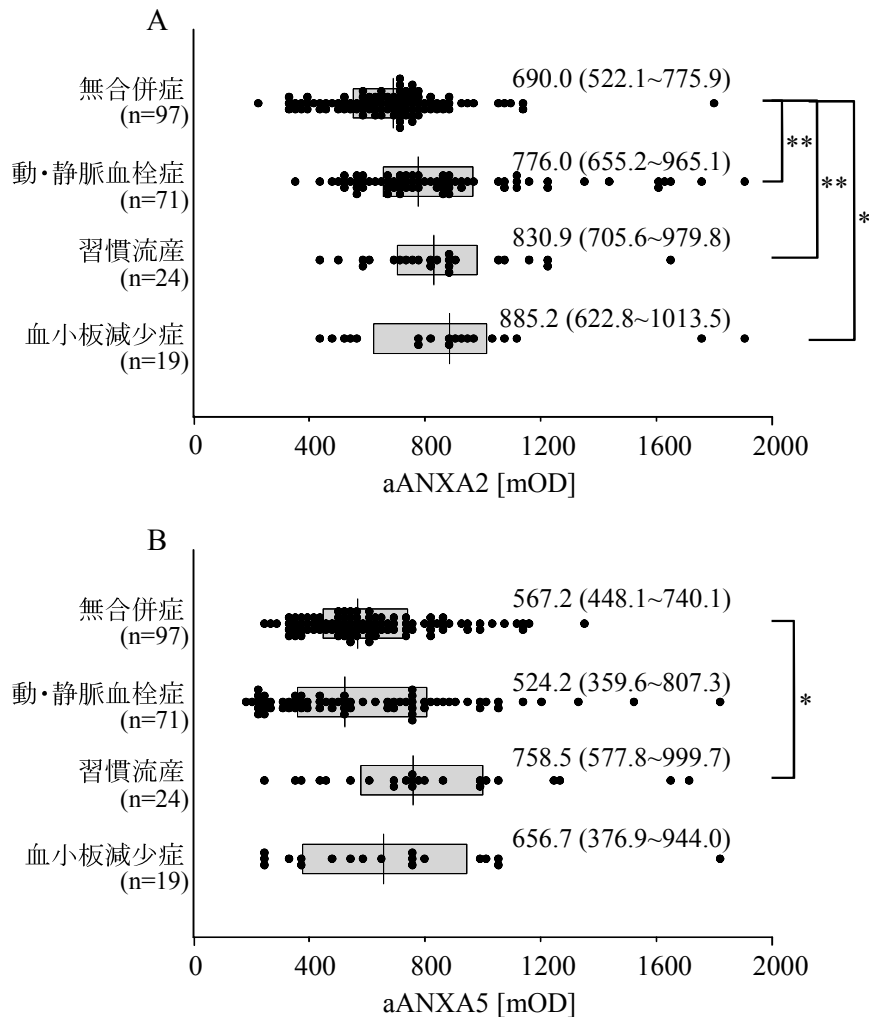


図 3-4. APS 臨床病態別 aANXA2 および aANXA5 測定値の比較

SLE 患者 184 例について ELISA にて aANXA2 (A) および aANXA5 (B) 測定を実施し、合併症別に吸光度を比較した。

図中の数値は各群における中央値であり、括弧内に 50% 信頼区間を示している。

\* :  $P < 0.01$ , \*\* :  $P < 0.001$  (Mann-Whitney U 検定)

aANXA2 : 抗アネキシン A2 抗体, aANXA5 : 抗アネキシン A5 抗体

### 3.3.2 各種合併症の発症に関連する抗リン脂質抗体の解析

各種抗リン脂質抗体価の比較により、合併症発症との関連性が有力視される aCL/β<sub>2</sub>GPI I, aβ<sub>2</sub>GPI I, aPS/PT, aPT の 4 種類の抗リン脂質抗体について、どのタイプの抗体が各合併症（動・静脈血栓症，習慣流産，血小板減少症）の発症に最も関連しているのか，多重ロジスティック解析にて検討した（表 3-2）。

結果，動・静脈血栓症の発症には aβ<sub>2</sub>GPI I（OR=3.73, 95%CI=1.72~8.10, *P*<0.001）と aPS/PT（OR=3.38, 95%CI=1.47~7.77, *P*=0.004）がそれぞれ独立して関連していた。一方，習慣流産の発症には，aCL/β<sub>2</sub>GPI I（OR=2.88, 95%CI=1.25~6.65, *P*=0.01）の存在が唯一関連性を認めた。さらに，APS 関連症状として代表的な血小板減少症の発症には，動・静脈血栓症と同じく，aβ<sub>2</sub>GPI I（OR=5.73, 95%CI=1.83~17.94, *P*=0.003）と aPS/PT（OR=12.22, 95%CI=2.25~66.37, *P*=0.004）がそれぞれ独立して関連しており，特に aPS/PT の存在は血小板減少症の強い危険因子となることが示唆された。

表 3-2. 各種合併症の発症と抗リン脂質抗体出現との関連性

	動・静脈血栓症			習慣流産			血小板減少症		
	P-value	OR	95%CI	P-value	OR	95%CI	P-value	OR	95%CI
aCL/β <sub>2</sub> GPI	0.95	1.02	0.53~1.97	0.01	2.88	1.25~6.65	0.09	0.37	0.12~1.17
aβ <sub>2</sub> GPI	<0.001	3.73	1.72~8.10	0.33	1.53	0.65~3.56	0.003	5.73	1.83~17.94
aPS/PT	0.004	3.38	1.47~7.77	0.31	1.73	0.60~4.98	0.004	12.22	2.25~66.37
aPT	0.77	1.16	0.44~3.01	0.77	0.83	0.25~2.81	0.30	0.41	0.08~2.23

aCL/β<sub>2</sub>GPI I : 抗カルジオリピン/β<sub>2</sub> グリコプロテイン I 抗体, aβ<sub>2</sub>GPI I : 抗 β<sub>2</sub> グリコプロテイン I 抗体, aPS/PT : 抗ホスファチジルセリン/プロトロンビン抗体, aPT : 抗プロトロンビン抗体, OR : オッズ比

### 3.3.3 LA 活性の発現に関連する抗リン脂質抗体の解析

抗リン脂質抗体の定性検査に用いられる LA 活性の発現に，どのタイプの抗リン脂質抗体が関連しているのか，多重ロジスティック解析にて検討した（表 3-3）。結果，LA 活性の発現には，aβ<sub>2</sub>GPI I（OR=4.27, 95%CI=1.42~12.84, *P*<0.01），aPS/PT（OR=8.57, 95%CI=3.15~23.29, *P*<0.0001），aPT（OR=8.15, 95%CI=3.07~21.60, *P*<0.0001）の 3 つのタイプの抗リン脂質抗体が関連性を示し，特にプロトロンビンをエピトープ提供タンパクとする抗リン脂質抗体が LA 活性の要因となることが示唆された。さらに，LA 活性陽性・陰性に対する各抗リン脂質抗体の診断的有用性を ROC 解析にて検討した結果（図 3-5），曲線下面積（AUC）は aPS/PT で 0.91 と最も大きく，次いで aPT（AUC=0.89），aβ<sub>2</sub>GPI I（AUC=0.80）であり，これらの抗体を測定することにより，LA 活性の有無をある程度予測できる可能性が示された。

表 3-3. LA 活性の発現に関連する抗リン脂質抗体

	P-value	OR	95%CI
a $\beta_2$ GPI	0.0097	4.27	1.42~12.84
aPS/PT	<0.0001	8.57	3.15~23.29
aPT	<0.0001	8.15	3.07~21.60

a $\beta_2$ GPI : 抗グリコプロテイン I 抗体, aPS/PT : 抗ホスファチジルセリン/プロトロンビン抗体, aPT : 抗プロトロンビン抗体, OR : オッズ比

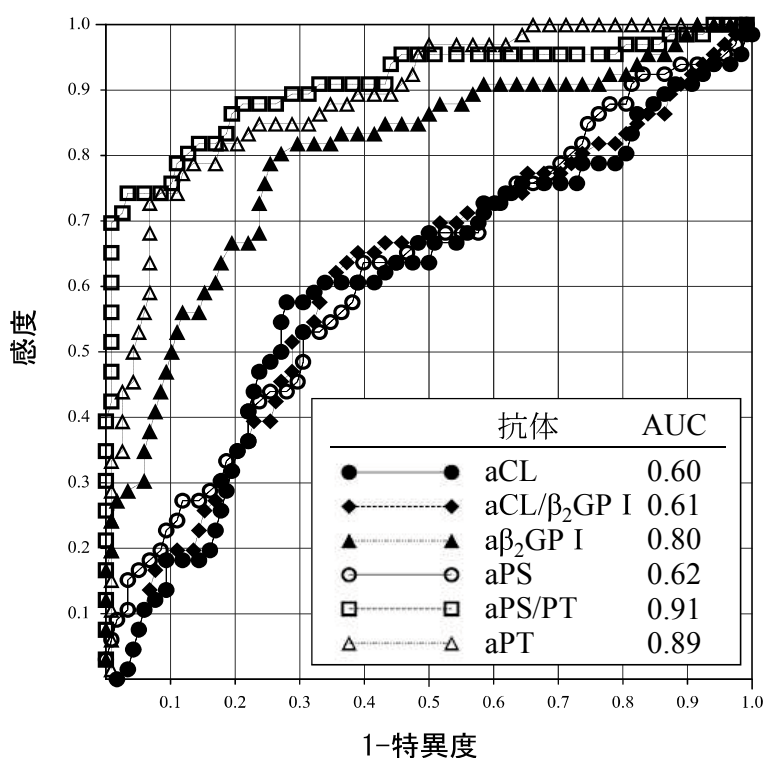


図 3-5. LA 活性への各種抗体の関与 (ROC 解析)

AUC: 曲線下面積, aCL: 抗カルジオリピン抗体, aCL/ $\beta_2$ GP I : 抗カルジオリピン/ $\beta_2$ グリコプロテイン I 抗体, a $\beta_2$ GP I : 抗  $\beta_2$ グリコプロテイン I 抗体, aPS: 抗ホスファチジルセリン抗体, aPS/PT: 抗ホスファチジルセリン/プロトロンビン抗体, aPT: 抗プロトロンビン抗体

### 3.4 考察

抗リン脂質抗体の検出は APS 診断の要となる重要な検査項目である。APS 患者血中に存在する抗リン脂質抗体は抗原特異性の異なる多種類の抗体群で構成されており、それぞれの抗体が持つ種々の血栓形成作用が複雑に絡み合って APS 特有の多彩な合併症が引き起こされると推測される。したがって、患者血中に存在する抗体を検出し、その種類を特定することは APS 治療の面からも重要であると考えられる。しかしながら、現在、本邦の ELISA による抗リン脂質抗体の検出は、MBL 社の「MESACUP カルジオリピンテスト」とヤマサ社の「抗 CL・ $\beta_2$ GP I キット」の 2 種類が保険収載されているのみであり、いずれのキットもカルジオリピンに結合した  $\beta_2$ GP I 分子上のエピトープを認識する抗体を測定対象としている。APS を適切に診断するためには、1 種類の抗体を測定するだけでは不十分であり、APS の合併症発症に関与する抗体を複数測定することが望ましい。ゆえに、臨床的に測定意義の高い抗リン脂質抗体の特定と、その測定系の確立が重要であると考えられる。

本検討では、抗リン脂質抗体のエピトープ提供タンパクとして知られる  $\beta_2$ GP I・プロトロンビン・アネキシン A2・アネキシン A5 を用いて、それぞれ認識エピトープが異なる 8 種類の抗リン脂質抗体を ELISA にて同時に測定し、各種合併症（動・静脈血栓症、習慣流産、血小板減少症）の発症に関連の強い抗リン脂質抗体のタイプの特定を試みた。

SLE 184 症例を対象とした本研究では、a $\beta_2$ GP I と aPS/PT の出現が動・静脈血栓症発症の独立した危険因子であることが示唆された。これら両抗体は血小板減少症との関連性も認められており、抗リン脂質抗体による血栓形成と血小板減少との間に一部共通した機序が存在する可能性が考えられる。また、習慣流産の発症に関しては、aCL/ $\beta_2$ GP I のみ関連性が確認されており、血栓性合併症と妊娠合併症とは異なるタイプの抗リン脂質抗体が発症に関与している可能性が示唆される。一方で、aANXA2 と aAXNA5 は合併症群で高値を示したものの、その抗体価の分布は無合併症群と大きく重なっており、APS 診断時の検査項目としては有用性が低いと考えられた。しかし、合併症の発症リスク予測や予防の観点から、APS 患者の病態管理において測定意義があると考えられる。アネキシン A2 はプラスミン生成のコファクターとして知られ、細胞表面において線溶活性を増強させる働きを持つタンパクであり、血管内皮細胞や単球内、また、胎盤の合胞体栄養細胞の刷子縁膜上に存在する<sup>62,63</sup>。他の研究においても APS 患者において aANXA2 の保有率が高いことが報告されており<sup>64</sup>、本抗体も APS の病態形成に関与していることを示唆する論文がいくつかある。その機序としては、血管内皮細胞の TF 発現を誘導することや、胎盤におけるプラスミン生成を阻害すること、さらには組織プラスミノゲンアクチベーターによるプラスミノゲンの活性化を阻害することなどが挙げられている。また、aANXA5 は習慣流産のみ、関連を認めた。このことに関して、マウスにおいて aANXA5 が胎盤血栓症や流産を起こしたという報告<sup>65</sup>や、aANXA5 と血栓症の既往との間に関連を認めなかったとする報告<sup>66</sup>があり、今回の結果と一致する。しかしながら、一方で、aANXA5 がアネキシン A5 の血管内皮への結合を減少させることにより、アテローム血栓症や虚血性心疾患、脳血管障

害を引き起こすことも示されており<sup>67)</sup>、議論の分かれるところである。アネキシン A5 は酸性リン脂質への結合において  $\beta_2$ GP I と競合するタンパクであり、aANXA5 によりアネキシン A5 の血管内皮への結合が妨げられると a $\beta_2$ GP I の血管内皮への結合が高まることとなり、APS における合併症の病態形成には aANXA5 が間接的に関与している可能性が考えられる<sup>68)</sup>。

さらに、本研究では LA 活性発現の原因となる抗リン脂質抗体のタイプの特定を試みた。その結果、LA 活性には、 $\beta_2$ GP I に対する抗リン脂質抗体とプロトロンビンに対する抗リン脂質抗体がそれぞれ独立して関連しており、特に aPS/PT の存在が LA 活性の発現に強く関連していることが示唆された。今回検討した 184 症例では、a $\beta_2$ GP I と aPS/PT を測定することにより、約 85% の LA 陽性症例を捉えることができた。

本研究結果から、a $\beta_2$ GP I と aPS/PT 測定は APS の検査診断に欠かせない項目であると考えられるが、a $\beta_2$ GP I は測定キットが国内販売されておらず、aPS/PT に至っては未だ診断基準に採用されていない。したがって、これらの抗体により引き起こされる多数の APS 症例が見逃されている可能性ある。今後、複数の抗リン脂質抗体を ELISA にて同時測定することで APS 診断精度の向上が期待でき、患者血中に存在する抗リン脂質抗体のタイプの決定と抗体価の定量が APS の検査診断として重要であると考えられる。

### 3.5 小括

現在、臨床における抗リン脂質抗体の検出は、手順が煩雑かつ判定に苦慮することの多い LA 検査と、ELISA による aCL/ $\beta_2$ GP I の検出のみで行われており、APS 検査診断の環境は整っているとは言い難いのが現状である。

今回、8 種類の ELISA による抗リン脂質抗体の測定系を確立し、各種 APS 合併症との関連を検討したところ、a $\beta_2$ GP I 測定と aPS/PT 測定の重要性が明らかとなった。APS 診断基準への aPS/PT の登用、そして、日本における a $\beta_2$ GP I および aPS/PT 測定 ELISA キットの販売および保険収載が望ましく、さらに、これら抗体測定の標準化は急務である。

今回の検討からも APS 患者血中に存在する抗リン脂質抗体が複数種類であることは明らかであり、今後、種々の抗体と APS 合併症との関連や各種抗体の作用を詳細に解明していく必要がある。

## 総括

抗リン脂質抗体症候群（APS）は、後天性血栓性素因の代表的疾患に位置付けられており、動脈・静脈を問わず、血栓症を繰り返し起こす特徴的な疾患である。APS に合併する血栓症の発症原因となるのは、APS 診断の要である抗リン脂質抗体の存在であり、一般的に知られる血栓症の発症機序に加え、自己免疫性の機序があると考えられる。本研究では抗リン脂質抗体が末梢血単核球に及ぼす作用について検討を行い、その機序の一端の解明に取り組んだ。その結果、生体内の単球表面組織因子（TF）の高発現が閉塞性動脈硬化症や抗リン脂質抗体の有無と強く関連していることを明らかにした。また、*in vitro* の実験系において、抗リン脂質抗体が末梢血単核球の TF 発現や各種炎症性サイトカインの産生を促進することが示唆された。これらの検討結果より、APS における血栓塞栓症の発症には、抗リン脂質抗体が惹起する TF 依存性の血栓形成と炎症反応との相乗作用が関与していることが示唆される。

さらに、本研究では、現在の APS 検査診断の問題点に着目し、その改善に向け、各種抗リン脂質抗体の測定系を確立し、APS 診断に有用性の高い抗体の特定を試みた。その結果、aPS/PT と a $\beta_2$ GP I が APS の合併症発症に強く関連しており、測定意義の高い抗体であることが明らかとなった。APS の検査診断において、少ない検査項目で効率良く患者を捉えるためには、aPS/PT と a $\beta_2$ GP I の同時測定が有用であると考えられる。ところが、いずれの抗体も現在の日本では測定キットが販売されておらず、一般の臨床では用いられていないのが現状であり、本研究成果を臨床の現場に広く公表していくことが必要である。他に、aCL/ $\beta_2$ GP I や aANXA2, aANXA5 も各種合併症との関連が認められ、抗体により疾患特異性が異なることが示された。APS 患者の血中には複数の抗体が混在していることや、混在する抗体がそれぞれに持つ作用が複合的に作用して APS 合併症の発症につながる可能性を鑑みると、APS 患者の病態管理の観点から、これらの抗体についても測定意義があると考えられる。

APS の病態解明はまだ研究途上の段階であり、未知の抗リン脂質抗体も多数存在すると考えられる。今後は、各種抗体と APS 合併症との臨床的関連の解明とともに、抗体ごとの作用解明が求められる。各種抗体の疾患特異性と、その作用機序が明らかになれば、患者の保有する抗体をスクリーニングすることで、患者ごとに発症しやすい合併症とそのリスクを推測することができ、APS の個別化治療が飛躍的に向上すると期待できる。本研究の発展が APS 患者の血栓症再発予防につながる足がかりとなれば幸いである。

## 結語

本研究により、抗リン脂質抗体が単球表面の組織因子発現と単核球の炎症性サイトカイン産生を促進する作用を持つことを明らかにし、この作用が APS 患者の閉塞性動脈硬化症、ひいては動脈血栓塞栓症の発症につながる可能性を示した。しかしながら、一口に抗リン脂質抗体といっても、抗原特異性は多様であり、リン脂質とリン脂質結合タンパクの組合せによっていくつかのタイプが存在していることから、抗体の種類によって作用する細胞や働きが異なることは十分に考えられる。今回、APS 検査診断の向上を目的に、種々の抗リン脂質抗体を検出できる ELISA を確立し、aPS/PT と a $\beta_2$ GP I が動・静脈血栓症や血小板減少症の重要なリスクファクターであることや、aCL/ $\beta_2$ GP I が習慣流産発症のリスクファクターであることを明らかにした。APS の臨床病態は多彩であり、抗リン脂質抗体により疾患特異性が異なることから、複数抗体の同時測定による検査診断が有用であると考えられる。今回の SLE184 例を対象とした検討では、aPS/PT と a $\beta_2$ GP I の同時測定が推奨されるが、この 2 種類の抗体測定のみでは全症例を網羅することはできず、一部の症例を見逃す可能性は否めない。さらに検討を進め、各種抗リン脂質抗体が APS 合併症を引き起こす機序を詳細に解明し、よりの確な APS 鑑別診断法を確立することが今後の課題であり、本研究の成果をより発展させていきたい所存である。

## 謝辞

本研究の遂行および本論文の作成にあたり、終始懇切なご指導とご鞭撻を賜り、日頃より研究に対する情熱と励ましを与えてくださった山口大学大学院医学系研究科生体情報検査学領域教授、野島順三先生に深甚なる謝意を表します。

本研究の遂行および関連論文の作成に際し、貴重なご助言とご指導を賜りました山口大学大学院医学系研究科生体情報検査学領域教授、市原清志先生に深謝致します。

山口大学大学院に在籍した 5 年の歳月の中で、様々なご支援を賜りました山口大学大学院医学系研究科生体情報検査学領域教授、常岡英弘先生、山口大学大学院医学系研究科生体情報検査学領域講師、山本美佐先生、山口大学大学院医学系研究科生体情報検査学領域助教、柳原正志先生をはじめ、山口大学大学院医学系研究科の諸先生方に厚く感謝致します。また、研究の面白さを教え、大学院進学のきっかけ与えてくださった山口大学大学院医学系研究科生体情報検査学領域講師、松井智浩先生に深く感謝致します。

抗リン脂質抗体症候群に関する研究をともに進め、議論を交わし、研究の喜びを分かち合った山口大学大学院医学系研究科大学院生、青木なつみさんに深謝します。

大学院生活の中で研究室は違えども、苦楽を共にし、時に支え励ましてくれた大学院生の仲間から感謝します。

最後に、山口大学大学院博士後期課程への進学を後押しし、長きにわたり支えてくれた両親、どんな時も味方となって支えてくれた妹に感謝します。



## 引用文献

- 1) Harris EN, Chan JK, Asherson RA, et al. Thrombosis, recurrent fetal loss, and thrombocytopenia. Predictive value of the anticardiolipin antibody test. *Arch Intern Med* 1986; 146: 2153-2156.
- 2) Hughes GR. The antiphospholipid syndrome: ten years on. *Lancet* 1993; 342:341-344.
- 3) Roubey RA. Autoantibodies to phospholipid-binding plasma proteins: a new view of lupus anticoagulants and other "antiphospholipid" autoantibodies. *Blood* 1994; 84:2854-2867.
- 4) Ruiz-Irastorza G, Crowther M, Branch W, et al. Antiphospholipid syndrome. *Lancet* 2010; 376: 1498-1509.
- 5) Harris EN, Gharavi AE, Boey ML, et al. Anticardiolipin antibodies: detection by radioimmunoassay and association with thrombosis in systemic lupus erythematosus. *Lancet* 1983; 2: 1211-1214.
- 6) Hughes GR, Harris NN, Gharavi AE. The anticardiolipin syndrome. *J Rheumatol* 1986; 13: 486-489.
- 7) McNally T, Mackie IJ, Machin SJ, et al. Increased levels of  $\beta$ 2 glycoprotein- I antigen and  $\beta$ 2 glycoprotein- I binding antibodies are associated with a history of thromboembolic complications in patients with SLE and primary antiphospholipid syndrome. *Br J Rheumatol* 1995; 34: 1031-1036.
- 8) Cabiedes J, Cabral AR, Alarcon-Segovia D. Clinical manifestations of the antiphospholipid syndrome in patients with systemic lupus erythematosus associate more strongly with anti- $\beta$ 2-glycoprotein- I than with antiphospholipid antibodies. *J Rheumatol* 1995; 22: 1899-1906.
- 9) Asherson RA. The catastrophic antiphospholipid syndrome. *J Rheumatol.* 1992; 19: 508-512.
- 10) Wilson WA, Gharavi AE, Koike T, et al. International consensus statement on preliminary classification criteria for definite antiphospholipid syndrome: report of an international workshop. *Arthritis Rheum* 1999; 42: 1309-1311.
- 11) Miyakis S, Lockshin MD, Atsumi T, et al. International consensus statement on an update of the classification criteria for definite antiphospholipid syndrome (APS). *J Thromb Haemost* 2006; 4:295-306.
- 12) 山崎雅英. 抗リン脂質抗体症候群. 一瀬白帝編著, 図説, 血栓・止血・血管学. 中外医学社. 2005; 410-421.

- 13) 渥美達也. 抗リン脂質抗体症候群の診断. 日本血栓止血学会. 2008; 19: 329-332.
- 14) Thiagarajan P, Shpiro SS, De Marco L. Monoclonal immunoglobulin M lambda coagulation inhibitor with phospholipid specificity. Mechanism of a lupus anticoagulant. *J Clin Invest* 1980; 66: 397-405.
- 15) Tripodi A. Laboratory testing for lupus anticoagulants: a review of issues affecting results. *Clin Chem* 2007; 53: 1629-1635.
- 16) Wassermann A. Eine serodiagnostische reaction bei syphilis. *Dtsch Med Wochensche* 1906; 19: 619-625.
- 17) Pangborn MC. A new serologically active phospholipid from beef heart. *Proc Soc Exp Biol Med* 1941; 48: 484-486.
- 18) Moore JE, Mohr CF. Biologically false positive serologic tests for syphilis: type, incidence and cause. *J Am Med Association* 1952; 150: 467-473.
- 19) Koike T, Sueishi M, Funaki H, et al. Antiphospholipid antibodies and biological false positive serological test for syphilis in patients with systemic lupus erythematosus. *Clin Exp Immunol* 1984; 56: 193-199.
- 20) McNeil HP, Simpson RJ, Chesterman CN, et al. Anti-phospholipid antibodies are directed against a complex antigen that includes a lipid-binding inhibitor of coagulation:  $\beta$ 2-glycoprotein I (apolipoprotein H). *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87: 4120-4124.
- 21) Galli M, Comfurius P, Maassen C, et al. Anticardiolipin antibodies (ACA) directed not to cardiolipin but to a plasma protein cofactor. *Lancet* 1990; 335: 1522-1547.
- 22) Matsuura E, Igarashi Y, Fujimoto M, et al. Anticardiolipin cofactor(s) and differential diagnosis of autoimmune disease. *Lancet* 1990; 336: 177-178.
- 23) Matsuura E, Igarashi Y, Fujimoto M, et al. Heterogeneity of anticardiolipin antibodies defined by the anticardiolipin cofactor. *J Immunol* 1992; 148: 3885-3891.
- 24) Matsuura E, Igarashi Y, Yasuda T, et al. Anticardiolipin antibodies recognize  $\beta$ 2-glycoprotein I structure altered by interacting with an oxygen modified solid phase surface. *J Exp Med* 1994; 179: 457-462.
- 25) Koike T, Matsuura E. Anticardiolipin antibodies and  $\beta$ 2-glycoprotein I. *Lupus* 1996; 5: 156-157.
- 26) Koike T, Matsuura E. Anti- $\beta$ 2-glycoprotein I antibody: specificity and clinical significance. *Lupus* 1996; 5: 378-380.
- 27) Lozier J, Takahashi N, Putnam FW. Complete amino acid sequence of human plasma  $\beta$ 2-glycoprotein I. *Proc Natl Acad Sci USA* 1984; 81: 3640-3644.
- 28) Matsuura E, Igarashi M, Igarashi Y, et al. Molecular definition of human  $\beta$ 2-glycoprotein I ( $\beta$ 2-GP I) by cDNA cloning and inter-species differences of  $\beta$ 2-GP

- I in alternation of anticardiolipin binding. *Int Immunol* 1991; 3: 1217-1221.
- 29) Hunt JE, Krilis SA. Antiphospholipid antibodies,  $\beta$ 2-glycoprotein I and thrombosis. *Lupus* 1993; 2: 285-287.
  - 30) Hunt JE, Simpson RJ, Krilis SA. Identification of a region of  $\beta$ 2-glycoprotein I critical for lipid binding and anti-cardiolipin antibody cofactor activity. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 2141-2145.
  - 31) Hunt JE, Krilis S. The fifth domain of  $\beta$ 2-glycoprotein I contains a phospholipid binding site (Cys281-Cys288) and a region recognized by anticardiolipin antibodies. *J Immunol* 1994; 152: 653-659.
  - 32) Matsuura E, Igarashi M, Igarashi Y, et al. Molecular studies on phospholipid-binding sites and cryptic epitopes appearing on  $\beta$ 2-glycoprotein I structure recognized by anticardiolipin antibodies. *Lupus* 1995; 4 Suppl 1: S13-17.
  - 33) Igarashi M, Matsuura E, Igarashi Y, et al. Human  $\beta$ 2-glycoprotein I as an anticardiolipin cofactor determined using mutants expressed by a baculovirus system. *Blood* 1996; 87: 3262-3270.
  - 34) Agar C, van Os GM, Morgelin M, et al.  $\beta$ 2-Glycoprotein I can exist in 2 conformations: implications for our understanding of the antiphospholipid syndrome. *Blood* 2010; 116: 1336-1343.
  - 35) Katharina G, Nadia W, Michael R, et al.  $\beta$ 2-glycoprotein I, the major target in antiphospholipid syndrome, is a special human complement regulator. *Blood* 2011; 118: 2774-2787.
  - 36) Atsumi T, Ieko M, Bertolaccini ML, et al. Association of autoantibodies against the phosphatidylserine-prothrombin complex with manifestations of the antiphospholipid syndrome and with the presence of lupus anticoagulant. *Arthritis Rheum* 2000; 43: 1982-1993.
  - 37) Nojima J, Iwatani Y, Suehisa E, et al. The presence of anti-phosphatidylserine/prothrombin antibodies as risk factor for both arterial and venous thrombosis in patients with systemic lupus erythematosus. *Haematologica* 2006; 91: 699-702.
  - 38) 家子正裕, 内藤澄悦, 吉田美香. 抗リン脂質抗体症候群における診断的臨床検査であるループスアンチコアグラントの検出方法としてのクロスミキシングテスト (交差混合試験). *臨床病理* 2009; 57: 990-998.
  - 39) Alessandri C, Conti F, Pendolino M, et al. New autoantigens in the antiphospholipid syndrome. *Autoimmun Rev* 2011; 10: 609-616.
  - 40) Carreras LO, Vermeylen JG. "Lupus" anticoagulant and thrombosis—possible role of inhibition of prostacyclin formation. *Thromb Haemost* 1982; 48: 38-40.
  - 41) Simantov R, LaSala JM, Lo SK, et al. Activation of cultured vascular endothelial

- cells by antiphospholipid antibodies. *J Clin Invest* 1995; 96: 2211-2219.
- 42) Urbanus RT, Pennings MT, Derksen RH, et al. Platelet activation by diametric beta2-glycoprotein I requires signaling via both glycoprotein I $\alpha$  and apolipoprotein E receptor 2'. *J Thromb Haemost* 2008; 6: 1405-1412.
  - 43) Shi T, Giannakopoulos B, Yan X, et al. Anti-beta2-glycoprotein I antibodies in complex with beta2-glycoprotein I can activate platelets in a dysregulated manner via glycoprotein Ib-IX-V. *Arthritis Rheum* 2006; 54: 2558-2567.
  - 44) Sikara MP, Routsias JG, Samiotaki M, et al.  $\beta$ 2 Glycoprotein I ( $\beta$ 2GP I) binds platelet factor 4 (PF4): implications for the pathogenesis of antiphospholipid syndrome. *Blood* 2010; 115: 713-723.
  - 45) Vega-Ostertag M, Casper K, Swerlick R, et al. Involvement of p38 MAPK in the up-regulation of tissue factor on endothelial cells by antiphospholipid antibodies. *Arthritis Rheum* 2005; 52: 1545-1554.
  - 46) Lopez-Pedreira C, Buendia P, Cuadrado MJ, et al. Antiphospholipid antibodies from patients with the antiphospholipid syndrome induce monocyte tissue factor expression through the simultaneous activation of NF-kappaB/Rel proteins via the p38 mitogen-activated protein kinase pathway, and of the MEK-1/ERK pathway. *Arthritis Rheum* 2006; 54: 301-311.
  - 47) Sorice M, Longo A, Capozzi A, et al. Anti-beta2-glycoprotein I antibodies induce monocyte release of tumor necrosis factor alpha and tissue factor by signal transduction pathways involving lipid rafts. *Arthritis Rheum* 2007; 56: 2687-2697.
  - 48) Malia RG, Kitchen S, Greaves M, et al. Inhibition of activated protein C and its cofactor protein S by antiphospholipid antibodies. *Br J Haematol* 1990; 76: 101-107.
  - 49) Oosting JD, Derksen RH, Bobbink IW, et al. Antiphospholipid antibodies directed against a combination of phospholipids with prothrombin, protein C, or protein S: an explanation for their pathogenic mechanism? *Blood* 1993; 81: 2618-2625.
  - 50) Nojima J, Kuratsune H, Suehisa E, et al. Acquired Activated Protein C Resistance Associated with IgG Antibodies against  $\beta$ 2-Glycoprotein I and Prothrombin as a Strong Risk Factor for Venous Thromboembolism. *Clin Chem* 2005; 51: 545-552.
  - 51) Seshan SV, Franzke CW, Redecha P, et al. Role of tissue factor in a mouse model of thrombotic microangiopathy induced by antiphospholipid antibodies. *Blood* 2009; 114: 1675-1683.
  - 52) Nojima J, Masuda Y, Iwatani Y, et al. Arteriosclerosis obliterans associated with anti-cardiolipin antibody/ $\beta$ 2-glycoprotein I antibodies as a strong risk factor for ischaemic heart disease in patients with systemic lupus erythematosus. *Rheumatology* 2008; 47:684-689.

- 53) Boles J, Mackman N. Role of tissue factor in thrombosis in antiphospholipid antibody syndrome. *Lupus* 2010; 19:370-378.
- 54) Kinev AV, Roubey RA. Tissue factor in the antiphospholipid syndrome. *Lupus* 2008; 17:952-958.
- 55) Roubey RA. Tissue factor pathway and the antiphospholipid syndrome. *J Autoimmun* 2000; 15:217-220.
- 56) Wolberg AS, Roubey RA. Mechanisms of autoantibody-induced monocyte tissue factor expression. *Thromb Res* 2004; 114:391-396.
- 57) Amengual O, Atsumi T, Khamashta MA, et al. The role of the tissue factor pathway in the hypercoagulable state in patients with the antiphospholipid syndrome. *Thromb Haemost* 1998; 79:276-281.
- 58) Reverter JC, Tassies D, Font J, et al. Effects of human monoclonal anticardiolipin antibodies on platelet function and on tissue factor expression on monocytes. *Arthritis Rheum* 1998; 41:1420-1427.
- 59) Döring Y, Hurst J, Lorenz M, et al. Human antiphospholipid antibodies induce TNFalpha in monocytes via Toll-like receptor 8. *Immunobiology* 2010 ; 215 : 230-241.
- 60) Swadzba J, Iwaniec T, Musial J. Increased level of tumor necrosis factor-alpha in patients with antiphospholipid syndrome: marker not only of inflammation but also of the prothrombotic state. *Rheumatol Int* 2011; 31: 307-313.
- 61) Esmon CT. Inflammation and thrombosis. *J Thromb Haemost* 2003 ; 1 : 1343-1348.
- 62) Hajjar KA, Jacovina AT, Chacko J. An endothelial cell receptor for plasminogen and tissue plasminogen activator: I , identity with annexin II . *J Biol Chem* 1994; 269: 21191-21197.
- 63) Kaczan-Bourgeois D, Salles JP, Hullin F, et al. Increased content of annexin II (p36) and p11 in human placenta brush-border membrane vesicles during syncytiotrophoblast maturation and differentiation. *Placenta* 1996; 17: 669-676.
- 64) Cesarman-Maus G, Rios-Luna NP, Deora AB, et al. Autoantibodies against the fibrinolytic receptor, annexin 2, in antiphospholipid syndrome. *Blood* 2006; 107: 4375-4382.
- 65) Wang X, Campos B, Kaetzel MA, et al. Annexin V is critical in the maintenance of murine placental integrity. *Am J Obstet Gynecol* 1999; 180: 1008-1016.
- 66) De Laat B, Derksen RHW, Mackie IJ, et al. Annexin A5 polymorphism (–1C→T) and the presence of anti-annexin A5 antibodies in the antiphospholipid syndrome. *Ann Rheum Dis* 2006; 65: 1468-1472.
- 67) Frostegard AG, Su J, von Landenberg P, et al. Effects of anti-cardiolipin antibodies

and IVIg on annexin A5 binding to endothelial cells: implications for cardiovascular disease. *Scand J Rheumatol* 2010; 39: 77-83.

- 68) Rand JH, Wu XX, Quinn AS, et al. Resistance to annexin A5 anticoagulant activity: a thrombogenic mechanism for the antiphospholipid syndrome. *Lupus* 2008; 17: 922-930.