

抗リン脂質抗体症候群の検査診断法の確立
および血栓症発症機序の解明

学位申請者

山口大学大学院医学系研究科保健学専攻

生体情報検査学領域

金重 里沙

目次

要旨	1
第1章 緒論	
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	4
1-3 抗リン脂質抗体症候群の関連症状と関連抗体	5
1-4 抗リン脂質抗体	6
1-5 本研究の目的	13
第2章 本論「ELISA を用いた APS における血栓症リスクの検討」	
2-1 研究の背景および目的	14
2-2 対象と方法	16
2-3 結果	18
2-4 小括	23
第3章 本論「抗リン脂質抗体の組み合わせによる相乗的な血栓形成作用の発揮」	
3-1 研究の背景および目的	25
3-2 対象・材料と方法	28
3-3 結果	33
3-4 小括	39
3-5 新たな疾患概念（CMCI：cell-mediated coagulation induction）の提唱	41
第4章 本論「自動分析装置を用いた抗リン脂質抗体価測定の有効性検討」	
4-1 研究の背景および目的	43
4-2 対象と方法	44
4-3 結果	46
4-4 小括	50
第5章 結論	51
謝辞	53
引用文献	54

要旨

【背景および目的】

抗リン脂質抗体症候群 (APS) は、後天性血栓性素因の代表的な疾患であり、血液中にリン脂質に関連する自己抗体である抗リン脂質抗体 (群) が出現することにより、動脈及び静脈の血栓塞栓症や妊娠合併症などの極めて多彩な病態が特徴の自己免疫疾患である。

抗リン脂質抗体は、認識するエピトープの違いから幾つかのタイプが存在し、患者血中には複数種の抗リン脂質抗体が混在している。そこで本研究では、4種類の抗リン脂質抗体：抗カルジオリピン抗体 (aCL)、抗カルジオリピン/ β_2 -グリコプロテイン I 抗体 (aCL/ β_2 GPI)、抗ホスファチジルセリン抗体 (aPS)、抗ホスファチジルセリン/プロトロンビン抗体 (aPS/PT) を Homemade-ELISA にて測定し、動・静脈血栓症の発症に関連する抗リン脂質抗体のタイプを特定した。そして、代表的な患者血漿から各種抗リン脂質抗体を含有する IgG を純化・精製し、それらの血栓形成作用を動脈血栓と静脈血栓の差異に着目し、検討した。

上記研究により、APS では、単一の抗リン脂質抗体を保有する患者より複数種の抗リン脂質抗体を保有する患者において、より重篤な合併症が引き起こされる傾向を見出した。そこで、患者が保有する抗体の種類や力価から血栓症発症 (再発) リスクを層別化する発案に至った。しかしながら、抗リン脂質抗体 ELISA は測定の大部分がマニュアル操作であり測定者の熟練度に依存した施設間差が大きいこと、一度に複数種の抗体を測定できないなどの問題点が存在する。そこで、本研究では、APS 診断 (分類) 基準に採択されている4項目 (aCL・IgG/IgM, a β_2 GPI・IgG/IgM) が同時に測定可能な自動分析装置 AcuStar の臨床的有用性について検討した。

【対象と方法】

まず、SLE 184 症例 (動脈血栓症群 (n=32)、静脈血栓症群 (n=39)、無血栓症群 (n=113)) を対象に4種類の抗リン脂質抗体 (aCL, aCL/ β_2 GPI, aPS, aPS/PT) を Homemade-ELISA にて測定し、各種抗体の血栓症リスクを検討した。次に、SLE 155 症例 (血栓症 (n=55)、無血栓症群 (n=100)) を対象として、aCL/ β_2 GPI 及び aPS/PT の血栓性イベントの識別能を検討した。さらに、代表的な SLE 患者血漿から純化・精製した IgG を用いた *in vitro* の実験系にて、抗リン脂質抗体による種々の血栓形成作用 (APC の抗凝固活性に対する抑制作用、単球表面組織因子 (TF) 発現増強作用、単核球からの炎症性サイトカイン産生促進作用) を検討した。

また、原発性 APS 患者 20 例、SLE 合併 APS 患者 30 例、SLE (非 APS) 患者 10 例、膠原病 (APS, SLE 除く) 患者 40 例、健常人 30 例を対象に自動分析装置 AcuStar による抗リン脂質抗体価測定 (aCL・IgG/IgM, a β_2 GPI・IgG/IgM) を試み、その有用性を検証した。

【結果】

固相化リン脂質に対する抗体 (aCL・aPS) に比較して、リン脂質とエピトープ提供タンパクの複合体に対する抗体 (aCL/ β_2 GPI・aPS/PT) が動脈血栓症の発症に強く関連していることを見出した。さらに、aCL/ β_2 GPI(+)/aPS/PT(-), aCL/ β_2 GPI(-)/aPS/PT(+), aCL/ β_2 GPI(-)/aPS/PT(-) の患者群に比較して、aCL/ β_2 GPI(+)/aPS/PT(+) である患者群で血栓性イベント有病率並びに血栓性イベントの識別能が高いことを明らかにした。そして、今回、新たに aCL/ β_2 GPI 及び aPS/PT による APC の抗凝固活性に対する抑制作用を発見した。この IgG-抗リン脂質抗体による APC の抗凝固活性に対する抑制作用、単球表面 TF 発現作用及び単核球からの TNF- α 産生作用は、aCL/ β_2 GPI あるいは aPS/PT を単独で含有する IgG に比較して、aCL/ β_2 GPI 及び aPS/PT を共に含有する IgG において強力に増幅されることを見出した。

さらに、自動分析装置 AcuStar による抗リン脂質抗体の検出率は、従来の市販 ELISA キットに劣らない値を示したことに加え、AcuStar にて複数種の aPLs を同時測定することで APS 診断効率が向上する可能性が示唆された。

【考察】

我々は、本研究結果を元に APS の新たな血栓形成機序の概念である「CMCI (cell-mediated coagulation induction)」を打ち立てた。CMCI は IgG-抗リン脂質抗体刺激による単球表面 TF 発現あるいは TNF- α 産生をトリガーとして開始される。細胞表面に発現した TF は FVIIa と複合体を形成し、FX を活性化することによって、初期トロンビンの産生を促進する。産生された初期トロンビンが血小板や FV・FVIII・FXI を活性化し【増幅期】、活性化された血小板膜表面上で Tenase 及び Prothrombinase 複合体の形成が誘導される。この Prothrombinase 複合体の形成が瞬時に繰り返し起こることでトロンビンバーストに至り【増大期】、血栓形成に繋がる。本研究にて明らかにした aCL/ β_2 GPI 及び aPS/PT による単球表面 TF の発現増強作用並びに単核球からの TNF- α 産生増加の促進作用は、動脈・静脈問わず、血栓形成の中心的な役割を担っていると考えられる。

【結語】

本研究は、APS 関連合併症の中でも致死率の高い血栓症発症との関連が強い抗リン脂質抗体の組み合わせ (aCL/ β_2 GPI・aPS/PT) を明らかにし、新たな血栓形成機序の概念 (CMCI) を打ち立て、複数種の抗体を同時に測定できる自動分析装置の有用性を示した。本研究にて得た知見が APS の検査診断や病態解明の一助となれば幸いである。

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 (anti-phospholipid syndrome : APS) は、後天性血栓性素因の代表的な疾患であり、血液中にリン脂質に関連する自己抗体である抗リン脂質抗体群 (antiphospholipid antibodies : aPLs) の出現、及びそれに伴う極めて多彩な合併症を特徴とする¹⁻⁴⁾。1983年に Dr. Hughes によって抗リン脂質抗体と血栓症や流産との関連が報告され⁵⁾、1986年に同グループにより提唱された比較的新しい疾患概念である⁶⁾。

APS の臨床症状としては、動・静脈血栓症や妊娠合併症など多岐にわたる。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⁷⁾。動脈血栓症としては脳梗塞や一過性脳虚血発作などの脳血管障害が最も多く、動脈血栓症全体のほとんどを占めている⁸⁾。次いで、症例数は少ないが、心筋梗塞など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⁸⁾。このように、APS では、動脈・静脈を問わず血栓塞栓症を発症し、再発率も極めて高いことが特徴である。さらに、本疾患罹患患者の大半が比較的若い女性であるため、妊娠合併症も重要な病態である。

本疾患は、臨床的に原発性と二次性に大別される。前者は、既知の膠原病や明らかな基礎疾患・誘因を持たずに aPLs が出現することにより血栓症や習慣流産等を呈するため原発性 APS (primary APS)、後者は膠原病などに合併するため二次性 APS (secondary APS) と呼ばれている。二次性 APS の基礎疾患としては、全身性エリテマトーデス (systemic lupus erythematosus : SLE) が代表的であり⁹⁾、SLE 患者の約 40%に抗リン脂質抗体が出現するとされる^{10, 11)}。SLE に合併する APS では患者血中に多種多様な aPLs が出現し、様々な血栓塞栓症を引き起こすことが知られている^{12, 13)}。さらに、APS の特殊型として劇症型 APS (catastrophic APS : CAPS) がある¹⁴⁾。CAPS は、短期間に複数の臓器に微小血栓をきたし予後不良であることが知られているが、非常に稀な病態である^{15, 16)}。

原発性 APS は、難病指定されており、他の膠原病と同様に遺伝的要因や環境的要因が想定されるが詳細な病因は不明のままである。

1-2 抗リン脂質抗体症候群の診断

現在、抗リン脂質抗体症候群（APS）の診断には、2006年に改訂された診断（分類）基準（Sydney revised Sapporo criteria）¹⁷⁾が有用である（Table 1）。

APSの診断は、「臨床所見」と「検査所見」の双方からなされる。「臨床所見」として動・静脈血栓症や妊娠合併症が認められ、「検査所見」として代表的な抗リン脂質抗体である抗カルジオリピン抗体（anti-cardiolipin antibodies : aCL）、抗 β_2 -グリコプロテインI抗体（anti- β_2 -glycoprotein I antibodies : a β_2 GPI）、ループスアンチコアグラント（lupus anticoagulant : LA）が検出された場合にAPSと診断される。

APSの検査診断において抗リン脂質抗体の検出は必須であるが、抗リン脂質抗体は、検出法の違いから大きく2つに大別される。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活性と標準化されたELISAを用いて検出するaCL及びa β_2 GPIである。前者は定性試験、後者は定量試験である。

Table 1. 抗リン脂質抗体症候群診断（分類）基準（Sydney revised Sapporo criteria）

<p>【臨床所見】</p> <p>1. 動・静脈血栓症 表層性の血栓以外は、画像診断で明らかにするか病理組織学的に血管炎を伴わない血栓であることを確認する必要がある。</p> <p>2. 妊娠合併症 a. 妊娠10週以降で他に原因のない正常形態胎児の死亡 b. 妊娠高血圧症候群、子癇又は胎盤機能不全による妊娠34週以前の正常形態胎児の早産 c. 3回以上連続した妊娠10週以前の流産 (母体の解剖学的異常、内分泌学的異常、父母の染色体異常を除く.)</p> <p>【検査所見】</p> <p>1. 国際血栓止血学会（ISTH）標準化委員会の診断ガイドラインに基づく方法で12週間以上の間隔をあけて2度以上ループスアンチコアグラント（lupus anticoagulant : LA）活性が検出される</p> <p>2. 中等度以上の力価（>40単位、又は、>健常人の99パーセントイル）のIgGクラス又はIgMクラスの抗カルジオリピン抗体（anti-cardiolipin antibodies : aCL）が12週間以上の間隔をあけて2度以上検出される。</p> <p>3. 中等度以上の力価（>40単位、又は、>健常人の99パーセントイル）のIgGクラス又はIgMクラスの抗β_2-グリコプロテインI抗体（anti-β_2-glycoprotein I antibodies : aβ_2GPI）が12週間以上の間隔をあけて2度以上検出される。</p> <p>診断：臨床所見が1つ以上確認され、かつ、検査所見が1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。</p>
--

1-3 抗リン脂質抗体症候群の関連症状と関連抗体¹⁷⁾

APS 診断（分類）基準¹⁷⁾に採用されている、動・静脈血栓症や妊娠合併症以外の APS 関連症状及び関連抗体を示す（Table 2）。これらの関連症状と関連抗体を APS 診断基準に含めると、APS 診断の特異性を低下させる可能性があるため採用されていない。

関連症状の中でも、血小板減少症は、APS を疑うきっかけとなる重要な所見であるが、免疫性血小板減少症（ITP）のように血小板減少症に加え、抗リン脂質抗体陽性である疾患も存在することも念頭に置いておかなければならない。血小板減少症を呈し、抗リン脂質抗体が持続的に陽性を示す患者群では、血栓症発症リスクが高いことから詳細な follow-up が必要である。

Table 2. 抗リン脂質抗体症候群の関連症状と関連抗体

<p>【関連症状】</p> <ul style="list-style-type: none">○血小板減少症○心弁膜症○網状皮斑○腎疾患○神経症状 <p>【関連抗体】</p> <ul style="list-style-type: none">○IgA クラスの aCL○IgA クラスの aβ₂GPI○抗ホスファチジルセリン抗体（anti-phosphatidylserine antibodies : aPS）○抗ホスファチジルセリン・エタノールアミン抗体 （anti-phosphatidyl ethanolamine antibodies : aPE）○抗プロトロンビン抗体（anti-prothrombin antibodies : aPT）○抗ホスファチジルセリン／プロトロンビン抗体 （anti-phosphatidylserine/prothrombin antibodies : aPS/PT）

1-4 抗リン脂質抗体

1-4-1 ループスアンチコアグラント (lupus anticoagulant : LA)

ループスアンチコアグラント (lupus anticoagulant : LA) は、1952年にはじめて SLE 患者にて検出され¹⁸⁾、1972年に“lupus anticoagulant”と命名された¹⁹⁾。さらに、1980年に LA が免疫グロブリンであることが示された²⁰⁾。LA は、*in vitro*におけるリン脂質依存性の凝固反応のみを阻害し、他の凝固因子を阻害することのない免疫グロブリンと定義されている。LA は、抗リン脂質抗体のひとつであり、責任抗体としては aPS/PT あるいは a β_2 GPI が候補として挙げられているが、それ以外の抗体の関与も否定できない²¹⁾。

現在、病院検査部における APS の検査診断は主に LA 活性による定性検査にて実施されている。LA 検査は、国際血栓止血学会 (ISTH) 標準化委員会が 2009 年に改訂した診断ガイドライン²²⁾に基づいた方法で行う (Figure 1)。その概略としては、*in vitro*におけるリン脂質依存性凝固時間の延長を調べるスクリーニング試験、凝固時間の延長がインヒビターによるものであることを確認するクロスミキシング試験、インヒビターが凝固因子に対してではなくリン脂質に対して特異的であることを証明する確認試験など、多段階の測定系により判定する必要がある。ルーチン検査に組み込むのは至難の業である。

スクリーニング試験では、活性化部分トロンボプラスチン時間 (activated partial thromboplastin time : APTT) あるいは希釈ラッセル蝮毒時間 (dilute Russell viper venom time : dRVVT) の測定系を用いる。カオリン凝固時間 (kaolin clotting time : KCT) や希釈プロトロンビン時間 (dilute prothrombin time : dPT) は推奨されていない。わが国における外注 LA 検査は、dRVVT 系 LA 検査であることが多く、dRVVT 系 LA が陰性であった場合に LA 陰性と判定している例が多いが、dRVVT 系 LA と APTT 系 LA の双方を測定しないと LA を見落とす可能性がある。また、使用する試薬間で LA の感受性に差があるため、LA に高感度の APTT 試薬を用いて検査する必要がある。APTT 系 LA 検査では①PTT-LA (富士レビオ社)、②トロンボチェック APTT-SLA (シスメックス社)、③コアグピア® APTT-N (積水メディカル社)、④ヒーモスアイエル APTT-SP (Werfen 社) が、dRVVT 系 LA 検査では①LA test Gradipore (MBL 社)、②ヒーモスアイエル dRVVT 試薬 (アイ・エル・ジャパン社)、③コアグピア® LA (積水メディカル社)、④LA1 スクリーニング試薬/LA2 確認試薬 (シスメックス社) が日本血栓止血学会標準化委員会により推奨され、主に用いられている。LA test Gradipore は確認試験も同時に行うことができるため測定しやすい。

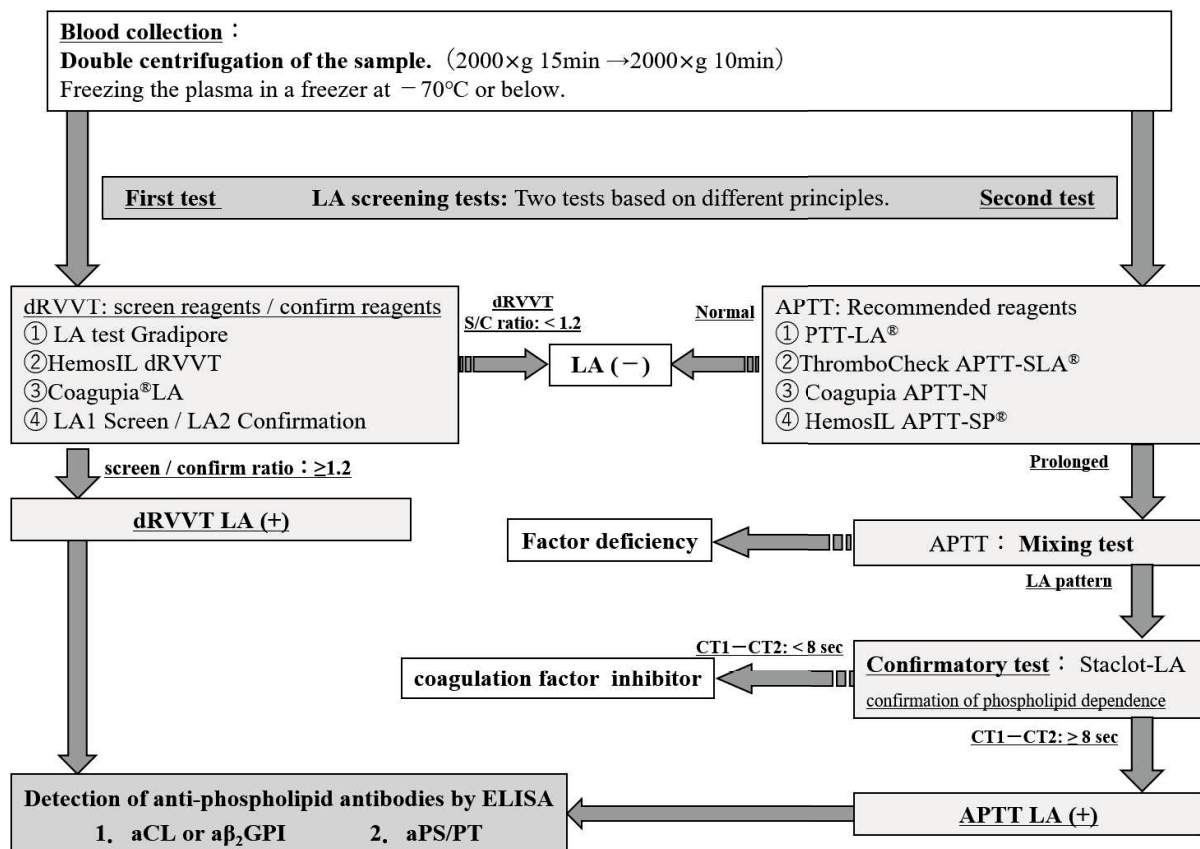


Figure 1. The guideline for lupus anticoagulant detection based on ISTH guideline (2009)²²⁾

クロスミキシング試験は、被検血漿と患者血漿を種々の割合で混合し、凝固時間の延長がどのように補正されるかを確認する検査である。クロスミキシング試験には、混合直後に凝固時間を測定する「即時反応」と 37°C 2 時間インキュベート後に凝固時間を測定する「遅延反応」がある。LA では即時反応で上に凸のパターン又は直線性パターンを呈し、遅延反応でもそのパターンに変化はみられない。また、S 字パターンをはじめとした悩ましい症例も存在するが、1 ポイントでも上に凸の部位があれば LA を疑うべきとされる。被検血漿と患者血漿の混合比率及び測定ポイント数は標準化されていないが、ISTH ガイドライン²¹⁾では被検血漿：患者血漿=1：1 を含めた 3 ポイントで良いことになっている。ミキシング研究会において、患者血漿の混合比が 10%あるいは 20%の凝固時間は LA 判定に有用であることに加え、50%の凝固時間が凝固因子欠損の判定に有用であったとされ、クロスミキシング試験における血漿混合比は（健常人血漿：患者血漿）=（10：0）、（9：1）、（8：2）、（5：5）、（0：10）の 5 ポイントを推奨するとして検討結果が報告されている²³⁾。

確認試験では、被検血漿に過剰なリン脂質を添加することにより凝固時間の延長が是正されるか否かを確認することで、インヒビターがリン脂質に特異的であることを証明できる。

LA 検査の注意点としては、血漿中の残存血小板がリン脂質の供給源になり、LA が偽陰性を呈することが挙げられる。このように、血漿中の残存血小板数が LA 検査に影響を与えるため、ISTH ガイドライン²²⁾では LA 検査に用いる血漿を 2 重遠心処理することを推奨している。採血後 1 回目の遠心 (2000×g, 15min) を行い、プラスチック製のピペットを用いてプラスチック製のチューブに血漿を移す。その後 2 回目の遠心 (>2500×g, 10min) を行い、さらに別のチューブに血漿を移すが、この際チューブ底にある血小板を含めないよう注意する。2 重遠心以外にも 0.2µm フィルターを用いて血小板を除去する方法があるが、濾過される血漿量や用いるフィルターが統一されていないことに加え、フォン・ヴィレブランド因子 (von Willebrand factor : vWF) の損失等が起こるため、推奨されていない。

1-4-2 ループスアンチコアグラント・低プロトロンビン血症症候群

(lupus anticoagulant-hypoprothrombinemia syndrome : LAHPS)

ループスアンチコアグラント・低プロトロンビン血症症候群 (lupus anticoagulant-hypoprothrombinemia syndrome : LAHPS) は、1960 年に Rapaport らによって初めて報告された稀な疾患である²⁴⁾。1976 年には、LAHPS においてプロトロンビン活性とプロトロンビン抗原濃度の両方が減少することが示された²⁵⁾。さらに、Bajaj らはプロトロンビン-抗プロトロンビン抗体複合体が体内から急速にクリアランスされることにより低プロトロンビン血症を引き起こし、第 II 因子欠乏症や出血傾向を引き起こすと提唱した²⁶⁾。

LAHPS は、「プロトロンビン活性低下を伴う LA 陽性者」と定義されており、臨床症状としては LA に伴う血栓傾向に加え、血小板減少症や血小板機能不全、プロトロンビン欠乏症等の凝固障害に起因した軽度～重度の出血症状が生じる^{27,28)}。

Mulliez らは、LAHPS 症例においてプロトロンビンや第 VIII, IX, XI 因子活性の著しい低下を認め、内因系凝固因子である第 VIII, IX, XI 因子活性はサンプルを希釈し、測定すると活性が正常域まで戻ったが、プロトロンビン活性は希釈しても活性の低下が改善されなかったと報告している²⁹⁾。

1-4-3 抗カルジオリピン抗体 (anti-cardiolipin antibodies : aCL)

1906年、Wasserman と Neisser により、はじめて梅毒患者血清中にリン脂質に対するレアギンが存在することが示された³⁰⁾。このレアギンは、先天梅毒児の肝臓から抽出したトレポネーマ (Treponema Pallidum : TP) を抗原として梅毒患者血清と反応させ、補体結合反応によって血清学的に検出される (Wassermann 反応)。しかし、後に患者血清と反応するレアギンは TP ではなく、ウシの心臓由来の酸性リン脂質であることが明らかになり、カルジオリピンと命名された³¹⁾。このレアギン (カルジオリピン) に対する抗体は、梅毒患者血中に高頻度に認められるものの、梅毒に対する特異性はなく、感染症や自己免疫疾患である SLE 患者で生物学的偽陽性を示すことが明らかになった³²⁾。

その後、長年にわたり、抗カルジオリピン抗体 (anti-cardiolipin antibodies : 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、1983年に固相化カルジオリピンを用いたラジオイムノアッセイ (radioimmunoassay : RIA)³³⁾が、1984年に酵素固相化免疫測定法 (enzyme-linked immunosorbent assay : ELISA)³⁴⁾による測定系が相次いで確立され、これらの測定法が aCL 検出に用いられるようになった。

aCL は、対応抗原の違いにより区別される。APS に特異性の高い aCL は、カルジオリピンそのものに対する抗体ではなく、カルジオリピンと β_2 GPI の複合体に対する抗体であり、その結合エピトープはカルジオリピンと結合することにより構造変化を起こした β_2 GPI 上に存在する³⁵⁻³⁹⁾。したがって、APS に特異性の高い aCL は、 β_2 GPI 依存性 aCL と呼ばれる測定系で検出される抗体であり、抗カルジオリピン/ β_2 -グリコプロテイン I 抗体 (anti-cardiolipin/ β_2 -glycoprotein I antibodies : aCL/ β_2 GPI) と呼ばれる (Figure 2)。

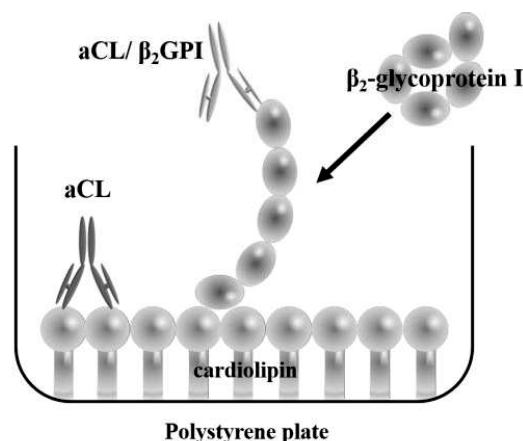


Figure 2. Detection the anti-cardiolipin/ β_2 -glycoprotein I antibodies (aCL/ β_2 GPI)

β_2 GPI は、326 個のアミノ酸から構成される分子量 42kDa 単鎖糖タンパク質であり、健康人血清中に 100~200 μ g/mL と比較的高濃度で存在する。 β_2 GPI は、5つのドメイン（ドメイン I~V）より構成されており^{40,41}、血液中を循環する際はドメイン I と V が結合した環状構造をとっている。しかし、 β_2 GPI のドメイン V が酸性リン脂質に結合することによって β_2 GPI が開環し⁴²、線状構造となることによって aCL の認識エピトープが発現することが明らかになっている^{43,44} (Figure 3)。

さらに、5つのドメインの中でも、ドメイン I に発現するエピトープに対する抗体が APS における血栓性合併症と高い相関を示すことが報告されている^{45,46}。

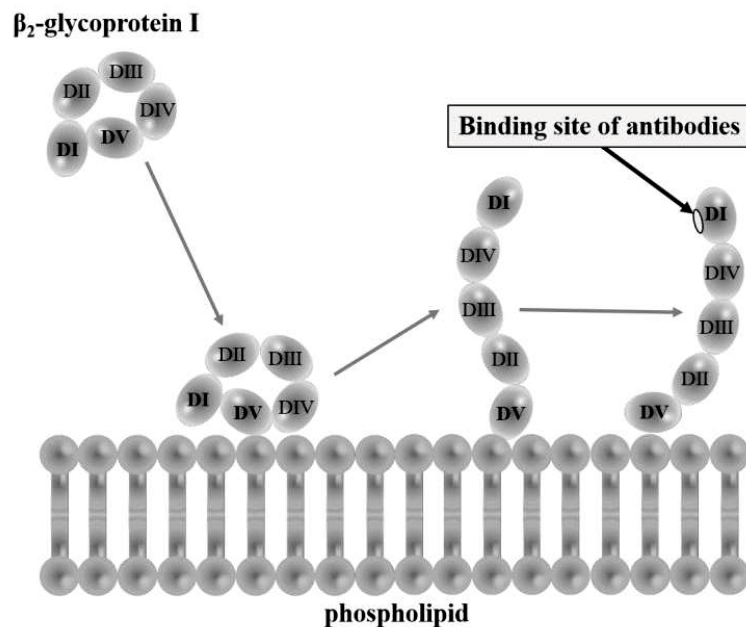


Figure 3. β_2 -glycoprotein I can exist in 2 conformations⁴³

β_2 GPI 依存性 aCL (aCL/ β_2 GPI) の測定系では、原理上 β_2 GPI 依存性 aCL 以外にも固相化カルジオリピンに直接結合する β_2 GPI 非依存性 aCL (疾患特異性の低い抗体) も併せて検出され、両者の鑑別は困難である。しかし、“抗 CL・ β_2 GPI キット「ヤマサ」EIA (ヤマサ醤油株式会社)”を用いると、 β_2 GPI 依存性 aCL の測定と β_2 GPI 非依存性 aCL の測定を同時に行うことができることに加え、 β_2 GPI 依存性 aCL が陽性かつ β_2 GPI 非依存性 aCL の力価よりも高い場合に陽性と判定するため、両者の鑑別が可能になる。

1-4-4 抗 β_2 -グリコプロテイン I 抗体 (anti β_2 -glycoprotein I antibodies : $a\beta_2$ GPI)

疾患特異性が高い抗リン脂質抗体である β_2 GPI 依存性 aCL (aCL/ β_2 GPI) の抗体結合エピトープは、酸性リン脂質であるカルジオリピンに結合することによって構造変化を起こした β_2 GPI 上に発現する^{43,44)}が、 β_2 GPI 上のエピトープは、強力な酸化処理 (γ 線照射) を施した ELISA プレートに β_2 GPI を物理吸着した際にも同様に結合エピトープが発現することが明らかになっている⁴⁷⁾。したがって、カルジオリピンを固相化抗原として用いずに直接 β_2 GPI を γ 線照射プレートに固相化して aCL を検出する測定系が確立されており、この測定系で検出される抗リン脂質抗体を抗 β_2 グリコプロテイン I 抗体 (anti β_2 -glycoprotein I antibodies : $a\beta_2$ GPI) と呼ぶ (Figure 4)。

$a\beta_2$ GPI は、基本的には、aCL/ β_2 GPI と同じ抗体を検出していると考えられている。ELISA による $a\beta_2$ GPI の定量は、aCL と同様に APS の診断基準に採択されているが、スクリーニング検査の意味合いが強い aCL に比して $a\beta_2$ GPI は aCL の疾患特異性を高めることが報告されている⁴⁸⁾。

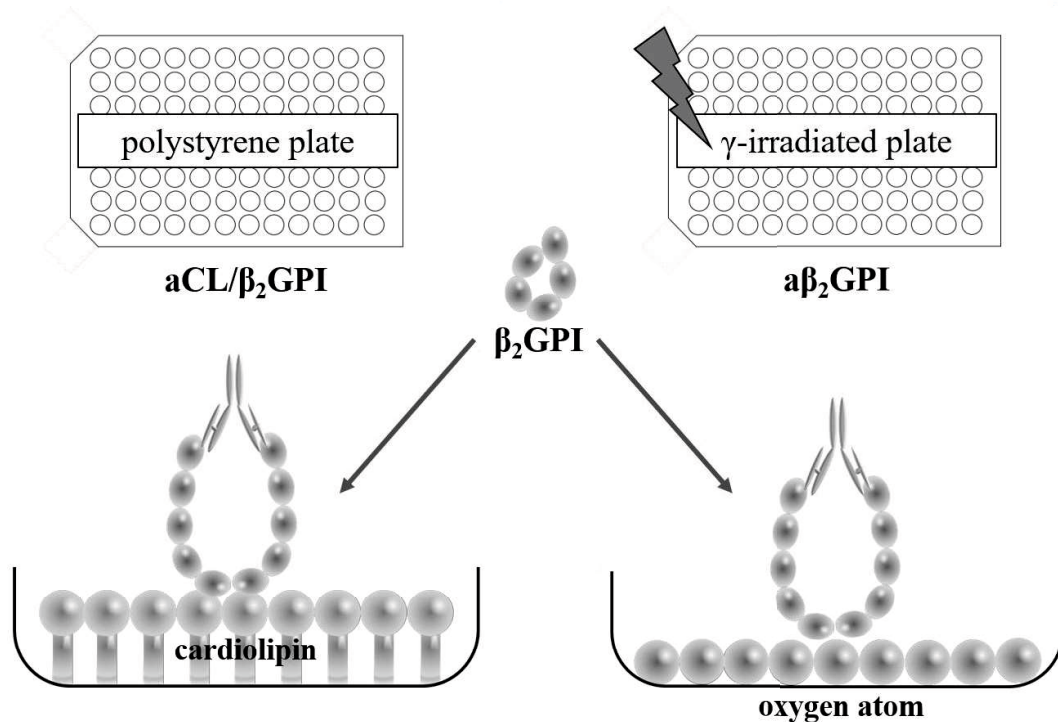


Figure 4. Detection the $a\beta_2$ GPI (anti β_2 -glycoprotein I antibodies)

1-4-5 抗プロトロンビン抗体 (anti-prothrombin antibodies : aPT)

1984年にEdsonらによって、大部分のLA陽性患者においてプロトロンビン欠乏の有無に関わらず、プロトロンビンに対する抗体(抗プロトロンビン抗体)が存在することが発見された⁴⁹⁾。その後、FleckらがLA陽性患者の74%に抗プロトロンビン抗体(anti-prothrombin antibodies : aPT)が出現することを明らかにし、LAとaPTの間に強い関連性があることを示した⁵⁰⁾。aPTはプロトロンビン分子上のエピトープと交差反応を起こすことが示唆されているが⁵¹⁾、結果として生じる第II因子欠乏は、LAによる血栓傾向から患者を保護する可能性があることが推測されている⁵¹⁾。さらに、プロトロンビンとaPTの複合体がプロトロンビナーゼ及びテンナーゼの形成を阻害することによりLA活性を発揮することが明らかになっている⁵²⁾。

しかしながら、aPTとLAの関連性が示されて久しいにも関わらず、プロトロンビンに直接結合するaPT(リン脂質非依存性aPT)の臨床的意義は明らかになっていない⁵³⁾。

1-4-6 抗ホスファチジルセリン/プロトロンビン抗体 (anti-phosphatidylserine/prothrombin antibodies : aPS/PT)

aPTには、プロトロンビンに直接結合するaPTとリン脂質を介してプロトロンビンに結合するaPT(リン脂質依存性aPT)の2種類がある⁵⁴⁾。リン脂質依存性aPTの結合エピトープは、主要な細胞膜構成リン脂質であるホスファチジルセリンに結合することによって構造変化を起こしたプロトロンビン分子上に出現する²¹⁾。このリン脂質(ホスファチジルセリン)依存性aPTを抗ホスファチジルセリン/プロトロンビン抗体(anti-phosphatidylserine/prothrombin antibodies : aPS/PT)と呼び、ELISAによる測定系が確立されている。ELISAにてaPS/PTを検出する際は、カルシウムイオン(Ca^{2+})存在下で固相化したホスファチジルセリンにプロトロンビンを結合させる。aPS/PTは、APS患者における臨床症状やLAとも強く相関する²¹⁾ことから、LAの補助診断としての意義が大きい。

aPS/PTは、現段階ではAPSの診断基準には採択されていないが、将来有望視される抗リン脂質抗体である。

1-4-7 抗ホスファチジルセリン抗体 (anti-phosphatidylserine antibodies : aPS)

リン脂質非依存性aPTとリン脂質依存性aPT(aPS/PT)の両者を含んでいることから、aPSの測定はスクリーニングの意味合いが強い。

1-5 本研究の目的

後天性血栓性素因の代表的疾患である APS は、血液中にリン脂質に関連する自己抗体である aPLs の出現と、それに伴う極めて多彩な血栓塞栓性合併症を特徴とする。APS 最大の特徴は、動脈・静脈を問わずに血栓塞栓症を繰り返し発症することである。抗リン脂質抗体は、認識するエピトープの違いから幾つかのタイプが存在し、患者血中には複数種の抗リン脂質抗体が混在している。

本研究では、4 種類の抗リン脂質抗体：aCL, aCL/ β_2 GPI, aPS, aPS/PT を Homemade-ELISA にて測定し、動・静脈血栓症の発症に関連する抗リン脂質抗体のタイプを探索するとともに、代表的な SLE 患者血漿から各種抗リン脂質抗体を含有する IgG を純化・精製し、それらの血栓形成作用を動脈血栓と静脈血栓の差異に着目し検討した。

さらに、APS の検査診断において抗リン脂質抗体の検出は必須事項であるが、市販 ELISA キットを用いたマニュアルでの抗リン脂質抗体価測定は測定者の熟練度によって測定値にばらつきがみられることや、一度に複数種の抗体を測定できないなどの問題点が存在する。そこで、APS 診断（分類）基準に採択されている 4 項目（aCL・IgG/IgM, α_2 GPI・IgG/IgM）を同時に測定可能な自動分析装置 AcuStar を用いた抗リン脂質抗体価測定を試み、自動分析装置の臨床的有用性を検討した。

第2章

本論

ELISA を用いた APS における血栓症リスクの検討

2-1 研究の背景および目的

全身性エリテマトーデス (systemic lupus erythematosus : SLE) は、代表的な全身性自己免疫疾患であり、有病率は 10 万人当たり 3.2~517.5 人と報告されているが人種差がある⁵⁵⁾。日本における特定医療費 (指定難病) 受給者証所持者数は、厚生労働省衛生行政報告例から約 6 万人 (平成 30 年度末) となっており、日本人における有病率は 10 万人当たり約 50 人と推定できる。

SLE は、抗核抗体 (anti-nuclear antibody : ANA) や抗 2 本鎖 (double-stranded : ds) DNA 抗体、抗 RNP 抗体、抗 Sm 抗体など、多彩な自己抗体の出現とそれに伴う多臓器病変の進展が特徴である。発症のピークは妊娠可能年齢にあり、発熱や倦怠感、皮膚症状 (蝶形紅斑)、糸球体腎炎 (ループス腎炎)、中枢神経症状 (CNS ループス) など多彩な病態が症例ごとにみられる⁵⁶⁾。副腎皮質ステロイドの使用により 10 年生存率が 90%程まで上昇しているが、寛解と再発を繰り返しながら難治性の経過をとる症例も存在する⁵⁷⁾。

SLE の診断には、アメリカリウマチ学会 (American College of Rheumatology : ACR) が 1997 年に改訂した SLE 分類基準が用いられている⁵⁸⁾ (Table 3)。この ACR criteria では SLE と抗リン脂質抗体の関連が考慮されており、それ以前の基準⁵⁹⁾に採択されていた LE 細胞陽性が削除され、抗リン脂質抗体 (aCL IgG/IgM クラス・LA・梅毒反応のいずれか) 陽性に変更された。しかしながら、SLE の予後を左右するループス腎炎を認めても SLE の診断に至らない等の問題点が存在するため、SLE の新分類基準 (The Systemic Lupus International Collaborating Clinics criteria : SLICC criteria) が 2012 年に提案された⁶⁰⁾。SLICC criteria は、臨床的項目と血清学的項目に分けられており、両者の少なくとも 1 項目以上を認め、合計で 4 項目陽性であれば SLE と診断する。さらに、ANA 又は抗 dsDNA 抗体が陽性かつ病理組織学的にループス腎炎が証明された場合にも SLE と診断できるが、国際的合意には達していない。

さらに、SLEは、重症度に応じて症状や治療法が異なることに加え、指定難病として医療費助成を受ける際の認定基準にも重症度が採用されている。重症度の指標としては、SLEの疾患活動性を見る指標であるSLEDAIスコア⁶¹⁾が代用されている。スコア4点以上を重症と判定し、医療費助成を申請する際も、同様に4点以上であることが求められる。

Table 3. 全身性エリテマトーデス分類基準 (ACR criteria)

1. 頬部皮疹	頬部の平坦または隆起した紅斑で鼻唇溝より下に及ばない 鼻根部を含めば蝶形紅斑という
2. 円板状皮疹	隆起性の紅斑で角化鱗屑及び毛嚢塞栓を伴う 古い病変部には萎縮性瘢痕を生じる可能性がある
3. 日光過敏	日光（紫外線曝露）に対する異常反応の結果生じる 患者の病歴または医師の診察所見による
4. 口腔潰瘍	口腔，鼻咽喉に生じ，無痛性のことが多い
5. 関節炎	2領域以上の末梢関節の圧痛，腫脹を特徴とした非破壊性関節炎
6. 漿膜炎	a. 胸膜炎 b. 心外膜炎 のいずれか
7. 腎障害	a. 1日あたり0.5gを超える，あるいは+++以上の持続性蛋白尿 b. 細胞円柱 のいずれか
8. 神経障害	a. 痙攣 b. 精神症状 のいずれか ※薬物または既知の代謝異常がない場合
9. 血液異常	a. 溶血性貧血（網状赤血球症） b. 白血球減少（2度以上<4,000/ μ L） c. リンパ球減少（2度以上<1,500/ μ L） d. 血小板減少（薬剤性を除き<100,000/ μ L）のいずれか
10. 免疫異常	a. 抗ds-DNA抗体 b. 抗Sm抗体 c. 抗リン脂質抗体（抗カルジオリピン抗体IgG/IgMクラス・ ループスアンチコアグラント・梅毒反応）のいずれかが陽性
11. 抗核抗体	臨床経過のいずれの時点でもよく，任意の時点免疫蛍光抗体法 あるいは等価の方法によって検出 薬剤誘発性ループスの原因薬物を使用

SLE は、二次性 APS の最も代表的な基礎疾患であり、SLE 患者の約 4 割が APS を合併する^{62,63}。SLE に合併する APS では、多種多様な抗リン脂質抗体の出現と多彩な血栓塞栓性合併症を呈することが知られている^{63,64}。

本研究では、SLE を基礎疾患とする二次性 APS を対象に、Homemade-ELISA にて 4 種類の抗リン脂質抗体価（抗カルジオリピン抗体（aCL）、抗カルジオリピン/ β_2 -グリコプロテイン I 抗体（aCL/ β_2 GPI）、抗ホスファチジルセリン抗体（aPS）、抗ホスファチジルセリン/プロトロンビン抗体（aPS/PT））を測定し、各種抗体の血栓症リスクを検討した。

2-2 対象と方法

本研究は、山口大学大学院医学系研究科保健学専攻医学系研究倫理審査委員会の承認（管理番号：363）を得て実施した。

I. 対象

ACR criteria⁵⁸)を満たす SLE 184 症例を対象とした。性別は男性が 10 例、女性が 174 例であり、平均年齢は 45.5 歳 [3~82 歳] であった。臨床診断にて全 184 症例を動脈血栓症群 32 例、静脈血栓症群 39 例、無血栓症群 113 例の 3 群に分類した。

II. 方法

(i) aCL-ELISA および aCL/ β_2 GPI-ELISA

- ① 96well プレート (POLYSORP) の各 well にエタノールで 50 μ g/mL に調整したカルジオリピンを 30 μ L ずつ添加した。
- ② ドライヤーによる冷風を当て、well が乾燥したのを目視で確認した後、速やかにブロッキング buffer (20 mM Tris-HCl, 0.1 M NaCl, 0.5% BSA, pH 7.4) を 200 μ L ずつ添加し、室温にて 2 時間静置した。
- ③ 各 well を洗浄 buffer (20 mM Tris-HCl, 0.1 M NaCl, 0.05% Tween 20, pH 7.4) にて 4 回洗浄した。
- ④ aCL/ β_2 GPI ELISA では希釈 buffer (20 mM Tris-HCl, 0.1 M NaCl, 0.5% BSA, 0.05% Tween 20, pH 7.4) にて 10 μ g/mL の濃度に調整した β_2 -glycoprotein I を 50 μ L、aCL-ELISA では希釈 buffer のみを 50 μ L ずつ添加し、室温にて 30 分間反応させた。
- ⑤ 各 well に希釈バッファーにて 101 倍希釈したサンプル血漿を 100 μ L 添加し、室温にて 1 時間反応させた。

- ⑥ 各 well を洗浄 buffer にて 4 回洗浄後，酵素標識抗体液（ペルオキシダーゼ標識抗ヒト IgG 抗体）を各 well に 100 μ L ずつ添加し，室温にて 1 時間反応させた。
- ⑦ 各 well を洗浄後，発色基質であるテトラメチルベンジジン（TMB）を 100 μ L 加え，10 分間発色させた後，HCl を 100 μ L 加えることにより反応を停止し，マイクロプレートリーダーにて波長 450 nm の吸光度（OD）を測定した。

(ii) aPS-ELISA および aPS/PT-ELISA

- ① 96well プレート（POLYSORP）の各 well にエタノールで 50 μ g/mL に調整したホスファチジルセリンを 30 μ L ずつ添加した。
- ② ドライヤーによる冷風を当て，well が乾燥したのを目視で確認した後，速やかにブロッキング buffer（20 mM Tris-HCl, 0.1 M NaCl, 5 mM CaCl₂, 0.5% BSA, pH 7.4）を 200 μ L ずつ添加し，室温にて 2 時間静置した。
- ③ 各 well を洗浄 buffer（20 mM Tris-HCl, 0.1 M NaCl, 5 mM CaCl₂, 0.05% Tween 20, pH 7.4）にて 4 回洗浄した。
- ④ aPS/PT-ELISA では希釈 buffer（20 mM Tris-HCl, 0.1 M NaCl, 5 mM CaCl₂, 0.5% BSA, 0.05% Tween 20, pH 7.4）にて 10 μ g/mL の濃度に調整した prothrombin を 50 μ L，aPS-ELISA では希釈 buffer のみを 50 μ L ずつ添加し，室温にて 30 分間反応させた。
- ⑤ 各 well に希釈バッファーにて 101 倍希釈したサンプル血漿を 100 μ L 添加し，室温にて 1 時間反応させた。
- ⑥ 各 well を洗浄 buffer にて 4 回洗浄後，酵素標識抗体液（ペルオキシダーゼ標識抗ヒト IgG 抗体）を各 well に 100 μ L ずつ添加し，室温にて 1 時間反応させた。
- ⑦ 各 well を洗浄後，発色基質であるテトラメチルベンジジン（TMB）を 100 μ L 加え，10 分間発色させた後，HCl を 100 μ L 加えることにより反応を停止し，マイクロプレートリーダーにて波長 450 nm の吸光度（OD）を測定した。

(iii) 統計解析

Nojima ら⁶⁴⁾の方法に準じ，OD 値に 1,000 を乗じた数値を抗体価（mOD）とした。4 種類（aCL・aCL/ β ₂GPI・aPS・aPS/PT）の抗リン脂質抗体価を合併症群別に分け，Mann-Whitney test にて有意差を検定するとともに，ROC 曲線により感度・特異度曲線の交点（感度＝特異度）を求め，その点をカットオフ値として設定した。さらに，動・静脈血栓症の危険因子として有用な抗リン脂質抗体を特定する目的で，ROC 解析にて曲線下面積（AUC）を算出し比較した。解析には統計解析ソフト（StatFlex ver. 6）を用いた。

2-3 結果

2-3-1 各種抗リン脂質抗体価 (aCL・aCL/ β_2 GPI・aPS・aPS/PT) の比較

SLE 184 症例 (動脈血栓症群 (n=32), 静脈血栓症群 (n=39), 無血栓症群 (n=113)) を対象に, 4 種類 (aCL・aCL/ β_2 GPI・aPS・aPS/PT) の抗リン脂質抗体価測定を実施し, 合併症別の抗体価を比較した (Figure 5). その結果, 測定した 4 種類の抗リン脂質抗体全てが無血栓症群に比較して血栓症群で有意に抗体価が高いことが明らかになった. 各抗リン脂質抗体のカットオフ値は, aCL で 438.84 mOD, aCL/ β_2 GPI で 206.00 mOD, aPS で 384.56 mOD, aPS/PT で 172.21 mOD となった (Table 4). その際の感度は, aCL/ β_2 GPI が 0.8584 で最も高く, 続いて aPS/PT が 0.8169, aPS が 0.7465, aCL が 0.7345 であった (Table 4).

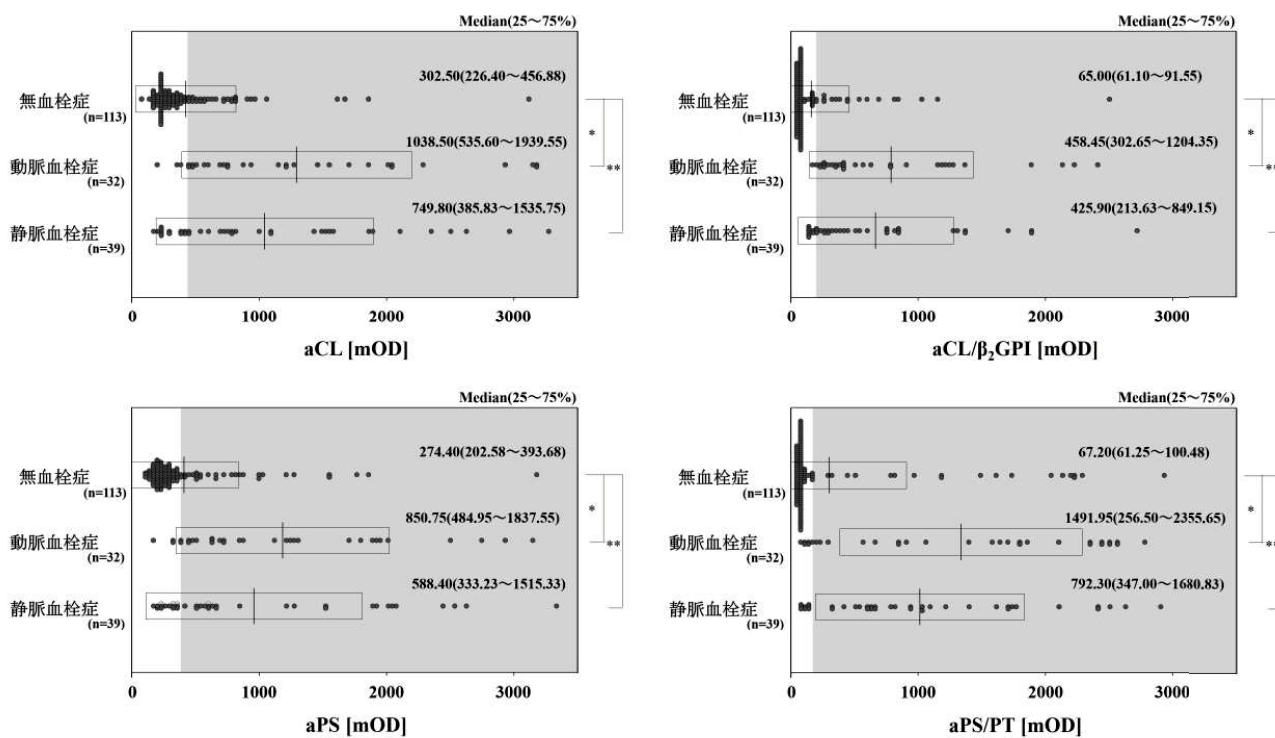


Figure 5. SLE 患者における各種抗リン脂質抗体価の合併症別比較⁶⁵⁾

Mann-Whitney test : *無血栓症 vs. 動脈血栓症, $P < 0.0001$; **無血栓症 vs. 静脈血栓症, $P < 0.0001$

	カットオフ値 [mOD]	感度
aCL	438.84	0.7345
aCL/β_2GPI	206.00	0.8584
aPS	384.56	0.7465
aPS/PT	172.21	0.8169

Table 4. 各種抗リン脂質抗体のカットオフ値と感度 ⁶⁵⁾

2-3-2 各合併症群における各種抗リン脂質抗体陽性率の比較

Table 4 に示したカットオフ値を用いて、各種抗リン脂質抗体の陽性率を合併症群別（動脈血栓症、静脈血栓症、無血栓症）に比較した（**Table 5**）。その結果、aCL の陽性率は動脈血栓症群で 84.4% (n=27)、静脈血栓症で 66.7% (n=26)、無血栓症で 26.5% (n=30)、aCL/ β_2 GPI の陽性率は動脈血栓症で 96.9% (n=31)、静脈血栓症で 76.9% (n=30)、無血栓症で 14.2% (n=16) であった。aPS の陽性率は動脈血栓症で 87.5% (n=28)、静脈血栓症で 64.1% (n=25)、無血栓症で 25.7% (n=29)、aPS/PT の陽性率は動脈血栓症で 84.4% (n=27)、静脈血栓症で 79.5% (n=31)、無血栓症で 18.6% (n=21) であった（**Table 5**）。4 種類全ての抗リン脂質抗体が無血栓症群に比較して血栓症群（動脈血栓症群及び静脈血栓症群）で有意に高い陽性率を示したが、固相化リン脂質（CL や PS）を標的抗原とした aCL-ELISA や aPS-ELISA では無血栓症群でも 26.5%、25.7% と比較的高い陽性率を示したのに対して、固相化リン脂質とエピトープ提供タンパクの複合体（CL/ β_2 GPI や PS/PT）を抗原とした aCL/ β_2 GPI-ELISA や aPS/PT-ELISA では無血栓症群における陽性率が低く、かつ、血栓症群で高い陽性率を示すが高いことが明らかになった。

	動脈血栓症 n=32 % (n)	静脈血栓症 n=39 % (n)	無血栓症 n=113 % (n)
aCL	84.4% (27)	66.7% (26)	26.5% (30)
aCL/β_2GPI	96.9% (31)	76.9% (30)	14.2% (16)
aPS	87.5% (28)	64.1% (25)	25.7% (29)
aPS/PT	84.4% (27)	79.5% (31)	18.6% (21)

Table 5. 合併症群別各種抗リン脂質抗体陽性率の比較 ⁶⁵⁾

2-3-3 血栓症の危険因子として有用な抗リン脂質抗体の特定

4種類の抗リン脂質抗体（aCL・aCL/ β_2 GPI・aPS・aPS/PT）を対象に、動・静脈血栓症の危険因子として有用な抗リン脂質抗体の特定を試みた。動脈血栓症及び静脈血栓症におけるROC曲線の曲線下面積（area under the curve：AUC）を算出し、抗体別に比較した。その結果、動脈血栓症におけるAUCはaCL/ β_2 GPIが0.84と最も高く、続いてaPS/PTが0.82、aCLとaPSがともに0.80となった（Figure 6A）。静脈血栓症でもAUCはaCL/ β_2 GPIが0.80と最も高く、続いてaPS/PTが0.76、aCLが0.68でaPSが0.67となった（Figure 6B）。したがって、酸性リン脂質とリン脂質結合蛋白の複合体に対する抗体であるaCL/ β_2 GPIあるいはaPS/PTが血栓症の危険因子として有用であることが示された。

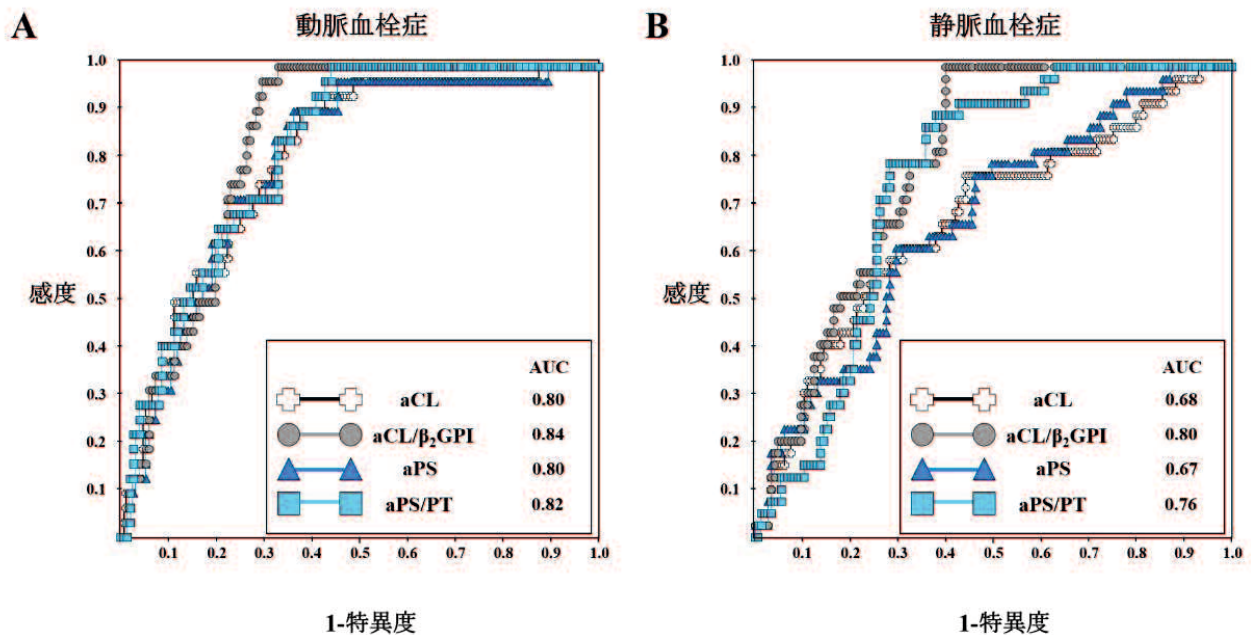


Figure 6. 血栓症の危険因子として有用な抗リン脂質抗体の特定⁶⁵⁾

A：動脈血栓症（n=32）vs. 無血栓症（n=113）

B：静脈血栓症（n=39）vs. 無血栓症（n=113）

次に、酸性リン脂質とリン脂質結合蛋白の複合体に対する抗体である aCL/ β_2 GPI 及び aPS/PT を同時に測定した場合 (aCL/ β_2 GPI+aPS/PT) と、リン脂質に直接結合する抗体である aCL 及び aPS を同時に測定した場合 (aCL+aPS) の血栓性合併症 (動・静脈血栓症) の診断精度を比較するためにそれぞれの AUC を算出した (Figure 7). その結果, aCL/ β_2 GPI+aPS/PT の AUC は 0.92 と aCL+aPS の 0.79 に比較して明らかに高く, 酸性リン脂質とリン脂質結合蛋白の複合体に対する抗体である aCL/ β_2 GPI+aPS/PT を同時に測定することの重要性が示された.

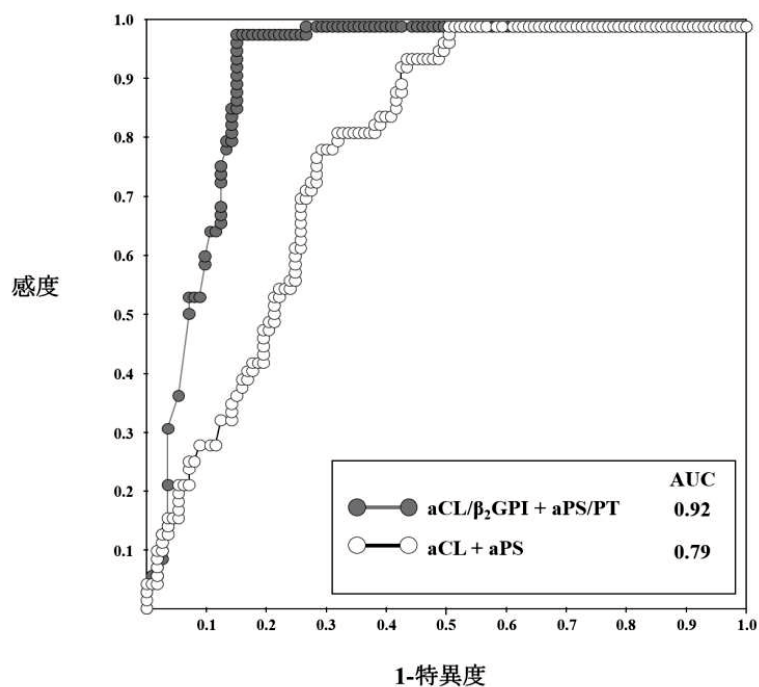


Figure 7. aCL/ β_2 GPI 及び aPS/PT を同時に測定した場合の血栓性合併症の診断精度⁶⁵⁾

血栓症 (n=71) vs. 無血栓症 (n=113)

さらに、2種類の抗リン脂質抗体 (aCL/ β_2 GPI/aPS/PT) の出現パターンにより、症例を① aCL/ β_2 GPI(+)/aPS/PT(+), ② aCL/ β_2 GPI(+)/aPS/PT(-), ③ aCL/ β_2 GPI(-)/aPS/PT(+), ④ aCL/ β_2 GPI(-)/aPS/PT(-)の4つのグループに分類した。さらに、SLE患者も動脈血栓症群・静脈血栓症群・無血栓症群の3群に分け、各群における抗体 (aCL/ β_2 GPI/aPS/PT) の出現パターンを比較した (Figure 8)。その結果、動脈血栓症群 (n = 32) では、aCL/ β_2 GPI(+)/aPS/PT(+)症例が81.3%を占めていた。それに続いてaCL/ β_2 GPI(+)/aPS/PT(-)症例が15.6%, aCL/ β_2 GPI(-)/aPS/PT(+)症例が3.1%であり、aCL/ β_2 GPI(-)/aPS/PT(-)症例は0%であった。静脈血栓症群 (n = 39) でも、aCL/ β_2 GPI(+)/aPS/PT(+)症例が71.8%を占めており、aCL/ β_2 GPI(+)/aPS/PT(-)症例が5.1%, aCL/ β_2 GPI(-)/aPS/PT(+)症例が7.7%, aCL/ β_2 GPI(-)/aPS/PT(-)症例が15.4%であり、血栓症群では、aCL/ β_2 GPI(+)/aPS/PT(+)症例が圧倒的に多いことが明らかになった。一方、無血栓症群 (n = 113) では、aCL/ β_2 GPI(+)/aPS/PT(+)症例が14.2%, aCL/ β_2 GPI(+)/aPS/PT(-)症例が0%, aCL/ β_2 GPI(-)/aPS/PT(+)症例が4.4%であり、aCL/ β_2 GPI(-)/aPS/PT(-)症例は81.4%であり、aCL/ β_2 GPI(-)/aPS/PT(-)症例が大部分を占めていた。

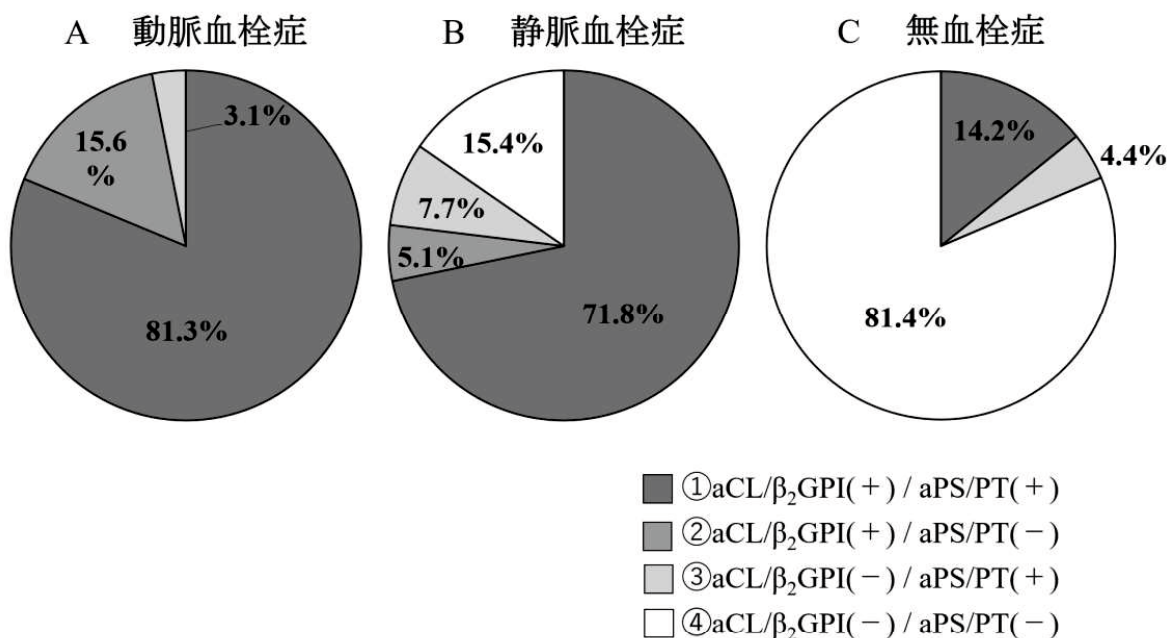


Figure 8. SLE患者の各合併症群における aCL/ β_2 GPI/aPS/PT 出現パターンの比較⁶⁵⁾

2-4 小括

SLE は、多種多様な自己抗体の出現と多臓器病変を特徴とする代表的な全身性自己免疫疾患である⁵⁶⁾。以前から SLE 患者では動・静脈血栓症が好発することが知られていたが^{62,66)}、原因は不明のままであった。近年の研究により SLE 患者における血栓性合併症と抗リン脂質抗体出現との関連性が示されたが²⁾、その詳細な病態発症機序は未だ解明されていない。我々のグループは「SLE 患者血中には多種多様な抗リン脂質抗体が混在し、各抗体の持つ種々の血栓形成作用が複雑に絡み合って APS 特有の多彩な血栓性合併症が生じる」という疾患概念を提唱している。本研究は、この疾患概念に基づき、臨床的有用性の高い抗リン脂質抗体の抗体価を複数種・同時に測定し、保有している抗体をタイピングすることにより、患者ごとの血栓性合併症発症リスクを推測できる新たな APS 検査診断法を確立する目的で実施した。

APS の検査診断において抗リン脂質抗体の検出は必須であり、病院検査部では、主に LA 活性による定性試験が実施されている。しかしながら、LA 検査は、①*in vitro* におけるリン脂質依存性凝固時間の延長を調べるスクリーニング試験、②凝固時間の延長がインヒビターによるものであることを確認するクロスミキシング試験、③インヒビターが凝固因子に対してではなくリン脂質に対して特異的であることを証明する確認試験など、多段階の測定系を経て判定する必要がある、ルーチン業務に組み込むのは至難の業である。さらに、検査に用いる血漿の処理等の標準化が進んでいないことを背景に⁶⁶⁾、ISTH ガイドライン²²⁾に沿って検査を実施している検査室は一部である。最初のスクリーニング試験において、大部分の施設が APTT の延長が認められない場合に LA 陰性と判定しているため、多数の LA 陽性患者が見逃されていることが示唆される。このような背景から、ELISA による抗リン脂質抗体の検出が重要視されるようになったが、検査室で測定されている抗リン脂質抗体は診断基準に採用されている aCL あるいは aCL/ β_2 GPI であり、LA の責任抗体として重要視されている aPS/PT^{21,64)}など他の抗リン脂質抗体はほとんど測定されていない。そのため、検出されていない他の抗リン脂質抗体によって引き起こされた血栓性合併症及び妊娠合併症が APS と診断されず、原因不明とされている例も少なからず存在する。

本研究では、APS の診断基準に採用されていない aPS/PT 及び aPS も含め、抗リン脂質抗体の組み合わせによる APS の血栓性合併症の診断精度を検討した。その結果、固相化リン脂質とエピトープ提供タンパクの複合体に対する抗体 (aCL/ β_2 GPI や aPS/PT など) が血栓症と強く関連していることが明らかになったが、固相化リン脂質に直接結合する抗体 (aCL や aPS など) は、APS の動・静脈血栓症の発症には関連が低いことが示唆された。さらに、SLE 患者を動脈血栓症群・静脈血栓症群・無血栓症群の 3 群に分け、2 種類の抗リン脂質抗

体 (aCL/ β_2 GPI/aPS/PT) の出現パターンを比較した結果、血栓症群では aCL/ β_2 GPI(+)/aPS/PT(+)症例が圧倒的に多く、無血栓症群では aCL/ β_2 GPI(-)/aPS/PT(-)症例が多いことが明らかになった。これらの結果より、単一の抗体を保有する場合に比べて、複数種の抗体を同時に保有する場合に血栓性合併症を引き起こす可能性が極めて高いことが示唆された。実際に、APS 患者が保有する抗リン脂質抗体の種類やその抗体価から血栓症発症/再発リスクを層別化する目的で抗リン脂質抗体スコア⁶⁷⁾と Global Anti-Phospholipid Syndrome Score (GAPSS)⁶⁸⁾が確立されている。原発性及び二次性 APS を対象とした大規模なコホート研究のデータを基に確立されている抗リン脂質抗体スコア⁶⁷⁾においても、IgG クラスの a β_2 GPI-ELISA と aPS/PT-ELISA が最も重要な検査項目に位置付けられている。よって、APS 患者の血栓性合併症のリスク評価には、aCL/ β_2 GPI と aPS/PT を同時に測定することが重要であると考えられる。

第3章

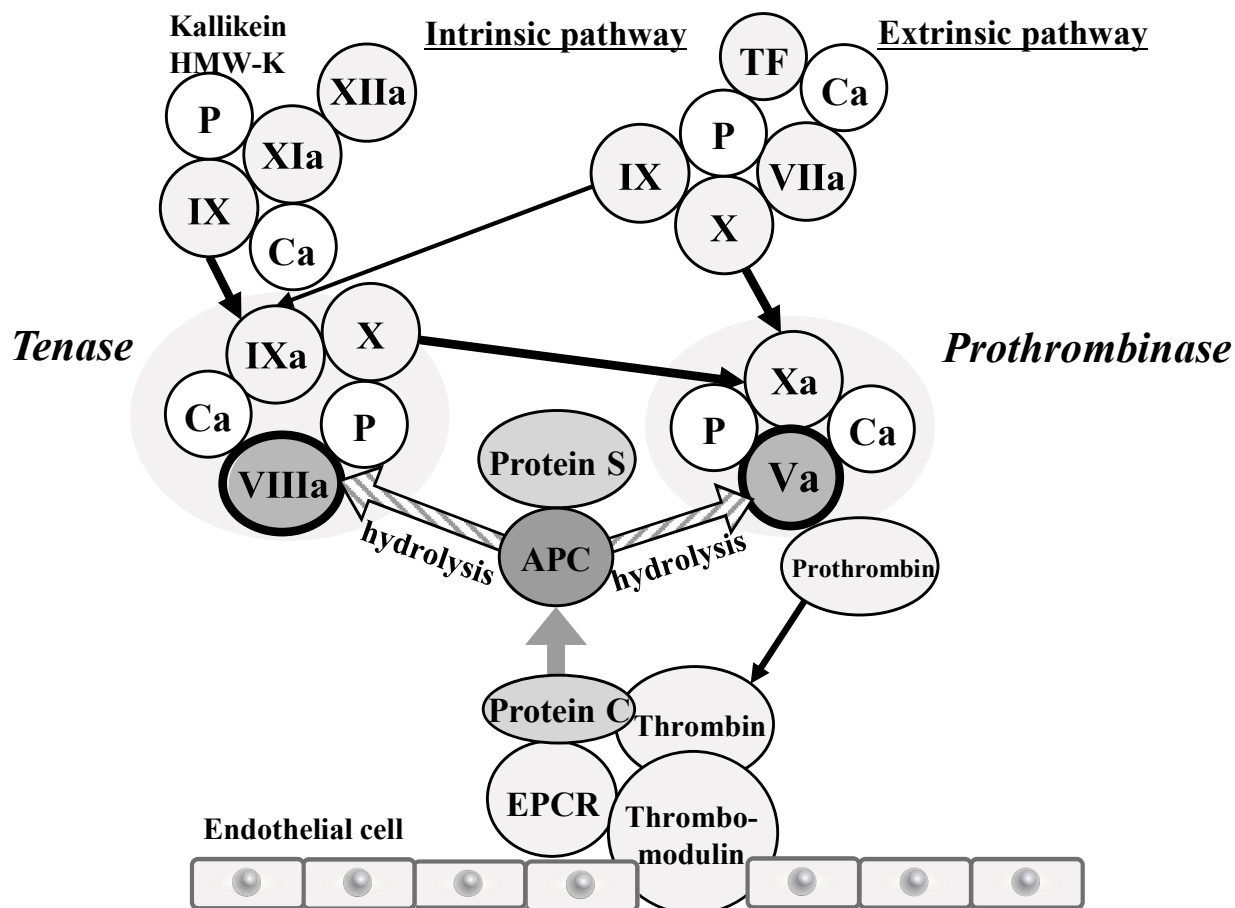
本論

抗リン脂質抗体の組み合わせによる 相乗的な血栓形成作用の發揮

3-1 研究の背景および目的

抗リン脂質抗体には認識するエピトープの違いによりいくつかのタイプが存在するが、中でも固相化リン脂質とエピトープ提供タンパクの複合体に対する抗体である aCL/ β_2 GPI と aPS/PT が APS における血栓性合併症と強く関連していることを前章で明らかにした。本章では、静脈血栓症と動脈血栓症の発症機序の違いに着目し、aCL/ β_2 GPI 及び aPS/PT の血栓形成作用を凝固系に対する作用と細胞系に対する作用に分けて検討した。

静脈血栓症の原因としては、血液凝固制御機構の破綻による凝固亢進状態が最も多い。生理的状況下において、血管内での血液流動性を維持するため凝固制御機構により凝固反応が制御されているが、制御機構に異常をきたすと病的血栓を生じやすくなる。凝固制御機構は、主に、血管損傷部位以外での過剰な凝固反応を制御するプロテアーゼインヒビターによる凝固制御系と血液流動性維持に働くプロテアーゼによる凝固制御系に大別される。活性化プロテイン C (activated protein C : APC) 系凝固制御機構は、プロテアーゼによる凝固制御系であり、ビタミン K 依存性のセリンプロテアーゼであるプロテイン C (protein C : PC) の活性化によって開始される。PC は、血管内皮細胞上の PC レセプター (endothelial protein C receptor : EPCR) に結合し、トロンボモジュリンに結合したトロンビンにより APC へと活性化される。APC は、プロテイン S (protein S : PS) と複合体を形成し、活性型凝固第 V 因子 (FVa) 及び活性型凝固第 VIII 因子 (FVIIIa) を選択的に分解・失活させることにより凝固反応を制御している⁶⁹⁾ (Figure 9)。APC 系凝固制御機構は、凝固反応だけでなく抗炎症作用と細胞保護作用も示す⁶⁹⁾ 極めて重要な機構であり、その破綻は、深部静脈血栓症やそれに伴う肺塞栓症など重篤な静脈血栓症を引き起こす原因となることが知られている⁷⁰⁾。



1993年に報告された Factor V Leiden mutation⁷¹⁾による先天性 APC レジスタンスは、凝固第 V 因子 (FV) 遺伝子の Arg⁵⁰⁶ が Gln に変異することにより FV が APC の選択的分解に抵抗性を示す APC レジスタンス状態となり、静脈血栓症を好発することが知られている (Figure 10). 先天性 APC レジスタンスは、欧米白色人種における血栓症発症原因の約 40% を占める重要な血栓性素因であるが⁷²⁾、この mutation は欧米白色人種特有であり、日本人を含むアジア・アフリカ人種では一例も確認されていない⁷³⁾。しかし、我が国でも SLE 患者を中心に後天性に APC レジスタンスを呈する症例が度々確認され、それらの症例では静脈血栓症を好発することが知られているが^{74,75)}、その病態機序は解明されていない。

本章では、後天性 APC レジスタンスの病因を解明する目的で、SLE 患者における後天性 APC レジスタンスと抗リン脂質抗体出現との関連性を臨床研究にて調査した。さらに、抗リン脂質抗体による静脈血栓形成作用を解明する目的で、代表的な抗リン脂質抗体である aCL/ β_2 GPI と aPS/PT が後天性 APC レジスタンスを引き起こすか否か、*in vitro* の実験系により検討した。

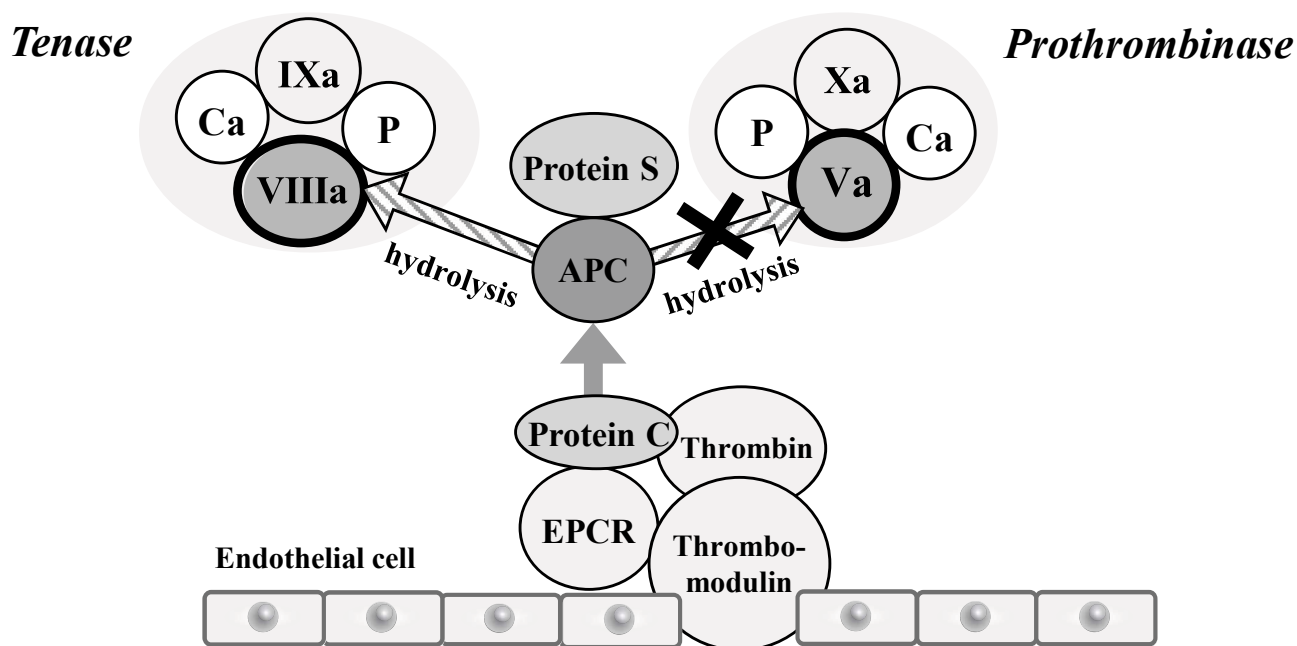


Figure 10. APC resistance

さらに、APS 患者に認められる多彩な病態の中でも、脳血管障害や虚血性心疾患などの動脈血栓症は APS 患者の死因の上位を占める重篤な合併症であり⁸⁾、その発症機序の解明は極めて重要と考える。従来、脳血管障害や虚血性心疾患の原因として動脈硬化症が知られている。動脈硬化の危険因子として脂質異常症・高血圧症・糖尿病・肥満・喫煙などが挙げられるが、罹患患者の大半が若い女性である APS 患者では、これら動脈硬化症の危険因子はあまり認められず、その病因は不明のままであった。そこで、動脈硬化症のプラーク形成に密接に関連している単球・マクロファージに着目し、IgG-抗リン脂質抗体を用いた *in vitro* の実験系により、抗リン脂質抗体が単球表面組織因子 (TF) の発現や炎症性サイトカイン産生を増強するか否かを検討した。

3-2 対象・材料と方法

本研究は、山口大学大学院医学系研究科保健学専攻医学系研究倫理審査委員会の承認（管理番号：363）を得て実施した。

I. 対象

aCL/β₂GPI及び aPS/PT の血栓症における有病率並びに識別能の検討

ACR criteria⁵⁸⁾を満たす SLE 155 症例（男性：11 例，女性 144 例，平均年齢歳 44.0 歳 [8～82 歳]）を対象とした。これら全症例は，少なくとも 10 年間定期的に follow-up されており，155 症例中 55 例で血栓性イベントが確認された。血栓性イベントの内訳は，動脈血栓症 33 例及び静脈血栓症が 22 例であった。

APC レジスタンススクリーニングテスト

抗リン脂質抗体標準化ワークショップで収集した一般健常人 38 例（平均年齢歳 39.7 歳 [23～58 歳]，男女比=3：27）と大阪大学医学部附属病院から提供された ACR criteria⁵⁸⁾を満たす SLE 97 症例（平均年齢歳 43.7 歳 [10～82 歳]，男女比=5：92）を対象に，APC レジスタンスのスクリーニング検査を実施した。サンプル血漿は，ISTH ガイドライン²²⁾が推奨する方法で処理し，測定まで-80℃で凍結保存した。

II. 材料

IgG-抗リン脂質抗体：APC sensitivity ratio の検討

ACR criteria⁵⁸⁾を満たす SLE 患者の血漿から、4 種類 (aCL/ β_2 GPI \cdot aPS/PT double positive IgG : aPLs(+/-)-IgG ; 8 例, aCL/ β_2 GPI \cdot aPS/PT double negative IgG : aPLs(-/-)-IgG ; 6 例, aCL/ β_2 GPI single positive IgG : aPLs(+/-)-IgG ; 7 例, aPS/PT single positive IgG : aPLs(-/+)-IgG ; 7 例) の IgG を純化・精製した。さらに、抗リン脂質抗体がすべて陰性だが抗核抗体など他の SLE に出現する自己抗体は含有している SLE 患者血漿から Non-APS-IgG を得た。

IgG-抗リン脂質抗体：単球活性化作用の検討

3 種類の抗リン脂質抗体 (aCL/ β_2 GPI \cdot aPS/PT double positive IgG : aPLs(+/-)-IgG ; 4 例, aCL/ β_2 GPI single positive IgG : aPLs(+/-)-IgG ; 2 例, aPS/PT single positive IgG : aPLs(-/+)-IgG ; 1 例) 及び、Non-APS-IgG ; 1 例を用いて刺激を行った。

III. 方法

(i) APC レジスタンススクリーニングテスト

APC レジスタンスのスクリーニングテストには市販キット「コアテスト APC レジスタンス試薬 (CHROMOGENIX)」を用いた。本キットは、被検血漿が APC に対してどの程度親和性を示すかを「APC 添加 APTT 時間÷APC 非添加 APTT 時間＝凝固時間比」で判定するテストで、添付文書に準じ、凝固時間比が 2.45 以下を APC に対する親和性が低い (APC に抵抗性を示す) APC レジスタンスと判定した。APC レジスタンス陽性と判定されたサンプルに関しては、藤村らの研究に委託し、患者血漿から抽出したゲノム DNA を用い、既知の方法⁷⁶⁾にて Factor V Leiden mutation の有無を確認した。

(ii) IgG-抗リン脂質抗体の精製

「MAbTrap Kit (GE ヘルスケア・ジャパン株式会社)」を用い、4 種類の IgG-抗リン脂質抗体 (aPLs(++)-IgG, aPLs(--)-IgG, aPLs(+/-)-IgG, aPLs(-/+)-IgG) と Non-APS-IgG を純化した。PBS に至適濃度溶解させ、透析膜を用いた透析により脱塩操作を行った後、-80°C で凍結保存した。

(iii) 血漿を用いた APC-sensitivity ratio 測定系プロトコールの確立

APTT 測定系をベースに、新たに APC-sensitivity ratio 測定系を確立した。専用のキュベットに接触因子活性化剤とリン脂質を含む PTT-LA 試薬 (富士レビオ社) 50 μ L と被検血漿 50 μ L を加えた。よく混和した後、至適濃度の APC (対照には PBS) を 5 μ L 添加した。37°C・3 分間インキュベーションした後、0.02M CaCl₂ を 50 μ L 添加し APTT を測定した。同一被検血漿において APC 添加系の APTT と非添加系 (対照) の APTT を同時に測定し、APC 添加系の APTT を対照の APTT で割ることにより APC-sensitivity ratio を算出した。通常、APC を加えると凝固時間が 3 倍から 4 倍程度延長するが、APC レジスタンスの場合は、APC の抗凝固活性が抑制されるため凝固時間の延長の度合いが小さくなり、APC-sensitivity ratio は低下する。

(iv) IgG-抗リン脂質抗体を用いた APC-sensitivity ratio 測定プロトコルの確立

プール血漿 40 μ L と IgG (対照には PBS) 10 μ L を混和したものをサンプルとして用いた。専用のキュベットに PTT-LA 試薬 50 μ L とサンプル 50 μ L を加えた。よく混和した後、至適濃度の APC (対照には PBS) を 5 μ L 添加した。37 $^{\circ}$ C・3 分間インキュベーションした後、0.02M CaCl₂ を 50 μ L 添加し APTT を測定し、APC-sensitivity ratio を算出した。

(v) 健康人末梢血単核細胞 (PBMC) の分離

6 人の健康人ボランティアから末梢静脈血を BD バキュテイナ[®] CPT[™] 単核球分離用採血管 (日本ベクトン・ディッキンソン株式会社) に採血し、1700 \times g, 15min 遠心分離した。遠心終了後、PBMC 層を回収し、PBS で 3 回洗浄した。洗浄終了後、RPMI 1640 (10%FBS 含有) に再浮遊させ、セルカウントを行った。細胞数を調製後、12 well プレートに 1well あたり 1 \times 10⁶ 個ずつ PBMC を播種し、37 $^{\circ}$ C・5%CO₂ 下で 1.5h 静置した。

(vi) PBMC の刺激

PBMC を分離・静置後、各種 IgG-抗リン脂質抗体で刺激し、6 時間培養した。ポジティブコントロールとして LPS (20ng/mL) を、ネガティブコントロールとして PBS を用いた。PBMC 刺激 6 時間後の培養上清を採取し、TNF- α 測定まで-80 $^{\circ}$ C にて保存した。

(vii) 単球表面 TF 発現のフローサイトメトリー解析

各種 IgG-抗リン脂質抗体で 6 時間刺激培養後の PBMC を 300 \times g 5min 遠心した後、上清をアスピレートした。これを 1%BSA に再浮遊させ、モノクローナル抗体である CD14-PE 及び CD142-FITC (ともに Milteny Biotec) を用い、単核球膜表面抗原を 2 重染色した。その後、OptiLyse C (Beckman Coulter) にて固定・洗浄し、フローサイトメーター【MACSQuant[®] Analyzer 10 (Milteny Biotec)】にて単球表面抗原を解析した。

単球のフローサイトメトリー解析では、CD14 の発現にて単球の分画を確定し、CD14 陽性細胞 (単球) 中の TF の発現率を CD142 の発現量にて定量した。

CD142-FITC のアイソタイプコントロールとして mouse IgG1-FITC (Milteny Biotec) を用い、TF の陽性・陰性のカットオフラインを設定した。

(viii) TNF- α の定量

回収した PBMC 刺激 6 時間後の培養上清中の TNF- α 産生量を「Human TNF-alpha Quantikine ELISA Kit (R&D Systems)」にて定量した。

(ix) 統計解析

解析には統計解析ソフト (StatFlex ver. 6) を用いた。

APC-sensitivity ratio のカットオフ値の設定

ROC 解析にて、感度=特異度曲線の交点 (感度=特異度) を求め、その交点である 2.40 を APC-sensitivity ratio のカットオフ値として設定した。

3-3 結果

3-3-1 SLE 患者における aCL/ β_2 GPI 及び aPS/PT の抗体別にみた血栓性イベントとの 関連

動脈血栓症 (33 症例) と静脈血栓症 (22 症例) は、区別せずに血栓症 (55 症例) とした。aCL/ β_2 GPI と aPS/PT それぞれについて、陽性群と陰性群に分け、各群における血栓症の有病率を算出した。その結果、aCL/ β_2 GPI (+) 群における血栓症の有病率は 63.9% (61 症例中 39 症例)、aCL/ β_2 GPI (-) 群では 17.0% (94 症例中 16 症例) であった。aPS/PT (+) 群における血栓症の有病率は 69.0% (42 症例中 29 例)、aPS/PT (-) 群では 23.0% (113 例中 26 例) となり (Table 6)、それぞれの抗体が陰性である群に比べて、陽性である群で血栓症の有病率が高い値を示すことが明らかになった。

さらに、aCL/ β_2 GPI 及び aPS/PT の血栓症に対するオッズ比 (OR) と 95%信頼区間 (95% CI) を算出した。その結果、aCL/ β_2 GPI の OR (95% CI) は 8.6 (4.1–18.3)、aPS/PT の OR (95% CI) は 7.5 (3.4–16.4) であった (Table 6)。

		Thrombosis n=55 % (n)	No thrombosis n=100 % (n)	OR (95% CI)
aCL/ β_2 GPI	[+] (n=61)	63.9% (39)	36.1% (22)	8.6 (4.1–18.3)
	[-] (n=94)	17.0% (16)	83.0% (78)	
aPS/PT	[+] (n=42)	69.0% (29)	31.0% (13)	7.5 (3.4–16.4)
	[-] (n=113)	23.0% (26)	77.0% (87)	

Table 6. Independent utility of aCL/ β_2 GPI and aPS/PT in distinguishing thrombotic events⁷⁷⁾

3-3-2 SLE 患者における aCL/ β_2 GPI 及び aPS/PT の組み合わせと血栓性イベントとの 関連

保有する aCL/ β_2 GPI と aPS/PT の組み合わせにより, SLE 患者を 4 グループ (A: aCL/ β_2 GPI (+) / aPS/PT (+), B: aCL/ β_2 GPI (+) / aPS/PT (-), C: aCL/ β_2 GPI (-) / aPS/PT (+), D: aCL/ β_2 GPI (-) / aPS/PT (-)) に分け, 各グループにおける血栓症の有病率を算出した。その結果, グループ A における血栓症の有病率は 75.8% (33 症例中 25 症例), グループ B で 51.9% (27 例中 14 例), グループ C で 20.0% (5 症例中 1 症例), グループ D で 16.7% (90 例中 15 例) となり (Table 7), 血栓症の有病率は aCL/ β_2 GPI 及び aPS/PT がともに陽性であるグループ A で明らかに高い値を示していた。

さらに, 各グループの血栓症に対する OR (95% CI) は, グループ A で 9.6 (4.3–21.6), グループ B で 2.3 (1.0–5.2), グループ C で 0.4 (0.1–3.9), グループ D で 0.1 (0.1–0.3) となった (Table 7)。

Groups	Thrombosis n=55 % (n)	No thrombosis n=100 % (n)	OR (95% CI)
A: aCL/ β_2 GPI (+) / aPS/PT (+) (n=33)	75.8% (25)	24.2% (8)	9.6 (4.3–21.6)
B: aCL/ β_2 GPI (+) / aPS/PT (-) (n=27)	51.9% (14)	48.1% (13)	2.3 (1.0–5.2)
C: aCL/ β_2 GPI (-) / aPS/PT (+) (n=5)	20.0% (1)	80.0% (4)	0.4 (0.1–3.9)
D: aCL/ β_2 GPI (-) / aPS/PT (-) (n=90)	16.7% (15)	83.3% (75)	0.1 (0.1–0.3)

**Table 7. Utility of aCL/ β_2 GPI, aPS/PT, and their combinations in
distinguishing thrombotic events⁷⁷⁾**

3-3-3 APC レジスタンススクリーニングテスト

一般健常人 38 例と SLE 患者 97 症例を対象に APC レジスタンススクリーニングテストを実施した (Figure 11)。その結果、健常人 38 例ではすべて APC レジスタンス (-) であったが、SLE 患者では 97 例中 26 例 (27%) で APC レジスタンス (+) と判定した。APC レジスタンス (+) と判定された症例は、全て遺伝子検査にて Factor V Leiden mutation (-) であることを確認し、後天性の APC レジスタンスと診断した。さらに、SLE 患者を抗リン脂質抗体陰性 (aPLs (-)) 67 例と陽性 (aPLs (+)) 30 例に分類した結果、aPLs (-) 症例では 67 例中 4 例 (6%) が弱陽性だったのに対し、aPLs (+) 症例では 30 例中 22 例 (73%) が APC レジスタンス (+) であり、抗リン脂質抗体出現との関連性が強く示唆された。

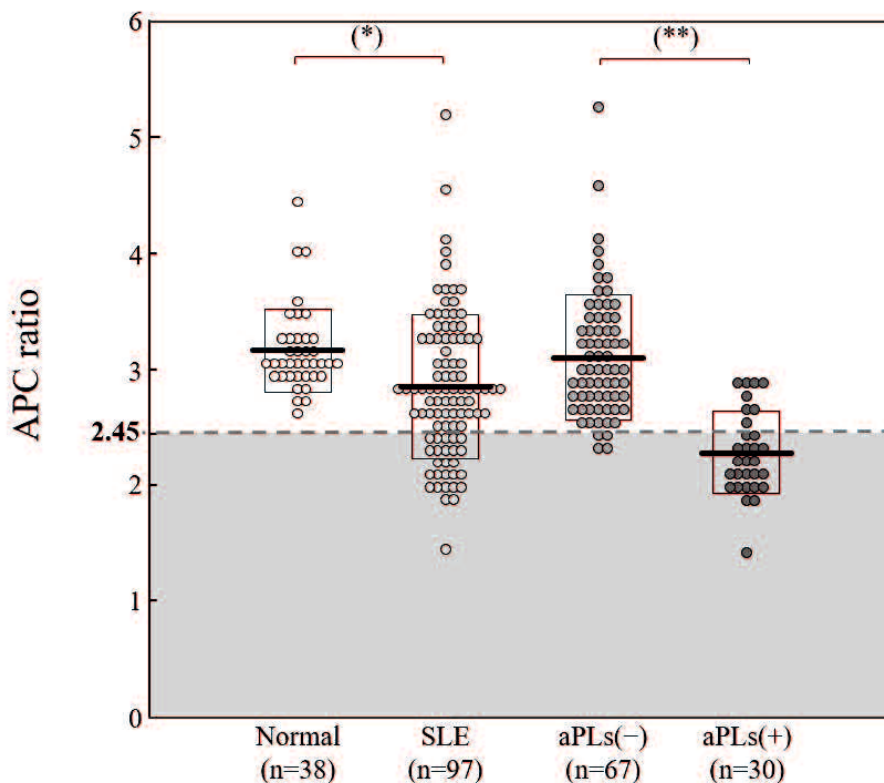


Figure 11. Comparison of APC ratios between healthy subjects and SLE patients⁷⁷⁾

t test : * Normal vs. SLE, $P < 0.001$; ** aPLs(-) vs. aPLs(+), $P < 0.001$

3-3-4 IgG-抗リン脂質抗体による APC の抗凝固活性に対する抑制作用

代表的な SLE 患者血漿から作成した 4 種類の IgG-抗リン脂質抗体 (aCL/β₂GPI・aPS/PT double positive IgG : aPLs(++)-IgG, aCL/β₂GPI・aPS/PT double negative IgG : aPLs(--)-IgG, aCL/β₂GPI single positive IgG : aPLs(+/-)-IgG, aPS/PT single positive IgG : aPLs(-/+)-IgG) を用い, APC の抗凝固活性に対する抑制作用を検討した (Figure 12). その結果, aPLs(--)-IgG 添加時に比較して, aPLs(++)-IgG・aPLs(+/-)-IgG・aPLs(-/+)-IgG の添加時で有意な APC-sensitivity ratio の低下, つまり, APC の抗凝固活性に対する抑制作用を確認した. 抑制作用の度合いは, aCL/β₂GPI と aPS/PT が double positive である場合 (aPLs(++)-IgG) に顕著であったが, 統計的な有意差は認められなかった.

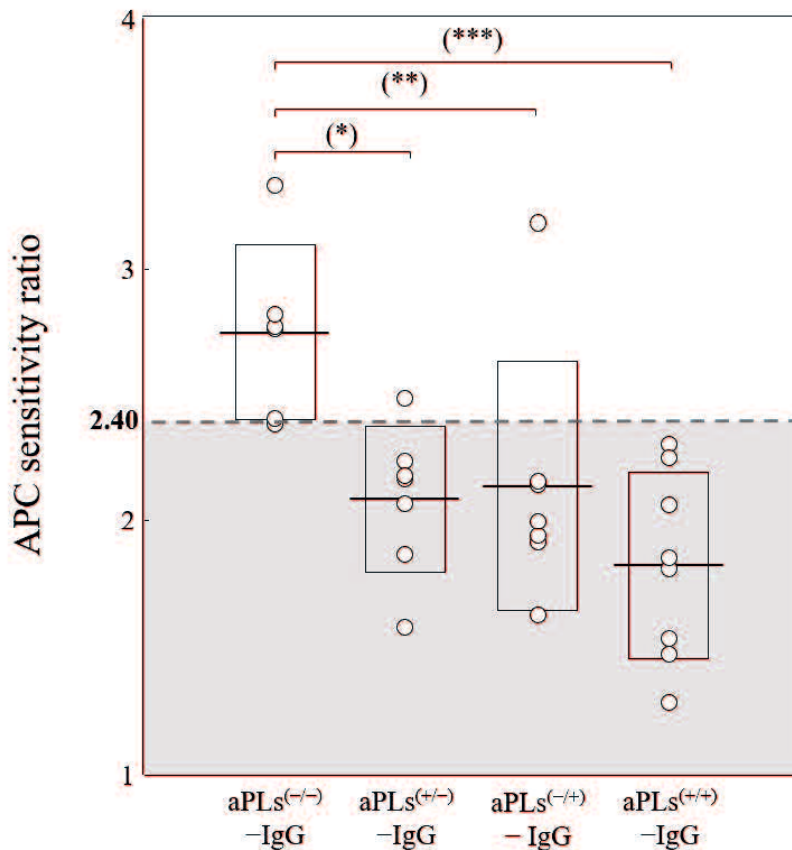


Figure 12. Effect of four categories of aPLs-IgG on the anticoagulant activity of APC⁷⁷⁾
t test : * aPLs(--)-IgG vs. aPLs(-/+)-IgG, P<0.005 ; ** aPLs(--)-IgG vs. aPLs(+/-)-IgG, P<0.05 ; *** aPLs(--)-IgG vs. aPLs(++)-IgG, P<0.001

3-3-5 IgG-抗リン脂質抗体による単球表面 TF 発現

6 人の健康人ボランティアから分離した PBMC を抗リン脂質抗体 (aPLs(++)-IgG・aPLs(+/-)-IgG・aPLs(-/+)-IgG) 及び Non-APS-IgG にて刺激し、6 時間後の単球表面 TF の発現量をフローサイトメトリーにて解析した。TF の発現量は、コントロールを 1 とし、その比率を算出した。解析の結果、コントロールに比較して IgG-抗リン脂質抗体刺激で単球表面 TF の発現が有意に増加することを確認し、TF 発現の増加が aPLs(++)-IgG で顕著であった。対称的に Non-APS-IgG では有意な TF の発現増加は認められなかった (Figure 13)。

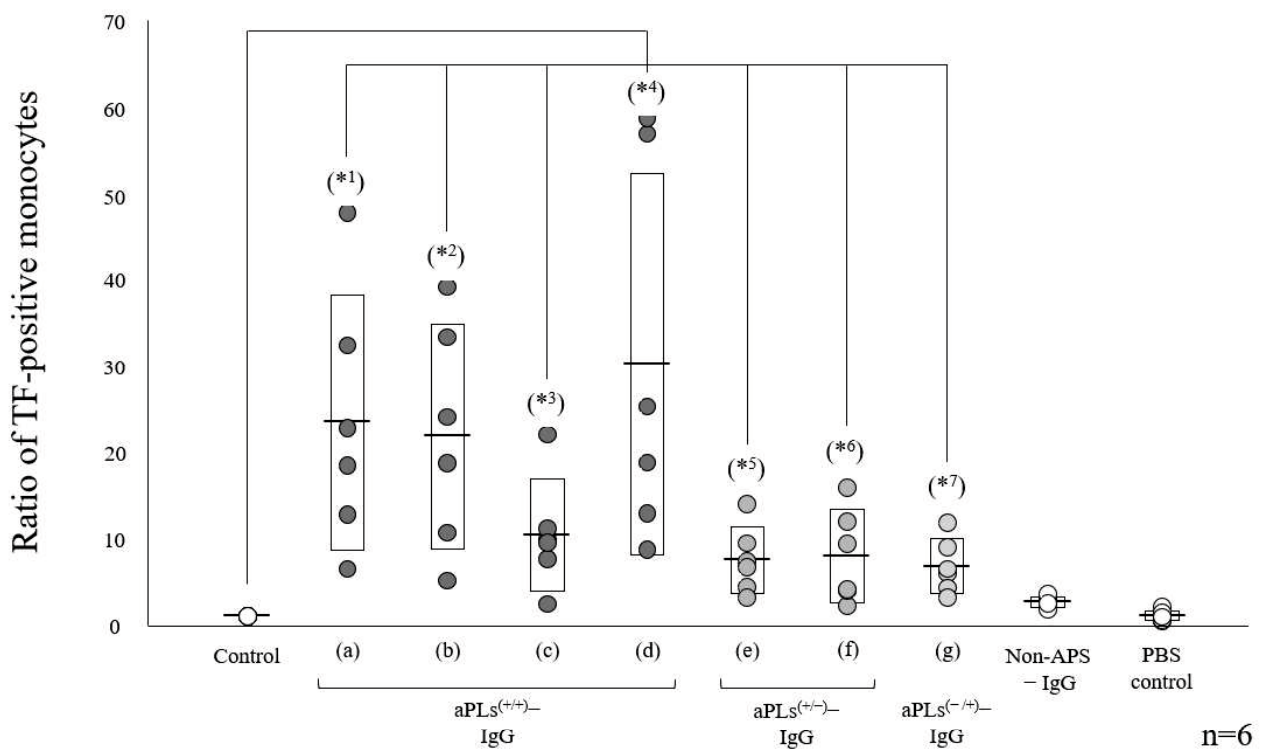


Figure 13. Comparison of TF expression on monocytes from healthy donors after stimulation by various IgG fractions and control specimens ⁷⁷⁾

t test : *¹⁻⁴ control vs. aPLs(++)-IgG, $P < 0.005$; *⁵ control vs. aPLs(+/-)-IgG, $P < 0.005$; *⁶ control vs. aPLs(+/-)-IgG, $P < 0.05$; *⁷ control vs. aPLs(-/+)-IgG, $P < 0.05$

3-3-6 IgG-抗リン脂質抗体による単核球からの TNF- α 産生増加

6 人の健康人ボランティアから分離した PBMC を抗リン脂質抗体 (aPLs(+/+) - IgG · aPLs(+/-) - IgG · aPLs(-/+) - IgG) 及び Non-APS-IgG にて 6 時間刺激後に、採取した培養上清中の TNF- α 産生量を ELISA キットにて定量した。その結果、コントロールに比較して aPLs(+/+) - IgG 刺激で TNF- α の有意な産生増加が認められたが、aPLs(+/-) - IgG 及び aPLs(-/+) - IgG, Non-APS-IgG 刺激による有意な TNF- α 産生の増加はみられなかった (Figure 14)。

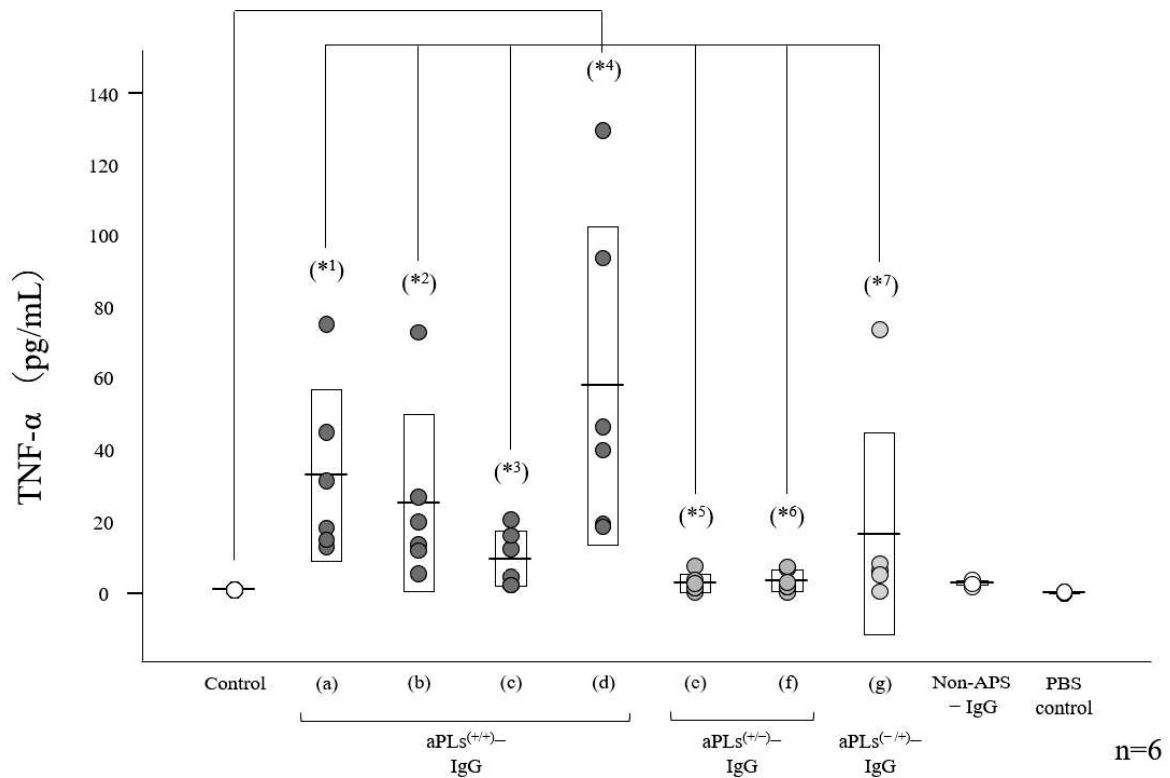


Figure 14. Comparison of TNF- α released in cell culture medium of healthy peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) after stimulation by various IgG fractions or control specimens ⁷⁷⁾

t test : *¹⁻⁴ control vs. aPLs(+/+) - IgG, $P < 0.05$; *⁵⁻⁶ control vs. aPLs(+/-) - IgG, $P < 0.1$; *⁷ control vs. aPLs(-/+) - IgG, $P < 0.5$

3-4 小括

本章では、第2章にてAPSにおける血栓性合併症と強く関連していることが明らかになった aCL/ β_2 GPI と aPS/PT の血栓形成作用を静脈血栓症と動脈血栓症の発症機序の違いに着目し検討した。

まず、aCL/ β_2 GPI と aPS/PT がそれぞれ単独でSLE患者における血栓性イベントの識別能を有すること、及びaCL/ β_2 GPI と aPS/PT が double positive である場合に血栓症の有病率が高いことを明らかにした。

次に、抗リン脂質抗体による静脈血栓形成作用の解明を目的として、APC系凝固制御機構をaCL/ β_2 GPI 及び aPS/PT が抑制することにより後天性のAPCレジスタンスを引き起こすか否かを検討した。SLE患者では、原因不明のAPCレジスタンス反応が認められ、それらの症例では静脈血栓症を好発することが知られているが^{72,76)}、SLE患者におけるAPCレジスタンスの発症頻度や詳細な機序は不明のままであった。本研究では、健常人及びSLE患者を対象とした臨床研究により、SLE患者の27% (26/97例) でFactor V Leiden mutation (-) の後天性APCレジスタンスを確認した。さらに、SLE患者をaPLs (-) 症例とaPLs (+) 症例に分類した結果、aPLs (+) 症例では、実に73%でAPCレジスタンス (+) であり、後天性APCレジスタンスと抗リン脂質抗体が強く関連していることを明らかにした。そこで、IgG-抗リン脂質抗体がAPCの抗凝固活性を抑制するか否か、4種類のIgG-抗リン脂質抗体 (aPLs(+/+) - IgG, aPLs(+/-) - IgG, aPLs(-/+) - IgG, aPLs(-/-) - IgG) を用いた *in vitro* の実験系により検討した。その結果、aCL/ β_2 GPI 及び aPS/PT がそれぞれ単独でAPCの抗凝固活性を抑制することを見出し、その抑制の度合いは、両抗体が double positive である場合に顕著であることを見出した。抗リン脂質抗体によるAPC系凝固制御機構の抑制作用の発見は、これまで病因が不明のままであったSLE患者における静脈血栓症の発症機序解明及び新規治療法の開発にも繋がることが期待される。

さらに、aCL/ β_2 GPI 及び aPS/PT による動脈血栓形成作用を解明する目的で、動脈硬化症のプラーク形成に密接に関連している単球・マクロファージに着目し、抗リン脂質抗体が単球のTF発現や炎症性サイトカイン産生を促進させるか否かを検討した。

APS患者では、脂質異常症・高血圧症・糖尿病・肥満・喫煙など動脈硬化症の伝統的な危険因子の有無に関わらず、動脈硬化病変が急速に進展する。我々は、抗リン脂質抗体が単球のTF発現や炎症性サイトカイン (TNF- α , IL-1 β , IL-6) の産生を促進させ、脳梗塞や心筋梗塞などの動脈硬化性疾患を引き起こす可能性を報告してきた⁷⁸⁾。本研究では、aPLs(+/+) - IgG, aPLs(+/-) - IgG, aPLs(-/+) - IgG, Non-APS-IgG を用いた *in vitro* の実験系により、aCL/ β_2 GPI あるいは aPS/PT が単独で存在する場合よりも、両抗体が共存する場合に単球表

面 TF の発現や TNF- α 産生が強力に増強されることを見出した。これらの作用は、APS 患者の中でも aCL/ β_2 GPI と aPS/PT が共に陽性の症例で動脈血栓症の発症率が明らかに高いことを報告したこれまでの臨床研究結果⁶⁴⁾を裏付けるエビデンスである。

aCL/ β_2 GPI と aPS/PT が double positive である場合に SLE 患者における血栓性イベント有病率及び血栓性イベントの識別能が高かったことから、両抗体が共存する場合に血栓症発症のリスクが高まることが示唆されたとともに両抗体によって種々の凝固・炎症反応が増幅されるといった我々のこれまでの研究成果を裏付ける結果が得られた。

aCL/ β_2 GPI 及び aPS/PT による単球表面 TF の発現増強並びに単核球からの TNF- α 産生増加の促進作用は、動脈・静脈問わず血栓形成の中心的な役割を担っていると考えられる。そこで、我々は、これまでの研究結果をまとめ、cell-based model⁷⁹⁾を基に APS の新たな血栓形成機序の概念である「CMCI (cell-mediated coagulation induction)」を打ち立てた。

3-5 新たな疾患概念 (CMCI : cell-mediated coagulation induction) の提唱

CMCI (cell-mediated coagulation induction) の概念を示すとともに (Figure 15), 抗リン脂質抗体によって引き起こされる血栓形成作用のメカニズムを概説する。

- (#1) 凝固カスケードは IgG-抗リン脂質抗体 (aCL/ β_2 GPI · aPS/PT) 刺激による単球表面の TF 発現と TNF- α 産生をトリガーとして開始される。
- (#2) 細胞表面に発現した TF と FVIIa の複合体が FX を活性化する。
- (#3) FXa により初期トロンビン産生が促進される。
- (#4) 産生された初期トロンビンが血小板や FV · FVIII · FXI を活性化する。【増幅期】
- (#5) 活性化血小板膜表面のリン脂質上で Tenase 及び Prothrombinase 複合体の形成が誘導される。
- (#6) Prothrombinase 複合体の形成が瞬時に繰り返し起こることで、トロンビンバーストに至り【増大期】、血栓形成に繋がる。
- (#7) APC は FVa と FVIIIa を選択的に分解・失活させることにより Tenase 及び Prothrombinase 複合体の形成を制御し、凝固反応を抑制するが、
- (#8) 抗リン脂質抗体が APC の抗凝固活性作用を抑制することによって生体内は凝固に傾く。
- (#9) 抗リン脂質抗体は直接的にも血小板を活性化させることも報告されている⁸⁰⁾。

これら抗リン脂質抗体の種々の作用 (#1-6) によりトロンビンバーストが生じることに加え、凝固制御機構の抑制 (#7-8) や血小板の直接的な活性化 (#9) によって血栓症を引き起こすと考える。この概念は、抗リン脂質抗体を保有する比較的若い患者群における血栓性イベント発症を説明し得るかもしれない。

この概念は、これまで点で存在していた研究成果を線でつなぐことができ、一連のメカニズムとして纏めることができたため、大変意義深い説であると考えている。

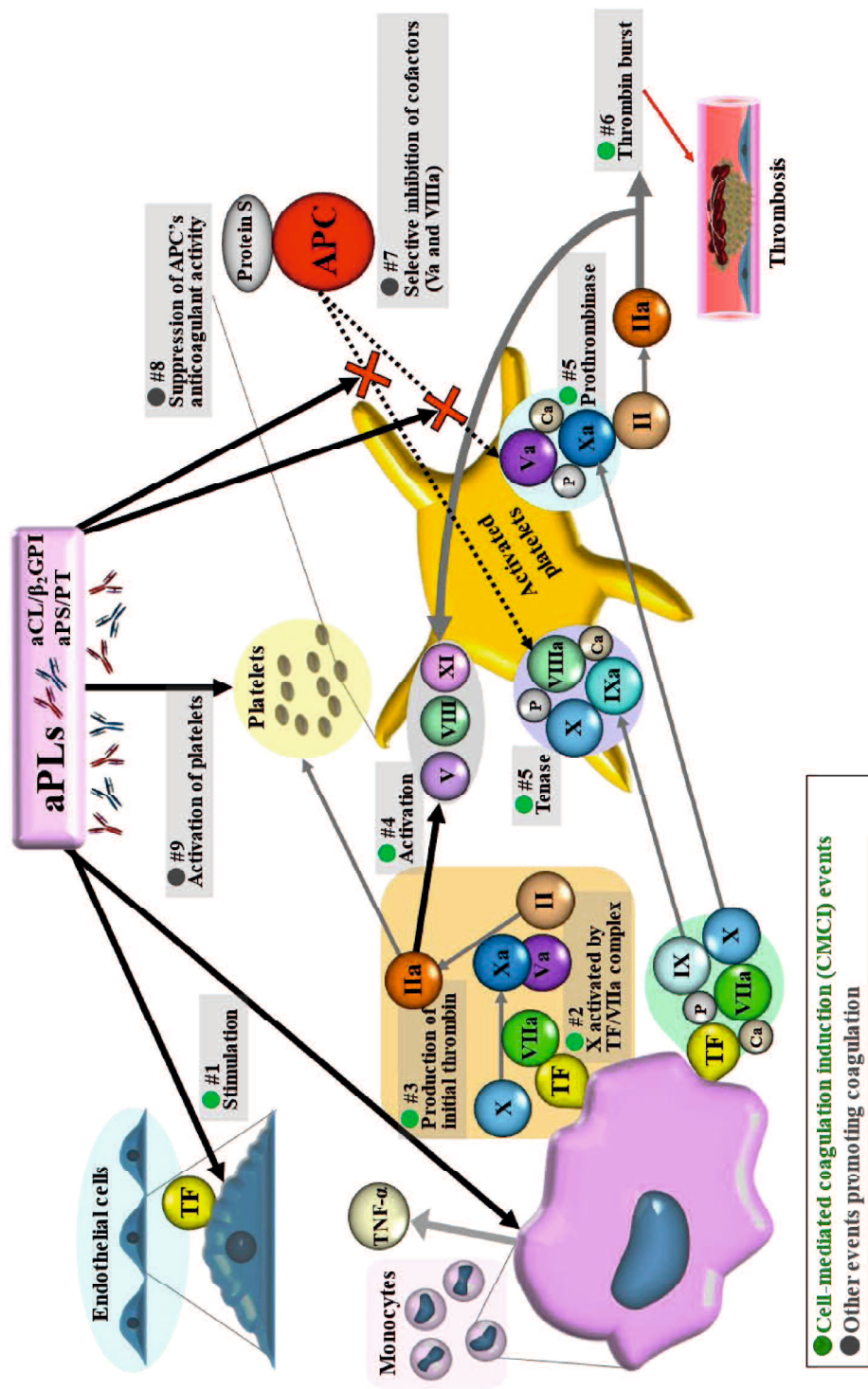


Figure 15. Roles of aPLs in cell-mediated coagulation induction (CMCI) and suppression of APC.⁷⁷⁾

第4章

本論

自動分析装置を用いた 抗リン脂質抗体価測定の有用性検討

4-1 研究の背景および目的

抗リン脂質抗体症候群 (APS) の診断には、2006年に改訂された診断 (分類) 基準 (Sydney revised Sapporo criteria)¹⁷⁾が有用であり (Table 1), 「臨床所見」と「検査所見」の双方を満たす必要がある。APSの検査診断では、抗リン脂質抗体の検出が必須であり、定性的に検出されるループスアンチコアグラント (LA) 活性と定量的に検出される抗カルジオリピン抗体 (aCL) 及び抗 β_2 -グリコプロテイン I 抗体 (a β_2 GPI) の IgG/IgM クラスが採用されている。

LA 活性は、①リン脂質依存性の凝固時間延長であることを調べるスクリーニング試験、②凝固時間の延長がインヒビターによるものであることを確認するクロスミキシング試験、③インヒビターがリン脂質に対して特異的であることを証明する確認試験と多段階の測定系を経て判定されるため、臨床検査としては複雑かつ煩雑な検査の一つである。一方、aCL 及び a β_2 GPI は、標準化された ELISA にて検出されるが、市販の ELISA キットを用いた測定では、1度に1種類の抗リン脂質抗体しか測定できないことに加えて測定者の熟練度によって測定値がばらつくなど多くの問題が存在する。このような背景から、APS は検査診断の段階で見逃されている症例も多く、抗リン脂質抗体検査の標準化が急務の課題であると考えられる。

本研究では、複数種の抗リン脂質抗体を同時にでき、かつ測定値のばらつきが少ない自動分析装置を用いた抗リン脂質抗体価測定の有用性について検討した。

4-2 対象と方法

本研究は、山口大学大学院医学系研究科保健学専攻医学系研究倫理審査委員会の承認（管理番号：296 及び 363）を得て実施した。

I. 対象

抗リン脂質抗体標準化ワークショップ（APS-WS）で収集した原発性 APS（Primary anti-phospholipid syndrome; PAPS）患者血漿 20 例【平均年齢 46.0 歳 [14—70 歳], 男女比=2:18】、SLE 合併 APS（SLE/APS）患者血漿 30 例【44.3 歳 [15—67 歳], 6:24】、SLE（非 APS）患者血漿 10 例【33.7 歳 [16—56 歳], 全例女性】、膠原病（APS,SLE を除く）患者血漿 40 例【59.3 歳 [18—86 歳], 17:23】、健常人血漿 30 例【35.8 歳 [21—52 歳], 全例女性】の計 130 例を対象に各種抗リン脂質抗体価測定を実施した。

APS 患者血漿 50 例（PAPS 患者血漿および SLE/APS 患者血漿）は、北海道大学大学院医学院医学研究院・免疫・代謝内科学で APS 診断（分類）基準（Sydney revised Sapporo criteria）¹⁷⁾に基づいて APS の診断が確定した症例の血漿を用いた。SLE 患者血漿及び膠原病患者血漿は、同施設で診療観察中の症例であり、現時点では APS 関連合併症（血栓症や妊娠合併症）が認められていない症例の血漿を用いた。

III. 方法

(i) 市販 ELISA キットを用いた抗リン脂質抗体価の測定

各種抗リン脂質抗体価を以下の市販 ELISA キット (Table 8) を用いて測定した。

QUANTA Lite® シリーズ (IL JAPAN)

aCL IgG

QUANTA Lite® ACA IgG III

aCL IgM

QUANTA Lite® ACA IgM III

aβ₂GPI IgG

QUANTA Lite® β₂GPI IgG ELISA

aβ₂GPI IgM

QUANTA Lite® β₂GPI IgM ELISA

MESACUP シリーズ (MBL)

aCL IgG

MESACUP cardiolipin IgG

aCL IgM

MESACUP cardiolipin IgM

Table 8. 抗リン脂質抗体価測定に用いた市販 ELISA キット

(ii) 自動分析装置による抗リン脂質抗体価の測定

クアンタフラッシュ APS 試薬 (IL JAPAN) を搭載した自動分析装置 ACL AcuStar® (IL JAPAN) にて、APS 診断基準に採用されている 4 種類の抗リン脂質抗体 (aCL IgG, aCL IgM, aβ₂GPI IgG, aβ₂GPI IgM) の抗体価定量を実施した。AcuStar は、化学発光免疫測定法の原理に基づき、抗原 (カルジオリピン・β₂GPI) をコーティングした磁性粒子にサンプルを反応させた後、イソルミノール標識モノクローナル抗体を結合させ、その発光量を定量する。AcuStar による抗リン脂質抗体価測定 (aCL IgG, aCL IgM, aβ₂GPI IgG, aβ₂GPI IgM) は、精度及び再現性に優れていることが報告されている^{81, 82)}。

(iii) AcuStar および ELISA キットで測定した各種抗リン脂質抗体価の相関関係の解析

対象 130 症例の各種抗体価を AcuStar 及び ELISA キットを用いて測定し、スピアマン順位相関係数 (rs) を求めた。解析には統計解析ソフト (StatFlex ver. 7) を用いた。

4-3 結果

4-3-1 各種抗リン脂質抗体価の相関関係

AcuStar 及び ELISA キットで測定した 4 種類の抗リン脂質抗体価 (aCL IgG, aCL IgM, aβ₂GPI IgG, aβ₂GPI IgM) の相関を調べた。

AcuStar と ELISA キット【QUANTA Lite[®]シリーズ】における同一の抗リン脂質抗体／クラス間でのスピアマン順位相関係数(rs)は、aCL IgG=0.690, aCL IgM=0.668, aβ₂GPI IgG=0.771, aβ₂GPI IgM=0.620 と概ね良好な相関が認められた (Figure 16)。

一方、AcuStar と ELISA キット【MESACUP シリーズ】における相関係数 (rs) は、aCL IgG=0.673, aCL IgM=0.596 と QUANTA Lite[®]シリーズには劣るものの、概ね相関が認められた (Figure 16)。

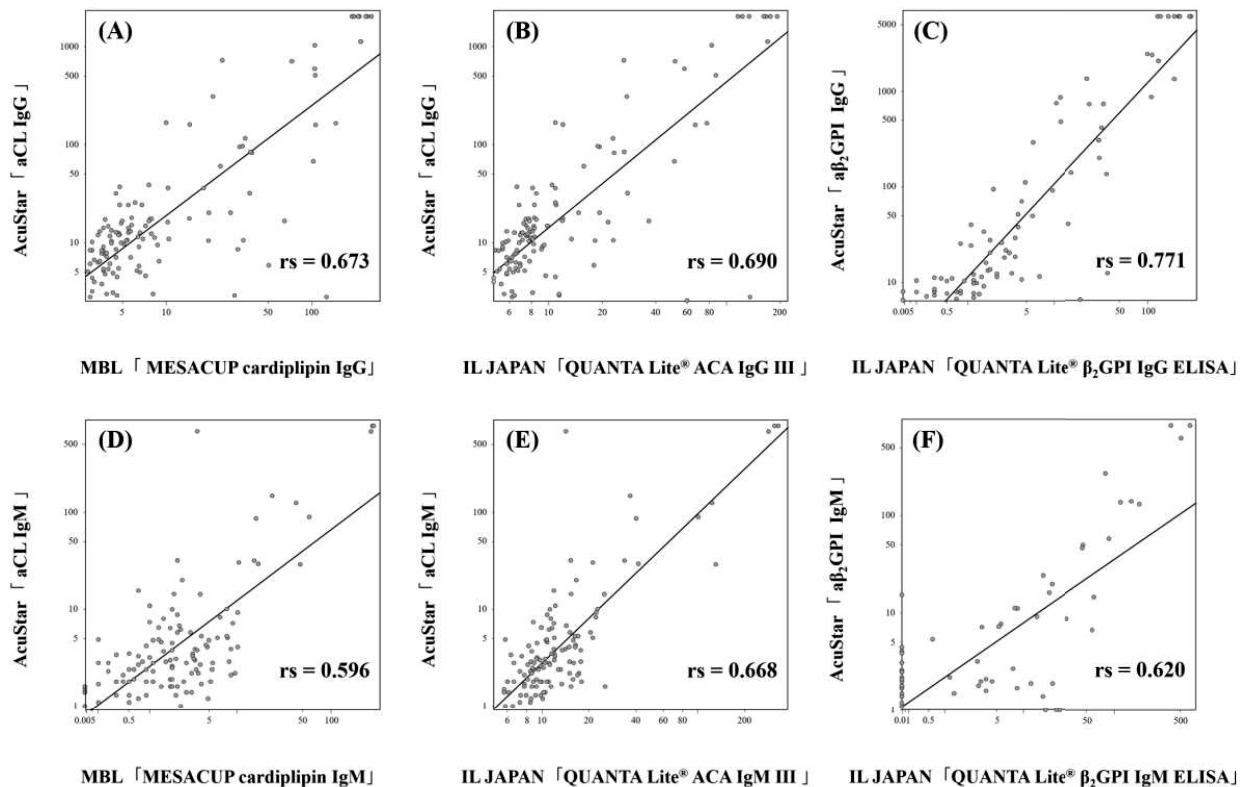


Figure 16. 各種抗リン脂質抗体価の相関関係⁸³⁾

AcuStar vs. MESACUP シリーズ : (A)aCL IgG (D)aCL IgM

AcuStar vs. QUANTA Lite[®]シリーズ : (B)aCL IgG (C)aβ₂GPI IgG (E)aCL IgM (F) aβ₂GPI IgM

4-3-2 AcuStar と ELISA キットにおける陽性・陰性一致率の比較

AcuStar 及び ELISA キットにて測定した 4 種類の抗リン脂質抗体価 (aCL IgG, aCL IgM, a β_2 GPI IgG, a β_2 GPI IgM) の陽性・陰性一致率 (判定一致率) について比較検討を行った。

AcuStar・ELISA キット【QUANTA Lite[®]シリーズ】間における判定一致率は 86.2~92.3%, AcuStar・ELISA キット【MESACUP シリーズ】間の一致率は 86.9, 96.9%と概ね一致した結果が得られた (Table 9)。

AcuStar 「aCL IgG」 vs. MBL 「MESACUP cardiolipin IgG」		AcuStar 「aCL IgG」 vs. IL JAPAN 「QUANTA Lite [®] ACA IgG III」	
判定一致率	86.9%	判定一致率	86.2%
陰性一致	85例	陰性一致	80例
陽性一致	28例	陽性一致	32例
不一致	17例	不一致	18例
判定一致	113例	判定一致	112例
AcuStar 「aCL IgM」 vs. MBL 「MESACUP cardiolipin IgM」		AcuStar 「aCL IgM」 vs. IL JAPAN 「QUANTA Lite [®] ACA IgM III」	
判定一致率	96.9%	判定一致率	92.3%
陰性一致	116例	陰性一致	109例
陽性一致	10例	陽性一致	11例
不一致	4例	不一致	10例
判定一致	126例	判定一致	120例
AcuStar 「aβ_2GPI IgG」 vs. IL JAPAN 「QUANTA Lite [®] β_2 GPI IgG ELISA」		AcuStar 「aβ_2GPI IgM」 vs. IL JAPAN 「QUANTA Lite [®] β_2 GPI IgM ELISA」	
判定一致率	88.5%	判定一致率	90.0%
陰性一致	79例	陰性一致	101例
陽性一致	36例	陽性一致	16例
不一致	15例	不一致	13例
判定一致	115例	判定一致	117例

Table 9. AcuStar・ELISA キット間の陽性・陰性一致率⁸³⁾

しかしながら、測定抗体価が大きく乖離し、陽性・陰性が不一致となる検体も少数ながら認められた。

Figure 16 から判定不一致例のみを抽出した相関図を示す (Figure 17)。カットオフ値付近の抗体価を示した症例もある一方で、測定抗体価が大きく乖離している症例もみられた。

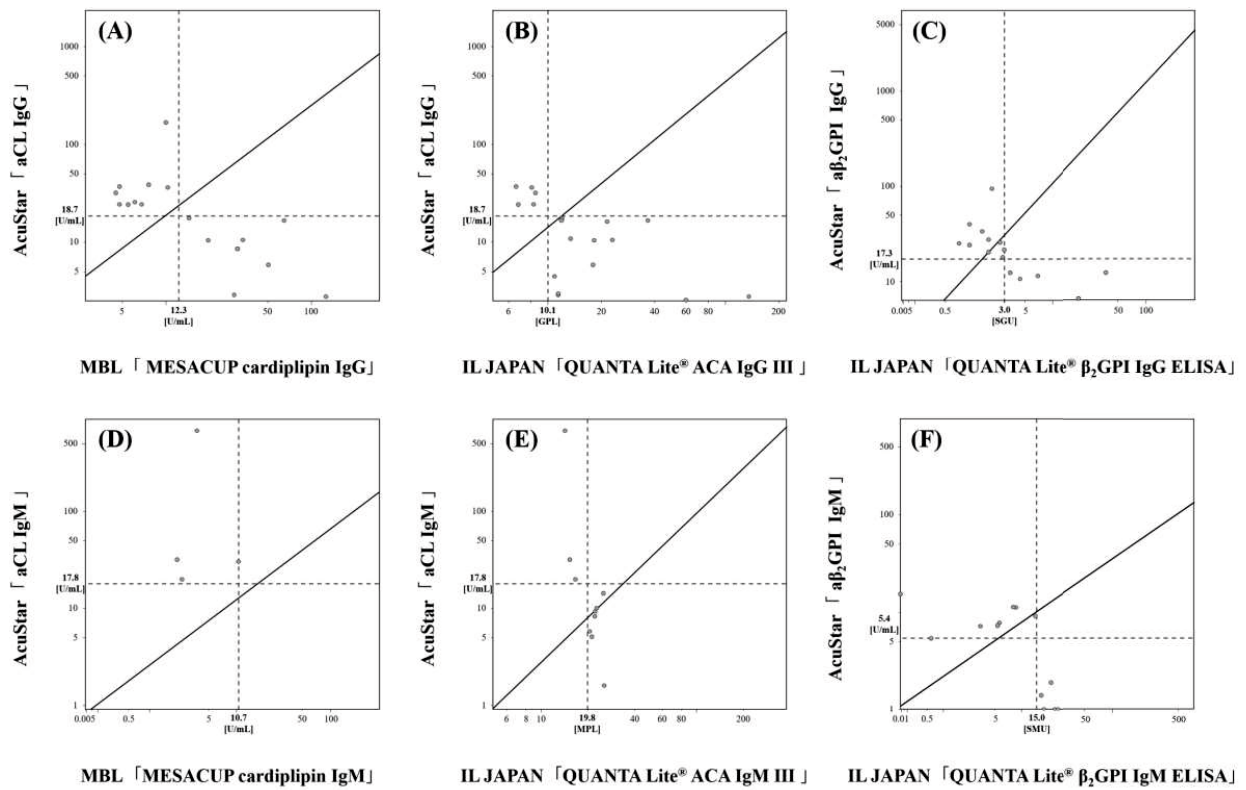


Figure 17. 各種抗リン脂質抗体の判定不一致例⁸³⁾

AcuStar vs. MESACUP シリーズ： (A)aCL IgG (D)aCL IgM

AcuStar vs. QUANTA Lite® シリーズ： (B)aCL IgG (C)aβ₂GPI IgG (E)aCL IgM (F) aβ₂GPI IgM

4-3-3 AcuStar と ELISA キットにおける各種抗リン脂質抗体検出率の比較

対象 130 症例中の APS 50 症例（PAPS 患者 20 例+SLE/APS 患者 30 例）を対象に各種抗リン脂質抗体の検出率を算出し、比較した。

AcuStar 及び ELISA キットの各種抗リン脂質抗体検出率は、同一の抗体・クラスにおいては大きな差異はなく、 $a\beta_2$ GPI の IgG/IgM クラスの検出においては AcuStar の方が優れていた (Figure 18)。

さらに、AcuStar 及び ELISA キット【QUANTA Lite®シリーズ】にて 4 種類の抗体 (aCL IgG/IgM・ $a\beta_2$ GPI IgG/IgM) を、ELISA キット【MESACUP シリーズ】にて 2 種類の抗体 (aCL IgG/IgM) を同時に測定した場合の検出率を算出した。その結果、AcuStar にて 4 種類の抗体を同時に測定した場合の検出率は、市販 ELISA キットを用いた際の検出率を上回っていた (Figure 18)。

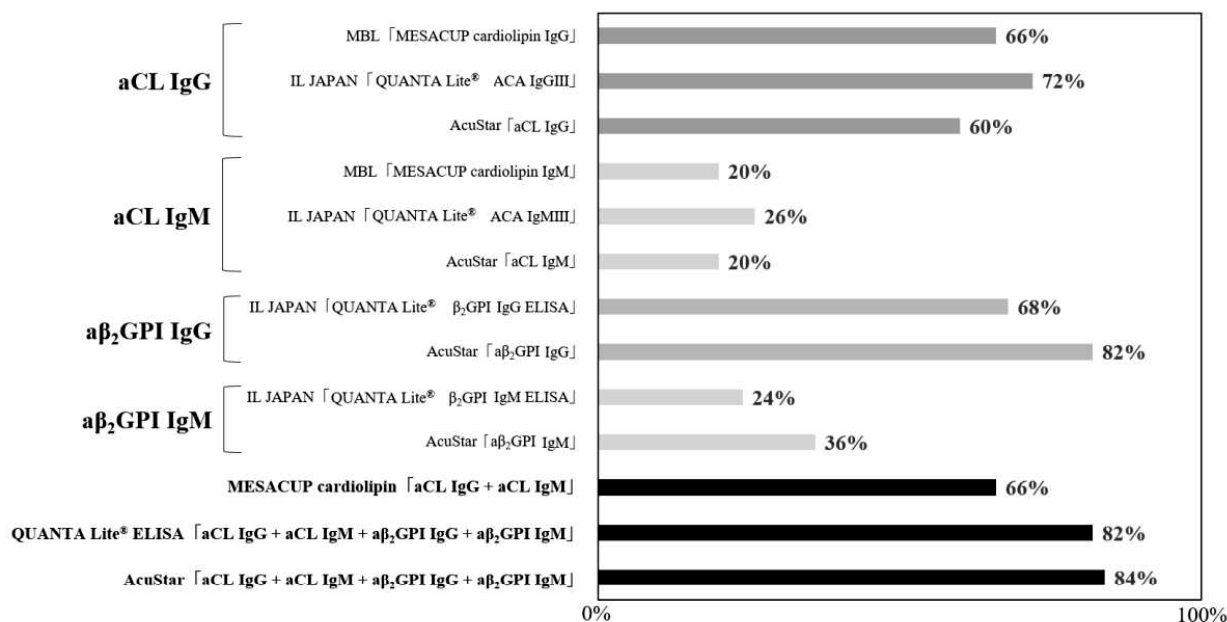


Figure 18. APS 50 症例における各種抗リン脂質抗体の検出率⁸³⁾

4-4 小括

APS の検査診断には抗リン脂質抗体の検出が必須であり、臨床検査の役割は大きい。抗リン脂質抗体価測定に汎用されている現在の市販 ELISA キットは、一度に複数種の抗体を測定できないことに加え、結果が測定者の熟練度に左右されやすい。そこで、一般的に測定者間での測定値のばらつきが少ない自動分析装置 AcuStar を用いた抗リン脂質抗体価測定の有用性について検討した。

AcuStar 及び ELISA キットで測定した抗リン脂質抗体価は、概ね良好な相関を示したが、一部で陽性・陰性判定が一致しない症例がみられた。陽性・陰性不一致例の多くはカットオフ値付近の抗体価を示した症例であり、他の自己抗体と同様に健常人と患者を一つのラインで区切る難しさが顕在化した。今後、臨床的カットオフ値についてのさらなる検討が必要であると考え。また、測定抗体価が大きく乖離している症例も僅かながら見受けられたが、AcuStar と ELISA キットの測定原理の違いが原因と推測される。ELISA キットを用いた aCL の測定では、カルジオリピンが感作されたマイクロカップに反应用緩衝液で希釈したサンプルを添加する。緩衝液中にはウシ血清由来の β_2 GPI が含まれており、この β_2 GPI をコファクターとして aCL を定量する。一方、AcuStar はカルジオリピンと β_2 GPI がコーティングされている磁性粒子にサンプルを反応させた後、イソミノール標識モノクローナル抗体を結合させ、その発光量を定量する。したがって、AcuStar と ELISA キット間で抗原性が異なるために測定抗体価に差異が生じたと推測される。

APS 症例における AcuStar の抗リン脂質抗体検出率は、臨床で汎用されている ELISA キットに劣らないことが示され、 $a\beta_2$ GPI の IgG/IgM クラスの検出においては AcuStar の方が優れていた。特に、血栓性合併症の発症リスクが高い $a\beta_2$ GPI の検出率は、QUANTA Lite[®] シリーズの 68% (34 例) に比較して、AcuStar では 82% (41 例) と明らかに高かった。しかしながら、APS のスクリーニング検査として最も有用であることが報告されている aCL IgG⁸⁴⁾では AcuStar による検出率が 60% (30 例) であり、ELISA キットによる検出率 (MESACUP シリーズ: 66% (33 例), QUANTA Lite[®] シリーズ: 72% (36 例)) を下回った。この結果より、一種類の抗リン脂質抗体で APS 患者のスクリーニング検査を実施する場合には ELISA キットによる aCL IgG 測定が有用であることが示唆された。

AcuStar による抗リン脂質抗体測定の最大の利点は、複数種の抗体を同時に測定できることであり、AcuStar で 4 種類の抗体を同時測定した場合の抗体検出率を算出した。その結果、APS 症例における抗体検出率は 84% (42 例) であり、すべての ELISA キットによる抗体検出率を上回る結果が得られた。本研究結果より、AcuStar にて複数種の抗体を同時に測定することで APS 診断効率が向上することが示唆された。

第5章

結論

本論文では、抗リン脂質抗体症候群の検査診断法の確立及び血栓症発症機序の解明を目的に、血栓症発症リスクの高い抗リン脂質抗体のタイプを特定するとともに、血栓症との関連が明らかになった aCL/ β_2 GPI および aPS/PT の血栓形成作用を静脈・動脈の差異に分けて解明した。さらに、複数種の抗体を同時に測定できる自動分析装置 AcuStar の臨床的有用性について述べた。

以下、本研究で得られた知見をまとめる。

1. 抗リン脂質抗体の組み合わせによる APS の血栓性合併症の診断精度を検討した。その結果、固相化リン脂質とエピトープ提供タンパクの複合体に対する抗リン脂質抗体 (aCL/ β_2 GPI や aPS/PT など) が血栓症と強く関連しており、固相化リン脂質に直接結合する抗体 (aCL や aPS など) は血栓性合併症発症との関連は低いことが示された。さらに、血栓症群においては aCL/ β_2 GPI と aPS/PT がともに陽性である症例が圧倒的に多いことが明らかになった。したがって、APS 患者の血栓性合併症のリスク評価には、aCL/ β_2 GPI と aPS/PT を同時に測定することが重要であることを示唆する所見を得た。
2. aCL/ β_2 GPI と aPS/PT が臨床的に重要であるという結果を踏まえ、両抗体の血栓形成作用を静脈血栓と動脈血栓の差異に着目し検討した。その結果、aCL/ β_2 GPI 及び aPS/PT による単球表面 TF の発現増強作用、単核球からの TNF- α 産生の促進作用、APC の抗凝固活性の抑制作用を確認した。これらの作用は両抗体が single positive である場合よりも double positive である場合に増強されることを見出した。

本研究成果は、APS 患者における動脈・静脈血栓形成機序の解明に繋がる重要な知見であり、我々は一連の研究結果をまとめ、APS の新たな血栓形成機序の概念「CMCI (cell-mediated coagulation induction)」を打ち立てた。CMCI では、抗リン脂質抗体が引き起こす種々の血栓形成メカニズムを概説した。

3. 自動分析装置 AcuStar を用いて 4 種類の抗リン脂質抗体 (aCL IgG/IgM・a β ₂GPI IgG/IgM) を同時に測定した結果、従来の市販 ELISA キットに劣らない抗リン脂質抗体検出率を示した。さらに、AcuStar で 4 種類の抗リン脂質抗体を同時した場合の抗体検出率は、すべての ELISA キットによる抗体検出率を上回っていた。この結果より、AcuStar にて複数種の抗体を同時に測定することで APS 診断効率が向上することが示唆された。

抗リン脂質抗体による血栓形成のメカニズムは未だ解明されていない部分も多い。患者が保有する抗体によって引き起こされる病態が異なることから、個々の抗体がもつ作用を明らかにしていく必要がある。各々の抗体の作用を明らかにすることができれば、患者ごとに合併症リスクを予測することができるようになり、より有効な治療の提供が可能となる。また、自動分析装置を用いた抗リン脂質抗体価測定により APS 診断効率が向上することが見込まれる。本研究成果が APS 病態解明の一助となれば幸いである。

謝辞

本研究は、著者が山口大学大学院 医学系研究科 生体情報検査学領域 博士後期課程在学中に、同大学 生体情報検査学領域 野島順三 教授の御指導のもとに行ったものであります。

アカデミアの世界へと導いていただき、学部時代を含め 6 年間にわたって多大なる御指導を賜りました 山口大学大学院 医学系研究科 生体情報検査学領域 野島順三 教授に甚大なる謝意を表します。

研究全般にわたる多大な御支援、丁寧な御指導を賜りました 山口大学大学院 医学系研究科 生体情報検査学領域 本木由香里 助教に深く感謝致します。

本研究の遂行及び関連論文の作成に当たり、熱心な御指導と御高配を賜りました 山口大学大学院 医学系研究科 生体情報検査学領域 市原清志 教授に感謝並びに心より御礼申し上げます。

山口大学大学院において、様々な御指導、御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 常岡英弘 教授に厚く感謝致します。

本論文に関しまして、様々な御支援と貴重な御助言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 山本健 教授、湯尻俊昭 教授をはじめ、山口大学大学院 医学系研究科 生体情報検査学領域の諸先生方に厚く御礼申し上げます。

研究室のメンバーには常に刺激的な議論をいただき精神的にも支えられました。心から感謝致します。

どんなときも温かく見守り、応援してくれた家族に深く感謝します。

最後に、関係してくださった全ての方に御礼を申し上げ、謝辞と致します。

引用文献

- 1) Hughes GR. The antiphospholipid syndrome: ten years on. *Lancet* 1993; 342: 341-344.
- 2) Roubey RA. Autoantibodies to phospholipid-binding plasma proteins: a new view of lupus anticoagulants and other "antiphospholipid" autoantibodies. *Blood* 1994; 84(9): 2854-2867.
- 3) Harris EN, Chan JK, Asherson RA, Abcr VR, et al. Thrombosis, Recurrent Fetal Loss, and Thrombocytopenia. Predictive Value of the Anticardiolipin Antibody Test. *Arch Intern Med* 1986; 146(11): 2153-2156.
- 4) 野島順三. 抗リン脂質抗体症候群の検査診断に向けた新展開. *日本検査血液学会雑誌* 2011; 12(3): 399-406.
- 5) Hughes GR. Thrombosis, abortion, cerebral disease, and the lupus anticoagulant. *BMJ* 1983; 287(6399): 1088-1089.
- 6) Hughes GRV, Harris NN, Gharavi AE. The anticardiolipin syndrome. *J Rheumatol* 1986; 13(3): 486-489.
- 7) 山崎雅恵. 抗リン脂質抗体症候群. 図説 血栓・止血・血管学, 一瀬白帝 (編). 中外医学社 2005; 410-421.
- 8) Fujieda Y, Atsumi T, Amengual O, Odani T, et al. Predominant prevalence of arterial thrombosis in Japanese patients with antiphospholipid syndrome. *Lupus* 2012; 21(14):1506-1514.
- 9) 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(10): 1899-1906.
- 10) Long AA, Ginsberg JS, Brill-Edwards P, Johnston M, et al. The relationship of antiphospholipid antibodies to thromboembolic disease in systemic lupus erythematosus: a cross-sectional study. *Thromb Haemost* 1991; 66(5): 520-524.
- 11) Mok CC, Tang SSK, To CH, Petri M. Incidence and risk factors of thromboembolism in systemic lupus erythematosus: A comparison of three ethnic groups. *Arthritis Rheum* 2005; 52(9): 2774-2782.
- 12) Ruiz-Irastorza G, Crowther M, Branch W, Khamashta MA. Antiphospholipid syndrome. *Lancet* 2010; 376: 1498-1509.
- 13) Galli M, Barbui T. Antiprothrombin Antibodies: Detection and Clinical Significance in the Antiphospholipid Syndrome. *Blood* 1999; 93(7): 2149-2157.
- 14) Asherson RA. The catastrophic antiphospholipid syndrome. *J Rheumatol* 1992; 19(4): 518-512.
- 15) Asherson RA, Cervera R, Groot PG, Boffa MC, et al. Catastrophic antiphospholipid syndrome: international consensus statement on classification criteria and treatment guidelines. *Lupus* 2003; 12(7): 530-534.

- 16) Erkan D, Cervera R, Asherson RA. Catastrophic antiphospholipid syndrome: where do we stand? *Arthritis Rheum.* 2003; 48(12): 3320-3327.
- 17) Miyakis S, Lockshin MD, Atsumi T, Branch DW, et al. International consensus statement on an update of the classification criteria for definite antiphospholipid syndrome (APS). *Thromb Haemost* 2006; 4(2) 295-306.
- 18) Conley CL. A hemorrhagic disorder caused by circulating anticoagulants in patients with disseminated lupus erythematosus. *J Lab Clin Med* 1952; 31(4): 621-622.
- 19) Feinstein DI, Rapaport SI. Acquired inhibitors of blood coagulation. *Prog Hemost Thromb* 1972; 1: 75-95.
- 20) Thiagarajan P, Shapiro SS, De Marco L. Monoclonal immunoglobulin M lambda coagulation inhibitor with phospholipid specificity. Mechanism of a lupus anticoagulant. *J Clin Invest* 1980; 66(3): 397-405.
- 21) Atsumi T, Ieko M, Bertolaccini ML, Ichikawa K, 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(9): 1982-1993.
- 22) Pengo V, Tripodi A, Reber G, Rand JH, et al. Update of the guidelines for lupus anticoagulant detection. Subcommittee on Lupus Anticoagulant/Antiphospholipid Antibody of the Scientific and Standardisation Committee of the International Society on Thrombosis and Haemostasis. *J Thromb Haemost* 2009; 7(10): 1737–1740.
- 23) 家子正裕, 吉田 美香, 内藤 澄悦. 抗リン脂質抗体症候群と臨床検査. *臨床病理* 2010; 58(4): 343-351.
- 24) Rapaport SI, Ames SB, Duvall BJ. A plasma coagulation defect in systemic lupus erythematosus arising from hypoprothrombinemia combined with antiprothrombinase activity. *Blood* 1960; 15: 212-227.
- 25) Natelson EA, Cyprus GS, Hettig RA. Absent factor II in systemic lupus erythematosus. Immunologic studies and response to corticosteroid therapy. *Arthritis Rheum* 1976; 19(1): 79–82.
- 26) Bajaj SP, Rapaport SI, Fierer DS, Herbst KD, et al. A mechanism for the hypoprothrombinemia of the acquired hypoprothrombinemia-lupus anticoagulant syndrome. *Blood* 1983; 61(4): 684–692.
- 27) Vivaldi P, Rossetti G, Galli M, Finazzi G. Severe bleeding due to acquired hypoprothrombinemia-lupus anticoagulant syndrome. Case report and review of literature. *Haematologica* 1997; 82(3): 345-347.
- 28) Bernini JC, et al. Hypoprothrombinemia and severe hemorrhage associated with a lupus anticoagulant. *J Pediatr* 1993; 123: 937-939.
- 29) Mulliez SM, De Keyser F, Verbist C, Vantilborgh A, et al. Lupus anticoagulant-hypoprothrombinemia syndrome: report of two cases and review of the literature. *Lupus* 2015; 24(7): 736–745.

- 30) Wassermann A, Neisser A, Bruck C. Eine serodiagnostische Reaktion bei Syphilis. Deutsche Med Wochenschr 1906; 32: 745-746.
- 31) Pangborn MC. A New Serologically Active Phospholipid from Beef Heart. Proc. Soc. Exp. Biol Med 1941; 48(2): 484-486.
- 32) Moore JE, Mohr CF. Biological false positive serologic test for syphilis; type, incidence, and cause. J Am Med Assoc 1952; 150(5): 467-473.
- 33) Harris EN, Boey ML, Mackworth-Young, Gharavi AE, et al. Anticardiolipin antibodies: detection by radioimmunoassay and association with thrombosis in systemic lupus erythematosus. Lancet. 1983; 322(8361): 1211-1214.
- 34) Koike T, Sueishi M, Funaki H, Tomioka H, et al. Antiphospholipid antibodies and biological false positive serological test for syphilis in patients with systemic lupus erythematosus. Clin Exp Immunol 1984; 56(1): 193-199.
- 35) McNeil HP, Simpson RJ, Chesterman CN, Krilis SA. 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(11): 4120-4124.
- 36) Galli M, Comfurius P, Maassen C, Hemker HC, et al. Anticardiolipin antibodies (ACA) directed not to cardiolipin but to a plasma protein cofactor. Lancet 1990; 335(8705): 1544-1547.
- 37) Matsuura E, Igarashi Y, Fujimoto M, Ichikawa K, et al. Anticardiolipin cofactor (s) and differential diagnosis of autoimmune disease. Lancet 1990; 336(8708): 177-178.
- 38) Koike T, Matsuura E. What is the "true" antigen for antigen for anticardiolipin antibodies? Lancet 1991; 337(8742): 671-672.
- 39) Matsuura E, Igarashi Y, Fujimoto M, Ichikawa K, et al. Heterogeneity of anticardiolipin antibodies defined by the anticardiolipin cofactor. J. Immunol 1992; 148: 3885-3891.
- 40) Lozier J, Takahashi N, Putnam FW. Complete amino acid sequence of human plasma beta 2-glycoprotein I. Proc Natl Acad Sci USA 1984; 81(12): 3640-3644.
- 41) Matsuura E, Igarashi M, Igarashi Y, Nagae H, et al. Molecular definition of human β 2-glycoprotein (β 2-GPI) by cDNA cloning and inter-species differences of β 2-GPI in alternation of anticardiolipin binding. Int Immunol 1991; 3(12): 1217-1221.
- 42) Matsuura E, Igarashi M, Igarashi Y, Katahira T, et al. Molecular studies on phospholipid binding sites and cryptic epitopes appearing on β 2-glycoprotein I structure recognized by anticardiolipin antibodies. Lupus 1995; 4(Suppl 1): S13-17.
- 43) Agar C, van Os GM, Morgelin M, Sprenger RR, et al. β 2-glycoprotein I can exist in 2 conformations: implications for our understanding of the antiphospholipid syndrome. Blood 2010; 116(8): 1336-1343.
- 44) Katharina G, Nadia W, Michael R, Sven M, et al. β 2-glycoprotein, the major target in antiphospholipid syndrome, is a special human complement regulator. Blood 2011; 118(110): 2774-

2783.

- 45) De Laat B, Derksen RH, van Lummel M, Pennings MT, et al. Pathogenic antibeta2-glycoprotein I antibodies recognize domain I of beta2-glycoprotein I only after a conformational change. *Blood* 2006;107(5):1916-1924.
- 46) Ioannou Y, Romay-Penabad Z, Pericleous C, Giles I, et al. In vivo inhibition of antiphospholipid antibody induced pathogenicity utilizing the antigenic target peptide domain I of beta2-glycoprotein I: proof of concept. *J Thromb Haemost* 2009; 7(5): 833-842.
- 47) Matsuura E, Igarashi Y, Yasuda T, Triplett DA, et al. Anticardiolipin antibodies recognize β 2-glycoprotein I structure altered by interacting with an oxygen modified solid phase surface. *J Exp Med* 1994; 179(2): 457-462.
- 48) Amengual O, Atsumi T, Khamashta MA, Koike T, et al. Specificity of ELISA for antibody to beta 2-glycoprotein I in patients with antiphospholipid syndrome. *Br J Rheumatol.* 1996; 35(12): 1239–1243.
- 49) Edson JR, Vogt JM, Hasegawa DK. Abnormal prothrombin crossed-immunoelectrophoresis in patients with lupus inhibitors. *Blood* 1984; 64(4): 807–816.
- 50) Fleck RA, Rapaport SI, Rao LV. Anti-prothrombin antibodies and the lupus anticoagulant. *Blood* 1988; 72(2): 512–519.
- 51) Eberhard A, Sparling C, Sudbury S, Ford P, et al. Hypoprothrombinemia in childhood systemic lupus erythematosus. *Semin Arthritis Rheum* 1994; 24(1): 12–18.
- 52) D’Agnillo P, Levine JS, Subang R, Rauch J. Prothrombin binds to the surface of apoptotic, but not viable, cells and serves as a target of lupus anticoagulant autoantibodies. *J Immunol.* 2003; 170(6): 3408–3422.
- 53) Galli M, Barbui T. Antiprothrombin Antibodies: Detection and Clinical Significance in the Antiphospholipid Syndrome. *Blood* 1999; 93(7): 2149-2157.
- 54) Simmelink MJ, Horbach DA, Derksen RH, Meijers JC, et al. Complexes of anti-prothrombin antibodies and prothrombin cause lupus anticoagulant activity by competing with the binding of clotting factors for catalytic phospholipid surfaces. *Br J Haematol* 2001; 113: 621–629.
- 55) Carter EE, Barr SG, Clarke AE. The global burden of SLE: prevalence, health disparities and socioeconomic impact. *Nat Rev Rheumatol* 2016; 12(10): 605–620.
- 56) Lisnevskaja, L, Murphy G, Isenberg D. Systemic lupus erythematosus. *Lancet* 2014; 384(9957): 1878-1888.
- 57) Cervera R, Khamashta MA, Font J, Gian Sebastiani GD, et al. Morbidity and mortality in systemic lupus erythematosus during a 10-year period: a comparison of early and late manifestations in a cohort of 1,000 patients. *Medicine (Baltimore)* 2003; 82(5): 299-308.
- 58) Marc C. Updating the American College of Rheumatology Revised Criteria for the Classification of Systemic Lupus Erythematosus. *Arthritis Rheum* 1997; 40(9): 1725.

- 59) Tan EM, Cohen AS, Fries JF, Masi AT, et al. The 1982 revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1982; 25(11): 1271-1277.
- 60) Petri M, Orbai AM, Alarcón GS, Gordon C, et al. Derivation and Validation of Systemic Lupus International Collaborating Clinics Classification Criteria for Systemic Lupus Erythematosus. *Arthritis Rheum* 2012; 64(8): 2677-2686.
- 61) Bombardier C, Gladman DD, Urowitz MB, Caron D, et al. Derivation of the SLEDAI. A disease activity index for lupus patients. *Arthritis Rheum* 1992; 35(6): 630-640.
- 62) 野島 順三. 抗リン脂質抗体症候群の鑑別診断と血栓形成機序. *Sysmex Journal 凝固検査の特集号*. 2011; 34: 21-32.
- 63) Nojima J, Kuratsune H, Suehisa E, Futsukaichi Y, et al. Association between the prevalence of antibodies to β_2 -glycoprotein I, prothrombin, protein C, protein S, and annexin V in patients with systemic lupus erythematosus and thrombotic and thrombocytopenic complications. *Clinical Chemistry* 2001; 47(6): 1008-1015.
- 64) Nojima J, Motoki Y, Aoki N, Tsuneoka T, et al. A novel ELISA system for simultaneous detection of six subclasses of anti-phospholipid antibodies for prediction of thrombotic complications among SLE patients. *Thrombosis Research*. 2014; 133(6): 1135-1140.
- 65) 金重 里沙, 黒木 愛, 坂本 萌絵, 本木 由香里ら. 酵素固相化免疫測定法 (ELISA) を用いた抗リン脂質抗体症候群における血栓症リスクの検討. *医学検査*. 2019; 68(3): 417-423.
- 66) 野島順三. 抗リン脂質抗体症候群の検査診断に向けた新展開. *日本検査血液学会雑誌*. 2011; 12(3): 399-406.
- 67) Otomo K, Atsumi T, Amengual O, Fujieda Y, et al. Efficacy of the antiphospholipid score for the diagnosis of antiphospholipid syndrome and its predictive value for thrombotic events. *Arthritis and Rheumatism* 2012; 64(2): 504-512.
- 68) Sciascia S, Sanna G, Murru V, Roccatello D, et al. GASPSS: The global Anti-Phospholipid Syndrome Score. *Rheumatology* 2013; 52(8): 1397-1403.
- 69) Esmon CT, Owen WG. Identification of an endothelial cell cofactor for thrombin-catalyzed activation of protein C. *Proc Natl Acad Sci USA* 1981; 78(4): 2249-2252.
- 70) Lane DA, Mannucci PM, Bauer KA, Bertina RM, et al. Inherited thrombophilia: Part 1. *Thromb Haemost* 1996; 76(5): 651-662.
- 71) Greengard JS, Sun X, Xu X, Fernandez JA, et al. Activated protein C resistance caused by Arg506Gln mutation in factor Va. *Lancet* 1994; 343(8909): 1361-1362.
- 72) Dahlback B, Carlsson M, Svensson PJ. Familial thrombophilia due to a previously unrecognized mechanism characterized by poor anticoagulant response to activated protein C: prediction of a cofactor to activated protein C. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90(3): 1004-1008.
- 73) Martinelli I, Bucciarelli P, Margaglione M, De Stefano V, et al. The risk of venous

- thromboembolism in family members with mutations in the genes of factor V or prothrombin or both. *Br J Haematol* 2000; 111: 1223-1229.
- 74) Nojima J, Iwatani Y, Ichihara K, Tsuneoka H, et al. Acquired activated protein C resistance is associated with IgG antibodies to protein S in patients with systemic lupus erythematosus. *Thromb Res* 2009; 124(1): 127-131.
- 75) Nojima J, Kuratsune H, Suehisa E, Iwatani Y, et al. Acquired activated protein C resistance associated with IgG antibodies against β 2-glycoprotein I and prothrombin as a strong risk factor for venous thromboembolism. *Clin Chem* 2005; 51(3): 545-552.
- 76) Fujimura H, Kambayash J, Monden M, Kato H, et al. Coagulation factor V Leiden mutation may have a racial background. *Thromb Haemost.* 1995; 74(5): 1381-1382.
- 77) Kaneshige R, Nojima J, Motoki Y, Tsuneoka H, et al. aCL/ β 2GPI and aPS/PT show synergic thrombogenic effects in suppressing anticoagulant activity of APC and stimulating tissue factor expression and TNF- α secretion by mononuclear cells. *Thromb Res* 2019; 181: 52-58.
- 78) Motoki Y, Nojima J, Yanagihara M, Tsuneoka H, et al. Anti-phospholipid antibodies contribute to arteriosclerosis in patients with systemic lupus erythematosus through induction of tissue factor expression and cytokine production from peripheral blood mononuclear cells. *Thromb Res* 2012; 130(4): 667-673.
- 79) Hoffman M, Monroe DM, Roberts HR. Cellular interactions in hemostasis. *Haemostasis.* 1996; 26(Suppl. 1): 12-16.
- 80) Nojima J, Kuratsune H, Suehisa E, Kitani T, et al. Strong correlation between the prevalence of cerebral infarction and the presence of anticardiolipin/ β 2-glycoprotein I and anti-phosphatidylserine/prothrombin antibodies—co-existence of these antibodies enhances ADP induced platelet activation in vivo. *Thromb. Haemost* 2004; 91(5): 967-976.
- 81) FDA: 510(k) SUBSTANTIAL EQUIVALENCE DETERMINATION DECISION SUMMARY. https://www.accessdata.fda.gov/cdrh_docs/reviews/K092181.pdf (Decision Date 2010-3-11) .
- 82) FDA: 510(k) SUBSTANTIAL EQUIVALENCE DETERMINATION DECISION SUMMARY. https://www.accessdata.fda.gov/cdrh_docs/reviews/K091556.pdf (Decision Date 2010-5-21) .
- 83) 金重 里沙, 本木 由香里, 吉田 美香, 關谷 暁子, ら. aPLs-EIA 試薬搭載 ACL AcuStar® による抗リン脂質抗体価測定の有用性. *日本検査血液学会雑誌.* 2020; 21(2): 145-152.
- 84) 本木 由香里, 野島 順三, 吉田 美香, 關谷 暁子, ら. ELISA による抗リン脂質抗体価測定の標準化に向けて. *日本血栓止血学会誌.* 2016; 27(6): 644-652.