

平成 30 年 8 月 28 日現在

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08616

研究課題名(和文) 抗リン脂質抗体症候群の検査診断ガイドラインの作成と病態発症機序の解明

研究課題名(英文) Preparation of guidelines for examination and diagnosis of antiphospholipid syndrome.

研究代表者

野島 順三 (NOJIMA, Junzo)

山口大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：30448071

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：日本抗リン脂質抗体標準化ワークショップに参加する3大学病院の共同研究にて、抗リン脂質抗体検査の標準化を試みた。日本で市販されている10種類のELISAキットについて健常人基準範囲を決定した。さらに、各キットの臨床的有用性を検討し、抗リン脂質抗体症候群の診断に最も適したELISAの組み合わせを明らかにした。さらに、各ELISAキットの臨床的有用性を検証し、抗リン脂質抗体症候群の診断に最も適したELISAキットの組み合わせを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：We tried standardization of antiphospholipid antibodies ELISA in a joint research by three university hospitals participating in the Japan Antiphospholipid antibodies standardization workshop. Regarding the ten kinds of ELISA kits commercially available in Japan, we determined the reference range of healthy subjects. Furthermore, we clarified the combination of ELISA kits most suitable for the diagnosis of antiphospholipid syndrome.

研究分野：血栓止血学

キーワード：抗リン脂質抗体症候群 抗カルジオリピン抗体 抗 2グリコプロテイン 抗体 ELISA

1. 研究開始当初の背景

抗リン脂質抗体症候群 (APS) は、血中に抗リン脂質抗体が出現し、動脈血栓症や静脈血栓症、妊娠合併症などを発症する自己免疫疾患である。APS の診断は臨床所見と検査所見の双方からなされ、検査所見としては抗リン脂質抗体の存在を証明することが必須である。抗リン脂質抗体はリン脂質に関連した抗体の総称であり、APS 患者は 1~数種類の抗リン脂質抗体を保有することが知られている。抗リン脂質抗体の検出には大きく分けて 2 種類の方法が用いられており、1 つはリン脂質依存性の凝固反応に対する阻害活性であるループスアンチコアグラント活性 (LA 活性) を検出することにより、抗リン脂質抗体の種類を問わず、その存在を証明する方法であり、もう 1 つは抗リン脂質抗体そのものを種類別に ELISA にて定量する方法である。抗リン脂質抗体症候群分類基準案札幌クライテリアシドニー改変 (APS 分類基準) では、抗カルジオリピン抗体 (aCL) の IgG または IgM と、抗 2 グリコプロテイン 抗体 (a2GP) の IgG または IgM が ELISA による定量の対象となる抗体である。本邦ではこれらの抗体を含め、2 グリコプロテイン 依存性抗カルジオリピン抗体 (aCL/2GP) や抗ホスファチジルセリン/プロトロンビン抗体 (aPS/PT) など、多数の抗体を検出するキットが複数社より販売されている。しかしながら、各キットで測定される抗体価は、同一の抗体を定量するキットであっても単位が統一されておらず、また、明瞭な基準範囲も定められていないために、測定値の評価が難しい。日本における抗リン脂質抗体検査の標準化は重要な課題である。

2. 研究の目的

日本抗リン脂質抗体標準化ワークショップに参加する 8 大学病院共同による前向き検討にて、日本国内において取扱いのある各種抗リン脂質抗体測定 ELISA キットについて、健康人参考値の設定、施設間差・キット間差の評価、APS 診断における各キットの有用性の評価等を行い、日本における抗リン脂質抗体価測定の標準化を目指した。

3. 研究の方法

(1) 各種抗リン脂質抗体価の健康人基準範囲値の算出

現在日本で販売されている抗リン脂質抗体測定 ELISA10 キットにて同一の健康人検体を測定し、キットごとに健康人基準範囲値を算出した。測定対象とした健康人群は、全国の医療従事者を対象とし、健康状態や生活習慣による一次除外基準 (喫煙 25 本/日、飲酒エタノール量 75g/日、BMI 28、妊娠中または分娩後 1 年以内、慢性疾患による定期服薬中、入院を要する急性疾患または手術から復帰後 1 週以内) に該当しなかった 2053 名のうち、臨床検査 94 項目がすべて正常範

囲内であった対象者から無作為に抽出した 400 名 (男女比 189:211, 平均年齢 37.7 歳 [21-64 歳]) である。各キットにて健康人 400 名の抗体価を測定し、測定値の分布をべき乗変換にて正規化したのちに、APS 分類基準に則り、全体の 99 パーセントイル未満を健康人基準範囲値とした。

(2) 施設間差およびキット間差の評価

APS 患者および APS 疑い患者 63 例 (男女比 10:53, 平均年齢 49.8 歳 [16~82 歳]) と健康人 33 例 (男女比 7:26, 平均年齢 38.8 歳 [21~59 歳]) の計 96 検体を対象に、3 施設 (北海道医療大学、金沢大学、山口大学) にて 10 種類すべてのキットによる抗体価測定を実施し、測定値の施設間差を評価した。さらに、同一種類の抗体を検出する複数のキットについて、施設間差の検討に用いた 96 検体を対象に測定値のキット間差を評価した。

(3) APS 患者における各種抗体の陽性率

現在の APS 分類基準では、aCL あるいは a2GP の IgG または IgM の検出が検査所見として挙げられている。日本では、MBL 社の MESACUP カルジオリピン IgG とヤマサ醤油株式会社の抗 CL・2GP 「ヤマサ」EIA の 2 キットによる抗体価の測定のみが保険収載されており、IgM クラスの測定や aPS/PT の測定は自由診療で行わざるを得ない。しかしながら、抗リン脂質抗体は多様な抗体群であり、APS 患者が保有する抗体は患者により異なることから、複数種類の抗体価測定を行っているのが現状である。そこで、健康人基準範囲参考値を算出した 10 キットにおいて、APS の診断が確定している 56 症例 (男女比 9:47, 平均年齢 50.9 歳 [16~82 歳], うち動脈血栓症発症例 41 例、静脈血栓症発症例 17 例、妊娠合併症発症例 8 例) を対象に、各種抗体の陽性率を調べた。

4. 研究成果

(1) 各種抗リン脂質抗体価の健康人基準範囲値の設定

絶対的健康人 400 名を対象に各キットにて抗体価の測定を実施し、測定値の分布をべき乗変換にて正規化したのちに、APS 分類基準に則り、全体の 99 パーセントイル未満を健康人基準範囲値とした。その結果、表 1 に示すように、同一の抗体を検出するキットであっても、統一された単位がないため、健康人基準範囲の値には差が認められた。また、今回算出した基準範囲値の中には、キットの添付文書に記載されている参考値と大きく異なるものも複数みられた。さらに、キットごとに測定値を男女別に比較すると、IgG クラスの抗体ではいずれのキットにおいても男女差は全く認められなかったが、IgM クラスの抗体では全てのキットにおいて有意な男女差を認めた。そこで、IgM クラスの抗体について男女別に基準範囲値を算出すると、女

性の方が高い値であった。

表1. 健常人基準範囲参考値

抗リン脂質抗体測定キット	メーカー	基準範囲	基準範囲 男性	基準範囲 女性	添付文書 参考値	単位
MESACUP カルジオリピン IgG	MBL	< 12.3	—	—	< 10	U/mL
QUANTA Lite ACA IgG	アイ・エル・ジャパン	< 10.1	—	—	< 15	GPL
抗CL-B2GP I「ヤマサ」EIA	ヤマサ醤油	< 2.5	—	—	< 3.5	unit/U/mL
MESACUP カルジオリピン IgM	MBL	< 10.7	< 7.9	< 13.4	< 8	U/mL
QUANTA Lite ACA IgM III	アイ・エル・ジャパン	< 19.8	< 17.8	< 20.8	< 12.5	MPL
QUANTA Lite B2GPI IgG ELISA	アイ・エル・ジャパン	< 3.0	—	—	≦ 20	SGU
QUANTA Lite B2GPI IgM ELISA	アイ・エル・ジャパン	< 15.0	< 14.3	< 15.5	≦ 20	SMU
PS/PT ELISA IgG	MBL	< 19.1	—	—	< 12	U/mL
QUANTA Lite aPS/PT IgG ELISA	アイ・エル・ジャパン	< 44.0	—	—	≦ 30	unit
QUANTA Lite aPS/PT IgM ELISA	アイ・エル・ジャパン	< 34.4	< 31.3	< 35.5	≦ 30	unit

(2) 施設間差およびキット間差の評価

施設間差評価では、キット毎に各2施設間の測定値の相関をとると、スピアマン順位相関係数は0.716から0.977であり、一部キットで値が乖離する検体がいくつか見られたが、おおむね良好な相関関係を示した。また、表1で示した健常人基準範囲値をカットオフとして抗体の陽性・陰性を判定した場合、3施設の判定一致率は73~98%であり、一部一致率の悪いキットが認められ、判定不一致となった例のほとんどが基準範囲値付近の抗体価を示す検体であった。特に一致率の悪かったQUANTA Lite 2GPI IgGは、カットオフが3.0SGUと値の低いキットであり、施設による検量線の近似式に用いた関数の違いが抗体価の低い検体の測定値に誤差を生じたものと考えられる。

一方、キット間差評価では、aCL-IgGを検出するキットはMBL社とアイ・エル・ジャパン社の2種類あり、2キット間のスピアマン順位相関係数は0.909と良好であった。健常人基準範囲参考値に基づき、抗体の陽性・陰性を判定した場合、2キット間の判定一致率は90.6%であった。判定が一致しなかった9例は全てカットオフ値付近の抗体価を示す検体であり、2キット間で大きく測定値が乖離する検体はなかった(図1A)。

ヤマサ醤油株式会社の2GP依存性抗カルジオリピン抗体を検出するキットについて、aCL-IgGを検出する2キットとキット間差を検討した。MBL社およびアイ・エル・ジャパン社のキット間のスピアマン順位相関係数はそれぞれ0.776, 0.842であり、抗体陽性判定一致率はそれぞれ88.5%, 87.5%であった。判定不一致はそれぞれ11例, 12例であり、いずれか一方のキットのみで抗体が検出される検体が多数みられた(図1B, C)。

aCL-IgMはMBL社とアイ・エル・ジャパン社の2キット間でスピアマン順位相関係数0.861, 判定一致率は92.7%であり、判定が一致しなかったのはカットオフ値付近の抗体価を示す検体であった(図1D)。

aPS/PT-IgGを検出するMBL社とアイ・エル・ジャパン社の2キットでは、スピアマン順位相関係数は0.756, 判定一致率は90.6%であり、不一致であった9例はいずれも大きく値が乖離していた(図1E)。

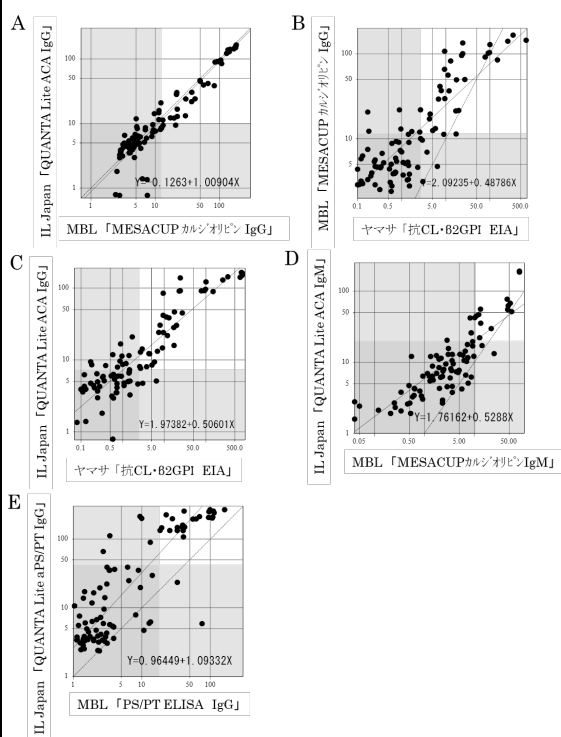


図1. 同一抗体を検出するキット間の測定値の相関関係

同一健常人群の検体を用いて各キットの基準範囲を設定することにより、測定するキットに関わらず概ね一致した判定が得られると考えられる。しかしながら、今回の検討において、一部の抗体ではキットにより検出されない症例も認められており、どのキットを用いても一部見逃される症例があることに注意が必要である。

(3) APS患者における各種抗体の陽性率

今回の対象において最も陽性率が高かったのはQUANTA Lite 2GPI IgG ELISA【アイ・エル・ジャパン】の64%(36/56例)であり、次いで抗CL・2GP「ヤマサ」EIA【ヤマサ醤油】61%(34/56例), QUANTA Lite ACA IgG【アイ・エル・ジャパン】59%(33/56例), MESACUP カルジオリピン IgG【MBL】57%(32/56例)と続き、aCLやa2GPのIgGクラスが多く症例で検出された(図2)。一方でIgMクラスの陽性率は、QUANTA Lite 2GPI IgM ELISA【アイ・エル・ジャパン】38%(21/56例), QUANTA Lite ACA IgM【アイ・エル・ジャパン】27%(15/56例), MESACUP カルジオリピン IgM【MBL】21%(12/56例)と3~5人に1人の患者が陽性であった。さらに、aPS/PTをみると、IgGクラスはPS/PT ELISA IgG【MBL】では36%(20/56例), QUANTA Lite aPS/PT IgG ELISA【アイ・エル・ジャパン】では46%(26/56例)の患者で陽性を示し、IgMクラスのQUANTA Lite aPS/PT IgM ELISA【アイ・エル・ジャパン】では48%(27/56例)と、およそ半数の患者において陽性であった(図2)。各種IgMクラスの抗体やaPS/PTは現在のところ保険適応されていない検査

項目であるが、一部にこれらの抗体のみ陽性である患者も見受けられた。aCLに加え aCL IgM を測定した場合の抗体陽性率は aCL 単独測定に比べ約 7%上昇し、さらに aPS/PT IgG の測定を加えると、aCL 単独測定に比べ抗体陽性率は 18~23%上昇した(図3)。

APS 患者が多様な抗リン脂質抗体を有することは明らかであり、保有する抗体の種類が多いほど、血栓症や妊娠合併症のリスクが高いことが報告されている。APS 検査診断精度の向上ばかりでなく、種々の合併症発症のリスク評価の観点からも、多種類の抗体価を測定することが重要である。

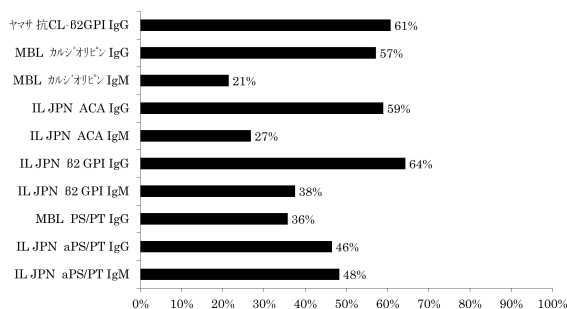


図2. APS患者におけるキット別抗体陽性率

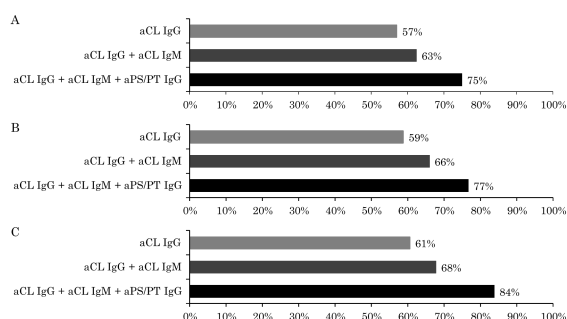


図3. 複数の抗体価を測定した場合の抗体検出率

抗リン脂質抗体を測定するキットは多数あるが、抗体価の単位や抗体の陽性基準は統一されていない。我々は、各種キットについて一律に健常人の 99 パーセント未満を健常人基準範囲参考値として算出し、同一の健常人群から算出した基準範囲を用いることにより、どのキットを用いて測定を実施してもほぼ同じ判定結果が得られることを確認した。既存のキットにおける抗体価の単位やキット間の測定値を統一することは困難であるが、メーカーの枠を超えて基準範囲を一括して定めることにより、抗体陽性判定の標準化は可能である。

今回、施設間差を検討する中で、測定者の技術的な問題により測定結果が大きく乖離することを経験した。いずれのキットにおいても検体は 101 倍希釈して測定に使用し、複数の反応ステップを経て抗体価が測定される。キットは誰でも簡便に測定ができるよう設計されているが、ELISA 測定に使用する器具の扱いに慣れており、ELISA 測定そのものにある程度熟練した者が測定を実施すべ

きである。

現在のところ保険収載されていないキットや APS 分類基準に採択されていない抗体の測定キットについても同時に検討を行ったが、今回対象とした APS 患者では保険適応となる抗体検査だけでは 6 割程度しか抗体陽性にならず、APS を診断する上でより多数の抗体を測定する必要があることは明白である。各種キットの保険収載や、aPS/PT の APS 分類基準への採択が強く望まれる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 12 件)

Nojima J, Motoki Y, Hara K, Sakata T, Tsuneoka H, Ichihara K. Detection of antibodies against domain 1 of 2-glycoprotein I is key in predicting thromboembolic complications in patients with systemic lupus erythematosus. *Thromb Res.* 153(6): 83-84, 2017. 査読有 DOI:10.1016/j.thromres.2017.02.001

Nojima J, Motoki Y, Hara K, Sakata T, Ichihara K. Novel enzyme immunoassay system for simultaneous detection of six subclasses of anti-phospholipid antibodies for differential diagnosis of anti-phospholipid syndrome. *Blood Coagul Fibrinolysis.* 28(4): 316-322, 2017. 査読有 DOI:10.1097/MBC.0000000000000599

Yamaguchi Y, Nakazato S, Izumi K, Ieko M, Nomura T, Shimizu H. Rapid remission of severe pain from livedoid vasculopathy by apixaban. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 31: e45-e46, 2017. 査読有 DOI:10.1111/jdv.13691

Tsuneoka H, Yanagihara M, Tokuda N, Otsuyama KI, Nojima J, Ichihara K. The utility of a country-specific Bartonella henselae antigen in an IgM-indirect fluorescent antibody assay for the improved diagnosis of cat scratch disease. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 87(1): 22-24, 2017. 査読有 DOI:10.1016/j.diagmicrobio.2016.10.015

Fukuda S, Nojima J, Motoki Y, Yamaguti K, Nakatomi Y, Okawa N, Fujiwara K, Watanabe Y, Kuratsune H. A potential biomarker for fatigue: Oxidative stress and anti-oxidative activity. *Biol Psychol.* 118: 88-93, 2016. 査読有 DOI:10.1016/j.biopsycho.2016.05.005

Fukuda S, Nojima J, Kajimoto O, Yamaguti K, Nakatomi Y, Kuratsune H, Watanabe Y. Ubiquinol-10 supplementation improves autonomic nervous function and cognitive function in chronic fatigue syndrome. *BioFactors* 42(4): 431-440, 2016. 査読有 DOI:10.1002/biof.1293

Oku K, Amengual O, Kato M, Bohgaki T, Yasuda S, Ieko M, Atsumi T. Significance

of fully automated tests for the diagnosis of antiphospholipid syndrome. *Thromb Res.* 146: 1-6, 2016. 査読有

DOI:10.1016/j.thromres.2016.08.018

Kumano O, Ieko M, Naito S, Yoshida M. New formulas for mixing test to discriminate between lupus anticoagulant and acquired hemophilia A. *Thromb Res.* 143: 53-57, 2016. 査読有

DOI:10.1016/j.thromres.2016.05.004

本木由香里, 野島順三, 吉田美香, 關谷暁子, 原和冴, 森下英理子, 家子正裕. 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*, 27: 644-652, 2016. 査読有

DOI:10.2491/jjsth.27.644

Ebina Y, Ieko M, Naito S, Kobashi G, Deguchi M, Minakami H, Atsumi T, Yamada H. Low levels of plasma protein S, protein C and coagulation factor XII during early pregnancy and adverse pregnancy outcome. *Thromb Haemost.* 114: 65-69, 2015. 査読有

DOI:10.1160/TH14-11-0928

Takahashi N, Yoshizaki T, Hiranaka N, Kumano O, Suzuki T, Akanuma M, Yui T, Yoshida M, Naito S, Fujiya M, Kohgo Y, Ieko M. The production of coagulation factor VII by adipocytes is enhanced by tumor necrosis factor- or isoproterenol. *Int J Obes (Lond)*. 39: 747-754, 2015. 査読有

DOI:10.1038/ijo.2014.208

Hayakawa M, Gando S, Ono Y, Wada T, Yanagida Y, Sawamura A, Ieko M. Noble-Collip Drum Trauma Induces Disseminated Intravascular Coagulation But Not Acute Coagulopathy of Trauma-Shock. *Shock*. 43: 261-267, 2015. 査読有

DOI:10.1097/SHK.0000000000000281

〔学会発表〕(計 21 件)

金重里沙, 坂本萌絵, 本木由香里, 野島順三. 抗リン脂質抗体症候群における血栓症発症機序の解明. 第 8 回 TTM フォーラム九州 2017 年

坂本萌絵, 金重里沙, 本木由香里, 野島順三. 心停止後症候群の予後推測因子としての相対的酸化ストレス度. 第 8 回 TTM フォーラム九州 2017 年

田島里紗, 本木由香里, 野島順三. 抗リン脂質抗体症候群における脳梗塞発症機序の解明. 第 12 回日本臨床検査学教育学会学術大会 2017 年

坂本萌絵, 本木由香里, 野島順三. 生理的疲労と病的疲労の鑑別検査法確立と病的疲労形成に対する抗酸化サプリメントの効果検証. 第 12 回日本臨床検査学教育学会学術大会 2017 年

金重里沙, 本木由香里, 野島順三. 抗リン脂質抗体による後天性活性化プロテイン C レジスタンス 第 18 回日本検査血液学会 2017

年

本木由香里, 吉田美香, 關谷暁子, 原和冴, 家子正裕, 森下英理子, 野島順三. 日本における抗リン脂質抗体 ELISA の標準化に向けて - 第 3 報 - 第 11 回日本血栓止血学会学術標準化委員会 (SSC) シンポジウム. 2017 年

金重里沙, 原和冴, 本木由香里, 野島順三. 抗リン脂質抗体による活性化プロテイン C 系凝固制御機構の阻害作用. 第 49 回日本臨床衛生検査技師会中四国支部医学検査学会 2016 年

我毛美鈴, 玉利知佳子, 本木由香里, 野島順三. 全血法フローサイトメトリーによる活性化血小板及び活性化血小板-単球複合体定量法. 第 49 回日本臨床衛生検査技師会中四国支部医学検査学会 2016 年

金重里沙, 原和冴, 本木由香里, 野島順三. 抗リン脂質抗体による活性化プロテイン C 系凝固制御機構の阻害作用. 第 7 回 TTM フォーラム九州 2016 年

Hara K, Motoki Y, Sakata T, Nojima J. Novel enzyme immunoassay system for simultaneous detection of six subclasses of anti-phospholipid antibodies for differential diagnosis of anti-phospholipid syndrome. The 32nd World Congress of Biomedical Laboratory Science. August 31-September 4, 2016.

我毛美鈴, 玉利知佳子, 本木由香里, 野島順三. 全血を用いたフローサイトメトリーによる活性化血小板定量法. 第 11 回日本臨床検査学教育学会学術大会 2016 年

金重里沙, 原和冴, 尾崎綾香, 本木由香里, 野島順三. 抗リン脂質抗体による活性化プロテイン C 系凝固制御機構の阻害作用. 第 11 回日本臨床検査学教育学会学術大会 2016 年

村田知奈美, 原和冴, 玉利知佳子, 本木由香里, 野島順三. 抗リン脂質抗体症候群の病態に対する酸化ストレスの影響. 第 16 回 TTM フォーラム. 2016 年

野島順三. 抗リン脂質抗体症候群の疾患概念と検査診断プロセス. 第 3 回九州凝固検査共同研究会 (招待講演). 2016 年

本木由香里, 吉田美香, 關谷暁子, 原和冴, 家子正裕, 森下英理子, 野島順三. 日本における抗リン脂質抗体 ELISA の標準化に向けて - 第 2 報 - 第 10 回日本血栓止血学会学術標準化委員会 (SSC) シンポジウム. 2016 年

玉利知佳子, 井手紬, 原和冴, 村田知奈美, 本木由香里, 野島順三. ループスアンチコアグラント活性迅速鑑別検査法の確立. 第 6 回 TTM フォーラム九州 2015 年

原和冴, 玉利知佳子, 村田知奈美, 本木由香里, 野島順三. Multiplex-aPLs-EIA システムによる抗リン脂質抗体検査診断法の確立. 第 6 回 TTM フォーラム九州 2015 年

野島順三. 抗リン脂質抗体症候群の疾患概念と検査診断プロセス. 第 1 回 Werfen 血液凝固セミナー (招待講演) 2015 年

原和冴, 玉利知佳子, 村田知奈美, 本木由香里, 野島順三 .Multiplex-aPLs-EIA システムによる抗リン脂質抗体検査診断法の確立 . 第 10 回日本臨床検査学教育学会学術大会 2015 年

玉利知佳子, 井手紬, 原和冴, 村田知奈美, 本木由香里, 野島順三 . 新たなループスアンチコアグラント活性迅速鑑別検査法の確立 . 第 10 回日本臨床検査学教育学会学術大会 2015 年

⑭野島順三 . 抗リン脂質抗体症候群の検査診断確立への新展開 . 第 37 回日本血栓止血学会学術集会ランチョンセミナー 3 2015 年

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

野島 順三 (NOJIMA, Junzo)

山口大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号 : 3 0 4 4 8 0 7 1

(2) 研究分担者

家子 正裕 (IEKO, Masahiro)

北海道医療大学・歯学部・教授

研究者番号 : 5 0 2 5 0 4 3 6

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

本木 由香里 (MOTOKI, Yukari)

原 和冴 (HARA, Kazusa)

玉利 知佳子 (TAMARI, Chikako)