

# 抗カルジオリピンIgG/IgM抗体および 抗 $\beta_2$ グリコプロテイン I IgG/IgM抗体測定

Measurement of anticardiolipin IgG/IgM antibodies and  
anti-beta<sub>2</sub>-glycoprotein I antibody IgG/IgM antibodies

なが や さと み もり した えりこ  
長 屋 聡 美 : 森 下 英理子  
Satomi NAGAYA Eriko MORISHITA

## はじめに

抗リン脂質抗体 (antiphospholipid antibodies, aPL) とは、リン脂質やリン脂質と蛋白質の複合体に結合する自己抗体群である。血中 aPL の存在が証明され、動静脈血栓症や妊娠合併症などの様々な病態を示す自己免疫疾患群を抗リン脂質抗体症候群 (antiphospholipid syndrome, APS) と総称する<sup>1,2)</sup>。

APSに関連する aPL としては、抗カルジオリピン抗体 (anticardiolipin antibodies, aCL)、抗 $\beta_2$ グリコプロテイン I 抗体 (anti-beta<sub>2</sub>-glycoprotein I antibodies, a $\beta_2$ GPI)、ループスアンチコアグラント (lupus anticoagulant, LA)、ホスファチジルセリン依存性抗プロトロンビン抗体 (phosphatidylserine-dependent anti-prothrombin antibodies, aPS/PT) が知られている。この中でも臨床的に重要な aPL の主要抗原は、陰性荷電のリン脂質膜と結合した $\beta_2$ GPI とプロトロンビンであることが明らかとなっている<sup>3)</sup>。本邦においては、「抗カルジオリピン IgG/IgM 抗体および $\beta_2$ グリコプロテイン I IgG/IgM 抗体 4 項目同時測定 (化学発光免疫測定法)」が令和 2 年 7 月 1 日より保険収載された。従来 aPL の測定は、複数社から市販されている ELISA キットを用いて行われてきたが、国際血栓止血学会学術標準化委員会の APS 検査基準 2018 年版において、ELISA 以外の自動分析法を用いた aPL 検査も分類基準の検査として認められている<sup>4)</sup>。今回の保険収載を受け、本稿では aPL 検査について改めて解説する。

## I. APS の病態と臨床所見

APS は臨床的に重要な後天性血栓性素因である。APS 患者の約 80 ~ 90% は女性であり、患者層は 10 歳代から 80 歳代まで幅広い。明らかな基礎疾患や誘因はなく、aPL を認め血栓症を発症する原発性 APS と、主に全身性エリテマトーデス (systemic lupus erythematosus, SLE) に合併する続発性 APS とに分類され、APS の約半数が SLE に合併した続発性 APS である<sup>1,2)</sup>。

APS の血栓症の特徴は、静脈だけではなく動脈にも発症することである。静脈血栓症では深部静脈および表在静脈血栓症や肺塞栓症が多いが、動脈血栓症では脳梗塞や一過性脳虚血発作などの脳血管障害が圧倒的に多く、虚血性心疾患は比較的少ない。また、妊娠合併症としては、習慣流産や子宮内胎児死亡 (妊娠中~後期に多い) および妊娠高血圧症候群が挙げられる<sup>3)</sup>。APS の特殊型として、腎臓を含む 3 臓器以上において、急激な多発性臓器梗塞を発症し、極めて予後不良の劇症型 APS (catastrophic APS) も存在する。

血栓症や妊娠合併症以外にも、心臓弁膜症、神経症状 (てんかん、舞踏病、横断性脊髄炎など)、皮膚症状、微小血栓による腎障害、血小板減少 (10 万/ $\mu$ L 以下の血小板減少が 12 週間以上の間隔を空けて 2 回以上確認) などの“aPL 関連症状”も APS の臨床症状に含まれる。

## II. APS の診断と aPL の測定意義

APS の分類基準案としては、“Sapporo Criteria” Sydney 改定 (2006) が用いられている<sup>5)</sup>。臨床所見として動静脈血栓症か妊娠合併症のいずれか1つ以上が存在し、かつ検査所見のうち aCL-IgG/IgM、 $\alpha\beta_2\text{GPI-IgG/IgM}$ 、または LA のいずれか1つ以上が12週間の間隔を空けて2回以上陽性であれば APS と分類される。臨床症状としては、aPL 関連血小板減少などの“aPL 関連症状”も含まれ、患者に認められる臨床症状が APS であると正確に診断するためには、各種 aPL の正確な測定が非常に重要である。

aPL の検出法は、抗原を固相化した酵素結合免疫吸着法 (ELISA) と、APTT や希釈ラッセル蛇毒時間 (dRVVT) などのリン脂質依存性凝固時間の延長を検出する機能的な方法とに大別され、これらは同じ性質をもつ自己抗体群を異なる測定法で検出している。近年、臨床検査の自動化推進を受け、自動分析装置による aCL-IgG/IgM および  $\alpha\beta_2\text{GPI-IgG/IgM}$  4項目同時測定試薬が開発された。従来の ELISA 法による測定は標準化が不十分であり、キットにより抗体価の単位が異なることや、明確な基準範囲が定められていないといった問題点が指摘されていたが、測定の自動化により aPL 測定の標準化が進むことが期待されている。

## III. aPL と検査法

### 1. 抗カルジオリピン抗体 (aCL) : ELISA (図 1)

aPL 測定法で最も早くに確立された抗体検査であ

り、当初 aPL の主要な対応抗原は、ミトコンドリア膜の主要なリン脂質であるカルジオリピンに対する自己抗体と考えられていた<sup>6)</sup>。現在では、APS に関連した aCL と、感染症やポリクローナル B 細胞活性化を伴う膠原病 (APS を合併しない SLE やシェーグレン症候群) などで出現する非特異的な aCL は異なることが知られている<sup>3)</sup>。すなわち、APS と関連する aCL は、カルジオリピンそのものに直接結合する抗体ではなく、カルジオリピンに結合することにより構造変化を起こした  $\beta_2\text{GPI}$  分子上のエピトープを認識して結合する抗体であり、臨床重要となるのはこの  $\beta_2\text{GPI}$  依存性 aCL である<sup>7)</sup>。

MBL 社の「MESACUP カルジオリピン IgG」は、カルジオリピン感作マイクロカップに反作用緩衝液中に希釈した検体を添加することにより、緩衝液中に含まれるウシ血清由来の  $\beta_2\text{GPI}$  を補酵素として aCL を測定する。このキットでは国際単位 1GPL (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$  の aCL 力価) を 1U/mL と設定してあるため、APS 分類基準に照合しやすい。測定原理上、固相化カルジオリピンに直接結合する抗体 ( $\beta_2\text{GPI}$  非依存性 aCL) と、カルジオリピンと  $\beta_2\text{GPI}$  の複合体に対する抗体 ( $\beta_2\text{GPI}$  依存性 aCL) を同時に測定することになるが、スクリーニング検査としては有用性が高い<sup>7)</sup>。一方で、ヤマサ醤油社の「抗 CL・ $\beta_2\text{GPI}$  『ヤマサ』 EIA」は、固相化カルジオリピンに精製ヒト  $\beta_2\text{GPI}$  を添加した系としない系で同時に aCL の測定を行い、 $\beta_2\text{GPI}$  存在下での aCL が非存在下での aCL よりも明らかに抗体価が高く、かつ基準値以上の場合を陽性と判定するため、 $\beta_2\text{GPI}$  依存性 aCL が鑑別可能である。したがって、臨床測定意義は高いが、国際的な評価に乏しいという問題点がある<sup>7)</sup>。

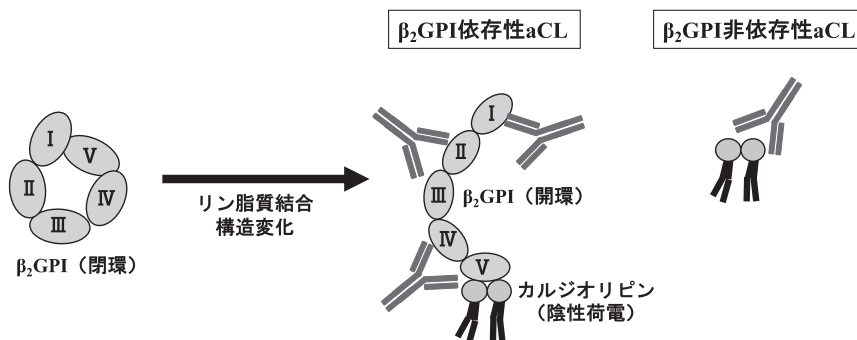


図 1  $\beta_2\text{GPI}$  の構造および  $\beta_2\text{GPI}$  依存性抗カルジオリピン抗体 (文献12～14)を参考に著者が作成)

## 2. 抗 $\beta_2$ グリコプロテインI抗体 (a $\beta_2$ GPI) : ELISA (図2)

$\beta_2$ GPIは、主に肝臓で合成される糖蛋白で、5つのドメインから構成される。血清中ではドメインIとドメインVが結合した閉環構造で存在しているが、カルジオリピンなどの陰性荷電物質と結合することにより構造変化をきたし開環する(図1)<sup>8)</sup>。a $\beta_2$ GPIは、 $\gamma$ 線照射により酸化処理を施したELISAプレートに直接 $\beta_2$ GPIを固相化したものを抗原として検出する。本測定法では、 $\beta_2$ GPIのエピトープに特異的に結合する抗体のみを測定でき、APSの臨床病態に特異性が高いことが示されているが、ELISAキットが保険収載されていない。

市販キットとしては、アイ・エル・ジャパン社の「QUANTA Lite  $\beta_2$ GPI IgG ELISA」「QUANTA Lite  $\beta_2$ GPI IgM ELISA」があり、研究用として測定は可能である。しかし、日本抗リン脂質抗体標準化ワークショップが全国の医療従事者を対象として実施した「他施設共同による共有基準範囲設定」の結果では、「QUANTA Lite  $\beta_2$ GPI IgG ELISA」の添付文書参考値は20SGU以下であったが、算出された基準範囲は3SGU未満と大きく異なっており<sup>6)</sup>、a $\beta_2$ GPIの正確な評価のためには明確な基準範囲の設定が必要である。

また、これまでにaPLが結合する $\beta_2$ GPI上のエピトープに関してはいくつか報告されてきたが、近年の研究により $\beta_2$ GPIドメインIに対するaPLが、APSの臨床症状と関わりが強いことが明らかとなった<sup>9)</sup>。市販キットとしては、Inova Diagnostics社の「QUANTA-Flash  $\beta_2$ GPI Domain I」が研究室レベルで使用されており、このキットではリコンビナント $\beta_2$ GPIドメインIのみを固相化したアッセイで検出

している。

## 3. ループスアンチコアグラント(LA) : リン脂質依存性凝固時間法

LAは「*in vitro*のリン脂質依存性凝固反応(APTT、dRVVTなど)を阻害する免疫グロブリン」と定義されている<sup>1)</sup>。LAは、*in vitro*においては凝固時間測定用試薬中に存在するリン脂質に結合し、リン脂質を中和してしまうことにより凝固反応を阻害し、凝固時間を延長させると推定されている<sup>10)</sup>。

LAはaPLの一種であるが、抗体を直接検出しているのではなく、凝固時間法を用いて機能的に測定している。国際血栓止血学会aPL標準化委員会のLA検査ガイドラインでは、①APTTまたはdRVVTでリン脂質依存性凝固時間が延長していることをスクリーニングする、②交差混合試験(クロスミキシングテスト)で正常血漿の添加による凝固時間の短縮を認めず、inhibitorの存在を確認する、③過剰リン脂質添加により凝固時間の短縮を確認し、inhibitorがaPLであることを証明するという手順が示されている<sup>1,3)</sup>。図3に本邦におけるLAの測定方法を示す<sup>10)</sup>。

LA検査における注意点として、血漿検体中に血小板などのリン脂質供給源が多量に存在すると、LAが中和されてしまい偽陰性と判定される可能性がある。LA用血漿サンプルは、残存血小板数を極力低下させるため1,500×g・15分以上の遠心分離や、バッフィーコート付近まで採取しないこと、二重遠心処理なども有用である。凍結融解時に残存血小板からのリン脂質遊離を防ぐため、可能な限り凍結保存サンプルによる測定は避けたほうが良い<sup>10)</sup>。また、LAは測定試薬中のリン脂質濃度に依存し、使用する測定試薬により感度が大きく異なっているため、

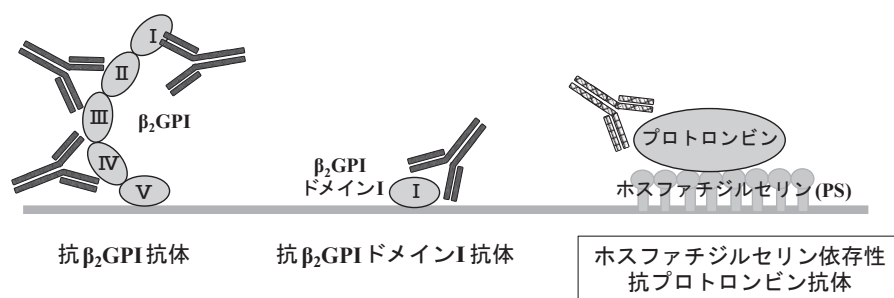


図2 抗 $\beta_2$ GPI抗体、抗 $\beta_2$ GPIドメインI抗体、ホスファチジルセリン依存性抗プロトロンビン抗体  
(文献8, 13)より、8)は引用改変)

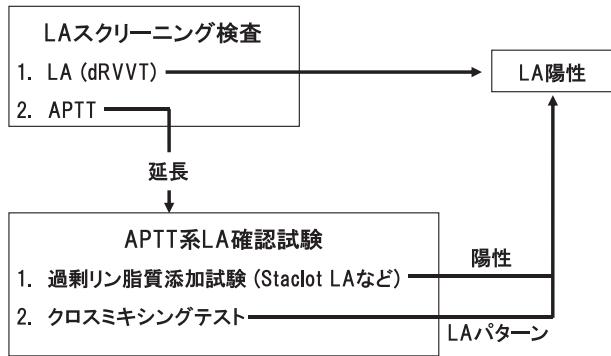


図3 ループスアンチコアグラントの測定方法  
(文献10)より引用改変)

LAに感受性が高い試薬を用いて測定する必要がある。さらに、LA検査には判定困難な例も存在し、ワルファリンやヘパリンによる抗凝固療法施行中の患者では判定不能であるといった問題点もある<sup>1,3)</sup>。

#### 4. ホスファチジルセリン依存性抗プロトロンビン抗体 (aPS/PT) : ELISA (図2)

aPS/PTは、細胞膜の主要な酸性リン脂質であるホスファチジルセリン (phosphatidylserine, PS) に結合し、構造変化をきたしたプロトロンビン (prothrombin, PT) に対する抗体である。aPS/PTはAPSの臨床症状やLAの存在と非常に強い相関があり、LA陽性者の半数はaPS/PT陽性であり、aPS/PT陽性者は9割以上がLA陽性であったとされている<sup>1)</sup>。

aPS/PTはELISAプレートにホスファチジルセリンを固相化し、Ca<sup>2+</sup>イオン存在下でプロトロンビンを吸着させたものを抗原として用いる。複数社よりELISAキットが市販されているが、現時点ではaPL分類基準案に採用されておらず、保険収載もされていない<sup>6)</sup>。

#### 5. aCL-IgG/IgM および aβ<sub>2</sub>GPI-IgG/IgM 4項目同時測定：化学発光免疫測定法

APS患者の血液中には、認識するエピトープの違いにより特異性の異なる多種類のaPLが存在し、血漿中に存在する抗体の組み合わせによりAPS特有の多彩な合併症が生じることが示唆されている<sup>11)</sup>。APSの診断には複数のELISAキットを用いた多種類のaPL測定が必要とされるが、従来保険適用となっていたaPLはIgG型aCL、IgG型β<sub>2</sub>GPI依存

性aCL、LA (dRVVT法)のみであり、IgM型抗体やaPS/PTなどは自費検査であった。このように、多種類のaPL測定は医療費の面からも現実的ではなく、APSの確定診断に至っていない症例も多く存在すると推測される。令和2年7月1日より、「抗カルジオリピンIgG/IgM抗体およびβ<sub>2</sub>グリコプロテインI IgG/IgM抗体4項目同時測定 (化学発光免疫測定法)」が保険適用となったことを受け、APS分類基準に沿った検査が可能となり、LAとこれら4種類のaPLを一連で測定することはAPS診療において非常に有用であると考えられる。

現在、aCL-IgG/IgM および aβ<sub>2</sub>GPI-IgG/IgM 4項目の同時測定が可能な自動分析装置は、Instrumentation Laboratory社の測定試薬aPLs-EIA搭載ACL AcuStar および、ファディア株式会社の測定試薬EliA搭載Phadia200である。ACL AcuStarを例に挙げると、まずカルジオリピンとβ<sub>2</sub>GPIをコーティングさせた磁気粒子に患者由来のaPLを反応させ、そこにイソルミノール標識モノクローナル抗体が結合すると発光する化学発光免疫測定法を測定原理としている。発光量は反応した抗体価に応じて変化するため、その発光量をルミノメーターにて検出して抗体価を算出する<sup>11)</sup>。原らの報告によると、SLE患者138例のaPLを測定したところ、aCLは138例中69例、aβ<sub>2</sub>GPIは138例中65例が抗体陽性であり、抗体サブクラスでは両者共にIgGクラスとIgAクラスのオーバーラップを認める症例が多かった (図4)<sup>11)</sup>。今回の保険収載にはIgAクラスは含まれていないが、aCL-IgAおよびaβ<sub>2</sub>GPI-IgA測定の有用性については今後より多くの症例にて検討を重ねていく必要があると考えられる。

### おわりに

従来のaPL測定で用いられてきたELISAキットでは、保険収載されている項目が少ないことや、測定系が標準化されていないことから、測定者によるばらつき・施設間差・基準値の不明確さなどの様々な問題があり、多様な抗体を保有しているAPS患者を正確に診断していくことが難しい現状があった。今回、保険収載された「aCL-IgG/IgM および aβ<sub>2</sub>GPI-IgG/IgM 4項目同時測定」は、4項目を一度に測定可能であり、自動分析装置を用いることに

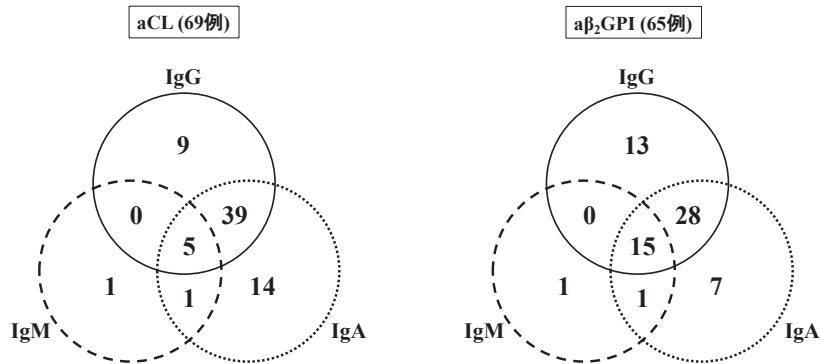


図4 APS患者血漿中のaCLおよび $a\beta_2$ GPIの抗体サブクラス  
(文献11)より一部抜粋、転載)

よる簡便性・精密性の向上が見込まれる。また、自動分析化により測定系の標準化にも取り組みやすくなるため、全国規模での適切な基準範囲の設定なども可能になると思われ、APSの正確な診断に寄与するものである。

## 文 献

- 1) 阿部靖矢, 渥美達也. 抗リン脂質抗体症候群. 血栓止血誌. 2018; **29**(3): 294-306.
- 2) 家子正裕. 抗リン脂質抗体症候群(APS). 臨床に直結する血栓止血学 改定第2版. 東京: 中外医学社; 2018. 444-450.
- 3) 渥美達也. 抗リン脂質抗体症候群の診断. 血栓止血誌. 2019; **30**(1): 23-27.
- 4) Devreese KMJ, Ortel TL, Pengo V, et al. Laboratory criteria for antiphospholipid syndrome: communication from the SCC of the ISTH. *J Thromb Haemost* 2018; **16**: 809-813.
- 5) 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**(2): 295-306.
- 6) 本木由香里, 野島順三, 吉田美香, 他. ELISAによる抗リン脂質抗体測定標準化にむけて. 血栓止血誌. 2016; **27**(6): 644-652.
- 7) 野島順三. 抗カルジオリピン抗体, 抗カルジオリピン- $\beta_2$ GPI複合体抗体, 抗 $\beta_2$ GPI抗体. 臨床に直結する血栓止血学 改定第2版. 東京: 中外医学社; 2018. 145-147.
- 8) 中村浩之, 渥美達也. 新しい抗リン脂質抗体. 臨床に直結する血栓止血学 改定第2版. 東京: 中外医学社; 2018. 148-150.
- 9) Banzato A, Pozzi N, Frasson R, et al. Antibodies to Domain I of  $\beta(2)$ GPI Glycoprotein I are in close relation to patients risk categories in Antiphospholipid Syndrome (APS). *Thrombs Res*. 2011; **128**(6): 583-586.
- 10) 家子正裕. ループスアンチコアグラントとクロスミキシング試験. 臨床に直結する血栓止血学 改定第2版. 東京: 中外医学社; 2018. 50-53.
- 11) 原和冴, 本木由香里, 金重里沙, 他. Multiplex-EIA systemを利用した抗リン脂質抗体スクリーニング検査システムの検討. 医学検査. 2020; **69**(2): 160-167.
- 12) 田代陽介. 4本足のリン脂質. 生物工学会誌. 2018; **96**(3): 142.
- 13) Chaturvedi S, McCrae KR. Diagnosis and management of the antiphospholipid syndrome. *Blood Rev*. 2017; **31**(6): 406-417.
- 14) Misasi R, Longo A, Recalchi S, et al. Molecular Mechanisms of "Antiphospholipid Antibodies" and Their Paradoxical Role in the Pathogenesis of "Seronegative APS". *Int J Mol Sci*. 2020; **21**(21): 8411.