

抗リン脂質抗体症候群における検査方法の標準化と 血栓症発症メカニズムの解明

著者	熊野 穰
学位名	博士（薬学）
学位授与機関	北海道医療大学
学位授与年度	平成26年度
学位授与番号	30110乙第109号
URL	http://id.nii.ac.jp/1145/00010253/

論文要旨

抗リン脂質抗体症候群における検査方法の標準化と血栓症発症メカニズムの解明

平成 26 年度

熊野 穰

【緒言】

抗リン脂質抗体症候群 (antiphospholipid syndrome : APS) は、血中に抗リン脂質抗体 (antiphospholipid antibodies : aPL) を有し、動静脈血栓症や習慣性流死産などの臨床症状を呈する疾患群の総称である。aPL の一つにループスアンチコアグラント (LA) があり、その検出には凝固検査の APTT (activated partial thromboplastin time) 試薬が用いられる。APTT 試薬は血友病などの検査にも用いられ、成分として活性化剤とリン脂質を含有する。活性化剤は凝固カスケードの接触因子を活性化する物質であり、シリカとエラグ酸が一般的に用いられ、国際血栓止血学会標準化委員会は LA を高感度に検出する APTT 試薬としてシリカが活性化剤の試薬を推奨している。また、LA の検査方法として患者血漿と正常血漿を混合するミキシングテストが用いられ、その定量化指標として The index for circulating anticoagulant (ICA) が推奨されている。ICA = $(b - c) / a \times 100$ で表され、ここで a は患者血漿の APTT 凝固時間、b は患者血漿と正常血漿を 1 : 1 で混合した血漿の APTT 凝固時間、c は正常血漿の APTT 凝固時間を示す。一方、LA の生体内の血栓症発症メカニズムとして、単球と血管内皮細胞の Tissue Factor (TF) の mRNA 発現上昇の報告がある。しかし、aPL は多様性に富むポリクローナル抗体であり、血栓形成機序は単一ではないと考えられる。

そこで、LA における検査方法の標準化と血栓症発症メカニズムの解明を主な目的として次の検討を行った。① 現在 LA の検出には活性化剤としてシリカを用いる試薬が推奨されている。しかし明確な根拠はないため、同一リン脂質濃度において活性化剤のみが異なるシリカとエラグ酸の 2 種類の APTT 試薬をそれぞれ調製し、LA に対する反応性を比較した。② ICA のカットオフ値に正常検体群の 99 パーセントイルの上限値がガイドラインで推奨されているが明確な根拠はないため、4 種類の APTT 試薬で Receiver Operating Characteristic (ROC) 解析を行い、カットオフ値の最適値を算出し、ガイドラインの方法と比較して有用性を検討した。③ aPL により血管内皮細胞に発現する TF に加え、凝固抑制因子の Thrombomodulin (TM) の mRNA 発現量変化を測定し、TM が発現減少して血栓傾向を示すか検討した。

【方法】

①リン脂質が同一であり、活性化剤のみが異なるシリカ (SL) とエラグ酸 (EA) の試薬をそれぞれ調製し、市販試薬である APTT-SLA (SLA), Actin FSL (FSL), APTT-SP (SP), PTT-LA (PTT) を対照として ICA を算出して反応性を比較した。健康人 41 例, LA 陰性 41 例, LA 陽

性 22 例を用いて、Coagrex-800 により凝固時間を測定した。②SLA, FSL, SP, PTT を用いて健常人 61 例, ワルファリン投与患者 23 例, 未分画ヘパリン投与患者 19 例, 血友病 A 患者 29 例, LA 陽性 28 例を用いて同様に測定した。得られた凝固時間から ICA を算出し, ROC 解析とガイドラインの方法によりカットオフ値, 感度, 特異度を算出して比較した。③LA 患者血漿から aPL を含むポリクローナル IgG を Protein G カラムにより精製した。また, 対照として健常人血漿から IgG を精製した。精製 IgG をヒト臍帯静脈血管内皮細胞 (Pooled Human Umbilical Vein Endothelial Cells: HUVEC) に 0.2 mg/ml となるように添加した。さらに, 2% FBS, 10 ng/ml LPS, 5 µg/ml β2-glycoprotein I を添加して 4 時間培養し, Real Time PCR により TF と TM の mRNA 量を検出した。また, 上記の培地成分に更に 5mM cAMP を添加した条件で同様の実験を行った。

【結果・考察】

①SL, EA, SLA, FSL, SP, PTT の LA に対する感度はそれぞれ 91%, 96%, 68%, 46%, 91%, 86% であり, 特異度はすべてのケースで 95 ~ 100% の範囲であった。また, EA の ICA が 6 試薬中で最も高値を示し, 各試薬との比較で有意差が認められた。シリカまたはエラグ酸を活性化剤とした試薬の比較では, エラグ酸を活性化剤とする試薬の方が LA の反応性が高かったことから, LA の反応性に活性化剤は影響しないと考えられた。②SLA, FSL, SP, PTT の ROC 解析から算出したカットオフ値は 12.4, 10.4, 13.6, 13.0 であり, ガイドラインの方法は 15.3, 16.8, 17.0, 17.7 であった。感度は ROC 解析の方法で 79%, 79%, 93%, 96%, ガイドラインの方法で 61%, 32%, 79%, 71% であり, 特異度はいずれのケースでも 83 ~ 99% の範囲であった。ROC 解析のカットオフ値から算出した感度はガイドラインの方法よりも高く, 有用と考えられた。③LA 患者の IgG を添加した細胞では健常人の場合と比較して, RNA 発現量が TF で 180% に上昇, TM で 60% に減少した。cAMP 存在下では, LA 患者の IgG と健常人の IgG で TF の発現量の変化はなく, TM の更なる発現減少のみ認められた。凝固抑制因子の TM が発現減少して血栓傾向になり, cAMP 高値となる条件下で更に傾向が強まると考えられた。

【結論】

①リン脂質が同一の条件下において調製したエラグ酸を活性化剤とする試薬は, シリカを活性化剤とする試薬と比較して LA への反応性が高く, LA を検出する試薬として十分な反応性を有することが明らかとなった。②ROC 解析から算出したカットオフ値は 10.4 ~ 13.6 の範囲であり, ガイドラインの方法よりも有用であった。10 ~ 14 の範囲で試薬共通のカットオフ値をガイドラインで設定することが望ましいと考えられる。③APS 患者が血栓症を発症するメカニズムとして凝固抑制因子である TM の発現量が低下して血栓症を引き起こす可能性が示唆された。