

新たな抗リン脂質抗体 ELISA の確立と臨床的有用性の検証

鍵谷彩恵*[§] 鎌田理緒* 石丸春奈* 藤原沙弥*
野島順三* 金重里沙* 本木由香里*

I. 研究の概要

【背景および目的】

抗リン脂質抗体症候群 (anti-phospholipid syndrome : APS) は、種々のリン脂質およびリン脂質結合タンパクを標的抗原とする抗リン脂質抗体の出現に伴い、動・静脈血栓症や妊娠合併症等を呈する自己免疫疾患である。APS の診断には抗リン脂質抗体の検出が必須であり、現在の診断基準では抗カルジオリピン抗体 (aCL) もしくは抗 β_2 グリコプロテイン I 抗体 (a β_2 GPI) の検出が採用されている。

近年、診断基準である aCL および a β_2 GPI を保有しないにも拘らず、APS 特有の臨床症状を発症する非基準抗リン脂質抗体症候群 (non-Criteria APS) が問題視されている。そこで、本研究では APS の検査診断の向上を目的に、ホスファチジルイノシトール (PI) とホスファチジルエタノールアミン (PE) の2種類のリン脂質を固相化した Homemade-ELISA を確立し、現在 APS 診断基準に採択されている aCL および a β_2 GPI-ELISA との比較により臨床的有用性を検討した。

【方 法】

ELISA プレートの各ウェルに PI あるいは PE (50 μ g/ml) を 30 μ l/well 添加し、4°C にて一晩 (PE は 2 時間) 静置した。冷風ドライアップした後、10% adult bovine plasma (ABP) にて 2 時間ブロッ

キングした。Well を洗浄後、10% ABP および 0.05% Tween20 加 TBS にて 101 倍希釈した患者血清を 50 μ l/well 添加して室温にて 1 時間静置した。well を洗浄後、5,000 倍 (PE は 10,000 倍) 希釈したペルオキシダーゼ標識抗ヒト IgG 抗体を 100 μ l/well 添加し室温にて 1 時間静置した。well を洗浄後、Tetramethylbenzidine (TMB) を 100 μ l/well 添加し 20 分間 (PE は 30 分間) 反応させ、1N HCl にて反応を停止させ、450 nm における吸光度を測定、吸光度に 1,000 を乗じた値を結合活性 (mOD) とした。

【結 果】

APS 50 症例、APS 非合併 SLE (SLE) 10 症例、APS 以外の膠原病 (Others) 40 症例、健常人 73 例を対象に aPI および aPE-ELISA にて測定を実施し、健常人 73 名の測定値をべき乗変換にて正規分布化し、パラメトリック法の 99%tile 値 114 mOD を基準値に設定し各症例群における aPI-ELISA の陽性率を比較した結果、SLE 群 10%、Others 群 17.5%、健常人群 2.7% に比較して APS 群では 84% と明らかに高かった。さらに、aPI-ELISA と 3 種類の市販 ELISA キットとの測定値の相関を検討した結果、vs. MESACUP aCL-IgG : $r = 0.932$ 、vs. QUANTALite aCL-IgG : $r = 0.920$ 、vs. QUANTALite a β_2 GPI-IgG : $r = 0.843$ と良好な相関関係を示したが、一部で測定値が乖離する症例も認められた。一方 aPE-ELISA では、各症例

* 山口大学大学院医学系研究科生体情報検査学野島研究室 [§] c004upw@yamaguchi-u.ac.jp

群で結合活性の中央値に有意な違いは認められず、また市販 ELISA キットとの測定値の相関も認められなかった。また、既知の抗リン脂質抗体である aCL と $\alpha\beta_2$ GPI が共に陰性で APS 特有の動・静脈血栓症が認められた non-Criteria APS 症例に対しても同様のプロトコルを用いて測定を行った。その結果、non-Criteria APS13 症例中 4 例に aPI の存在が認められ、出現率は 30.7% であった。

【考 察】

本研究では、固相化リン脂質にホスファチジルイノシトール (PI) およびホスファチジルエタノールアミン (PE) を、エピトープ提供蛋白として ABP を用いた新たな ELISA を確立し、臨床的有用性を検討した結果、aPI-ELISA は原発生および続発性 APS に特異的な新たな抗リン脂質抗体を検出できる可能性を見出した。さらに、既知の抗リン脂質抗体が陰性の non-criteria APS 症例の約 30% で aPI-ELISA が陽性であり、APS 検査診断の向上に役立つ新たな ELISA である可能性が示唆された。

II. 受賞の感想

今回、このような素晴らしい賞を受賞することができ、大変うれしく思っております。今回の発表は私にとって初めての学会発表であり時間内に話せるか、質問に答えることができるのか等、様々な不安があり、当日はとても緊張していました。しかし、今回の発表を経て、緊張を完全に無くす

のではなく、いい緊張感のなかで発表するということを得てきたように思います。また、学会発表という形で人前に立ったことによってさらに自身の研究への知見を深めることができました。質疑応答を通して次なる研究へのヒントを頂くことができ、とても有意義な時間となりました。

コロナ禍での開催、非常に多くの苦悩があったことと思います。このような状況下にも拘らず現地での開催を決めてくださった日本臨床検査学教育学会学術大会運営の皆様、並びに支えてくださった研究室の先生方に今一度感謝申し上げます。

III. 将来の抱負

APS は原因がはっきりしている場合もありますが、一方で原因となる抗体が検出されないことによって、APS 特有の症状があるにも拘らず原因不明として扱われている症例が多いのも事実です。APS の方が妊娠した場合、不育症のみならず、妊娠高血圧症や胎盤機能不全、胎児発育不全、HELP 症候群等の合併症のリスクも高まるとされています。

治療をせず放置しておくとも周産期予後が悪くなるため妊娠した場合は早い段階から治療することが大切です。そのためにはやはり早期発見が不可欠であり、原因となる抗体を確定することが求められています。私の研究が妊娠合併症の発症を 1 例でも減らせること、不安な妊婦さんを一人でも減らせることに貢献することを切に願います。