

不育症

—治療法の変遷

杉浦 真弓

不育症の原因の変遷

不育症 recurrent pregnancy loss は「妊娠はするけれど流産・死産を繰り返して児を得られない場合」と定義される。かつては習慣流産として3回以上連続する流産が検査の対象とされたが、近年、2回以上で研究対象とされるようになった。

不育症の原因には抗リン脂質抗体、子宮奇形、夫婦染色体異常がある^{1,2)}。実施すべき検査を表に示した。Branch ら²⁾は臨床家が実施すべき検査として抗リン脂質抗体、子宮奇形、夫婦染色体検査、胎児染色体検査を推奨している。

名古屋市立大学不育症 1,676組を対象とした研究では、抗リン脂質抗体 10.7%、子宮奇形 3.2%、夫婦どちらかの染色体異常 6%、糖尿病、甲状腺機能低下症、多嚢胞性卵巣症候群などの内分泌異常 12%の頻度であり、約 70%が原因不明であった(図B)¹⁾。糖尿病、甲状腺機能低下は古くから習慣流産の原因といわれてきたが、不育症に占める頻度が低いいため、質の高い研究が実施しにくく、エビデンスは限られる。

胎児染色体異常が流産の原因であることは疑いようがないが、反復する原因としては考えられてこなかった。我々は不育症患者の 1,309 妊娠について、既往流産が 2~4 回では 50%以上に胎児染色体異常がみられ、流産回数が増加すると生児獲得率が低下することを世界で初めて報告した³⁾。さらに最近、胎児染色体検査と系統的検査がすべて行われた不育症 482 組の原因頻度を調べたとこ

ろ、41%は胎児染色体異常のみがみられ、胎児染色体正常を示す真の原因不明は 25%に留まることが明らかになった(図A)⁴⁾。また、胎児染色体検査が複数回実施されている症例では 70%以上が胎児異常は異常を、胎児正常は正常の核型を反復していた。胎児染色体異常が確認された既往流産 2~3 回程度の患者には系統的検査をしない、という選択もある。

日本産科婦人科学会・日本産婦人科医会診療ガイドライン産科編「CQ204 反復流産・習慣流産」における推奨レベルは抗リン脂質抗体 A、子宮奇形 A、夫婦染色体検査 B である(表)。

一方、2008~2010 年厚生労働省不育症班研究が行われ、ホームページに研究成果が公開されている。この内容は班員の研究成果に基づくものであって世界のエビデンスとは異なるため、以下の問題点がある。研究班は「スクリーニング検査」を推奨している。習慣流産の病名で保険適用されている検査が多いが、スクリーニング検査は通常「自費診療」となる。一般臨床家は患者の経済的負担軽減のためにも「診療ガイドライン産科編」が示す検査を段階的に行うべきである。また、研究班はプロテイン S と抗フォスファチジルエタノールアミン抗体測定を推奨しているがこれらの産科的意義は未確定である。Branch ら²⁾、米国胸部外科学会ガイドラインは「妊娠合併症既往女性に血栓性素因のスクリーニング検査を推奨しない」としている。

夫婦染色体均衡型転座保因者

我々は反復流産 1,284 組のコホート研究を行い、相互転座を持つ夫婦と染色体正常夫婦の診断後初

すぎうら まゆみ
名古屋市立大学大学院医学研究科産科婦人科学
〒467-8602 愛知県名古屋市瑞穂町字川澄 1
E-mail address : og.mym@med.nagoya-cu.ac.jp

表 原因精査のために必要な検査と対策

	基本的検査の実際	予防, 対策	日産婦診療ガイドライン推奨レベル	BranchらのN Engl J Med総説
抗リン脂質抗体	抗カルジオリビン β_2 GP I 複合体抗体 >1.9 (230) ループスアンチコアグラント(RVVT) >1.3 (290) ループスアンチコアグラント(リン脂質中和法, 290)* いずれかが12週間持続したら診断する	アスピリン81 or 100 mg+ヘパリンカルシウム(5,000 IU×2/日)自己注射	A	推奨
夫婦染色体異常	染色体G分染法(3130)**	遺伝カウンセリング 着床前診断 自然妊娠	B	推奨
子宮奇形	子宮卵管造影(512), 超音波検査(530)***	手術 非手術	A	推奨
胎児染色体	流産絨毛の染色体G分染法	薬物投与無	C	推奨
内分泌異常(糖尿病, 甲状腺機能低下, 多のう胞性卵巣症候群)	空腹時血糖(11), TSH (115), FT4 (140), 超音波検査, 問診	糖尿病, 甲状腺機能コントロール		推奨しない
血栓性疾患				推奨しない

() 習慣流産の病名での保険点数

*リン脂質中和法はSRL社の基準値6.3よりも1.6のほうが産科的には有用である可能性があり, 現在検討中である。蛇毒法と同時に保険適用されない

**染色体異常の病名で保険適用される

***習慣流産, 不育症では保険適用されていない

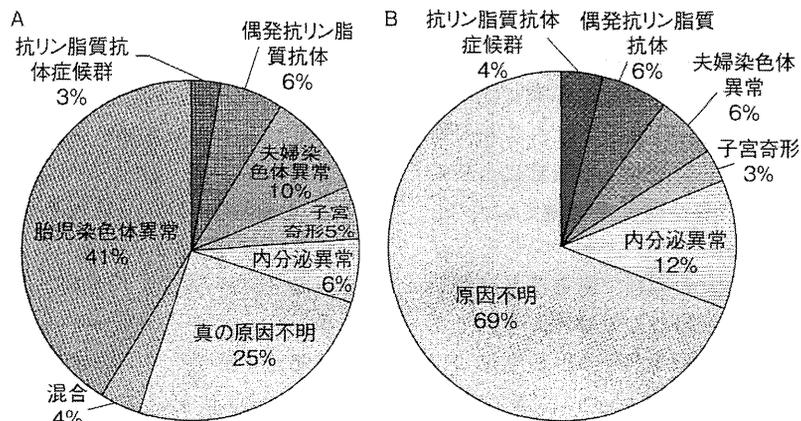


図 不育症精査を行った1,676人の異常頻度と胎児染色体検査を加えた482人の異常頻度
A: 胎児染色体異常を含めた482人の不育症患者の異常頻度(Sugiura-Ogasawaraら, 2012)⁴⁾
B: 1,676人の不育症患者の異常頻度(Sugiura-Ogasawaraら, 2010)¹⁾

回妊娠での生児獲得率は31.9% (15/47)と71.7% (849/1,184)であり, 均衡型相互転座保因者の流産率が有意に高いことを世界で初めて報告し

た⁵⁾。累積生児獲得率は68.1%であり, オランダの研究でも83%と高い成績だった。

一方, 2005年から日本でも流産予防のための着

床前診断が始まった。生児獲得率は14.3～58.6%と報告されており、自然妊娠に対する優位性は証明されていない。比較ゲノムハイブリダイゼーション法、FISH法いずれの方法においても自然妊娠を対照として着床前診断が生児獲得率を改善することを証明した報告はない。

抗リン脂質抗体症候群

プレドニゾロン・アスピリン併用療法が最初に報告されたが、流産予防として低用量アスピリン・未分画ヘパリン療法が標準的治療法になっており、生児獲得率は70～80%とされている。国際抗リン脂質抗体学会の診断基準に準じた抗リン脂質抗体症候群APSに対しては2012年から保険適用された。診断基準には抗カルジオリピン抗体aCLもしくは抗 β_2 glycoprotein I (β_2 GP I)抗体(β_2 GP I依存性抗CL抗体を含む)、ループスアンチコアグラント(LA, リン脂質中和法)もしくは希釈ラッセル蛇毒法(LA-RVVVT)の3者が含まれている。

現在、 β_2 GP I, prothrombinを抗原としたELISA法が開発され多くの測定系が委託検査可能となっているが、陽性の時に抗凝固療法を行うと生児獲得率が改善できる「産科的意義」が確立されているものは少ない。

我々は5倍希釈aPTT試薬を用いて混合試験を行い(LA-aPTT)、無治療では53.8%の次回流産率が抗凝固療法によって19.6%に改善できることを確認した。

リン脂質中和法は1.6(健常人の99パーセントイル)を基準として陽性の場合、抗凝固療法によって生児獲得率が改善できることを確認した。リン脂質中和法とLA-aPTTは理論的に同じだが、試薬が違うことで異なる患者を検出した。LAに関しては試薬ごとに産科的有用性を確認する必要がある。フォスファチジルセリン依存性抗プロトロンビン抗体aPS/PT IgGも産科的意義を認めた。抗カルジオリピン抗体IgG, IgMは診断基準に含まれるが、陽性の場合に抗凝固療法を行っても生児獲得率は全く変わらなかった(論文投稿中)。Harrisの方法と記載されているが古典的Harrisの方法とは異なる点に留意する必要がある。

抗フォスファチジルエタノールアミンPE抗体IgG, IgMの陽性率はそれぞれ約10%であり、陽性率が高いために我が国では頻用されている。しかし、PE IgGはLA-aPTTと共陽性例はあるものの標準的測定法によるAPS群とかい離しており、単独陽性に関して無治療の出産率が71.4%もあり、産科的測定意義は認められなかった⁶⁾。

現時点ではLA-リン脂質中和法、LA-RVVVT法、 β_2 GP I依存性抗CL抗体(基準値>1.9)の3者を用いてAPSの診断を行うことがベストと考えられる。aPS/PT IgG測定も有用であるが保険適用はされていない。抗リン脂質抗体陰性で抗核抗体陽性例に治療の必要はない。

子宮奇形に対する手術

双角子宮に対する形成手術、中隔子宮に対する内視鏡的中隔切除術後の生児獲得率は35.1～64.9%と報告されている。しかし、これらの論文に対照はなく、長い間、手術が有用と盲目的に信じられてきた。当院の1,676例の反復流産患者の検討で単角子宮、重複子宮、双角子宮、中隔子宮の大奇形は3.2%にみられ、子宮奇形をもつ患者と正常子宮をもつ患者の非手術診断後初回妊娠成功率は59.5%(25/42)、71.7%(1,096/1,528, $p=0.084$)、累積成功率は78%、85.5%であった¹⁾。子宮奇形に対する手術・非手術を比較したRCTは行われていない。

胎児染色体数的異常

欧米では、原因不明習慣流産に対して胚スクリーニングが行われている。Platteauらの報告によると過去に4.46回流産歴のある原因不明習慣流産患者25人に着床前診断を行ったところ妊娠継続できたのはたったの25%だった。我々の検討では過去5回流産歴のある患者の51%が次回自然妊娠で出産できており、Platteauらも胚スクリーニングの有効性は認められないと述べている。

原因不明不育症

1981年に夫リンパ球免疫療法が報告された。当時は3回流産すると次は100%流産すると世界中が信じていた。しかし、臨床経験を積み上げた研

究者は習慣流産患者が無治療でも出産に至ることに気が付き始め、1999年には夫リンパ球と生理食塩水を比較する無作為割付け試験が報告され、夫リンパ球が無効であることが明らかになった。原因不明習慣流産に対し低用量アスピリン、アスピリン・ヘパリン療法、プラセボを無作為割付けし、これらの有効性がないことも証明された。ステロイド、イムノグロブリン、プロゲステロンなども生児獲得に関する確証は得られていない。

原因不明不育症には必ずしも薬剤投与の必要性はなく、既往流産2回流産81.1%、3回71.2%、4回65.4%、5~6回50%の成功率が得られている。薬剤投与する場合は投与しなくても成功率に差はないことを説明し、倫理委員会の承認と患者の同意を得ることが必要である(厚生労働省臨床研究の倫理指針)。

原因不明不育症にさまざまな遺伝子変異が関与していることがわかってきた。習慣流産患者にアネキシンA5遺伝子変異が健常女性よりも高頻度に見られる危険因子であることが欧米で報告され、我々も同様の結果を得た⁷⁾。しかし、そのオッズ比は1.6程度であり、変異有・無の間にその後の出産率の差はなかった。つまり、危険因子の影響は臨床的に大きなものではなく、不育症に関する

遺伝子変異は数多く存在することで“易罹患性”を示すものと推測できる。

文献

- 1) Sugiura-Ogasawara M, Ozaki Y, Kitaori T, et al : Midline uterine defect size correlated with miscarriage of euploid embryos in recurrent cases. *Fertil Steril* **93** : 1983-1988, 2010
- 2) Branch DW, Gibson MG, Silver RM : Recurrent miscarriage. *N Engl J Med* **363** : 1740-1747, 2010
- 3) Ogasawara M, Aoki K, Okada S, et al : Embryonic karyotype of abortuses in relation to the number of previous miscarriages. *Fertil Steril* **73** : 300-304, 2000
- 4) Sugiura-Ogasawara M, Ozaki Y, Katano K, et al : Abnormal embryonic karyotype is the most frequent cause of recurrent miscarriage. *Hum Reprod* **27** : 2297-2303, 2012
- 5) Sugiura-Ogasawara M, Ozaki Y, Sato T, et al : Poor prognosis of recurrent aborters with either maternal or paternal reciprocal translocations. *Fertil Steril* **81** : 367-373, 2004
- 6) Obayashi S, Ozaki Y, Sugi T, et al : Antiphosphatidylethanolamine antibodies might not be independent risk factors for further miscarriage in patients suffering recurrent pregnancy loss. *J Reprod Immunol* **85** : 41-45, 2010
- 7) Hayashi Y, Sasaki H, Suzuki S, et al : Genotyping analyses for polymorphisms of *ANXA5* gene in patients with recurrent pregnancy loss. *Fertil Steril* **100** (4) : 1018-1024, 2013

* * *

2. 抗リン脂質抗体症候群に関する最近の話題

北海道大学大学院医学研究科内科学 第2内科准教授 渥美達也

key words antiphospholipid syndrome, anticardiolipin antibody, beta-2 glycoprotein I, complement

動 向

抗リン脂質抗体は、抗リン脂質抗体症候群 (APS) 患者にみられる自己抗体で、血栓症と妊娠合併症とに強く関連している。抗リン脂質抗体はリン脂質あるいはリン脂質と蛋白の複合体に結合する抗体の総称であるが、APSと関連する抗リン脂質抗体の主な対応抗原は β 2-グリコプロテインI (β 2GPI) とプロトロンビンである。抗リン脂質抗体は、その強い臨床症状とのリンクから、病原性自己抗体であると考えられてきた。とくに同定された主要な対応抗原はいずれも血漿蛋白であり、抗原抗体反応が血管内で起こりえるため、膠原病の多くで認められる細胞内の自己抗原をターゲットとした自己抗体よりも病原性を議論しやすい。

β 2GPIは、1960年代の初めから主に肝で産生される過塩素酸可溶性の機能不明の蛋白として知られていた。 β 2GPIはさまざまな陰性荷電と結合する性質は知られていたが、血中に比較的高濃度 (約200 μ g/ml) に存在するにもかかわらず、その機能については長く注目されてこなかった。1980年代になってAPSの診断に抗カルジオリピン抗体の測定が行われるようになり、当初カルジオリピンに結合していると考えられていた抗カル

ジオリピン抗体の真の対応抗原が β 2GPIであることがわかって、 β 2GPIの機能があらためて注目されるようになった。抗カルジオリピン抗体は β 2GPI依存性抗カルジオリピン抗体 (aCL/ β 2GPI) であると考えられるようになった。興味深いことには、aCL/ β 2GPIは、 β 2GPIが液層に存在している状態では β 2GPIに結合できない。陰性リン脂質に結合するか、あるいは酸化プラスチック表面に結合した β 2GPIにのみ結合した。その理由は、陰性リン脂質などの相互作用による β 2GPIの構造変化に伴い、クリプティックエピトープが表出するためと仮定されていた。1999年に β 2GPIの結晶構造が解析され、その後 β 2GPIと抗カルジオリピン抗体 (抗 β 2GPI抗体) との相互関係が分子レベルで示されるようになった。さらに2010年、 β 2GPIの液相と固相との分子構造が解明され、その全貌が明らかとなってきた。また、ここ数年、 β 2GPIの血管新生への影響、酸化ストレスにおける β 2GPIの転写後修飾の詳細などが示され、 β 2GPIのバイオロジーは急速に進歩しつつある。

抗リン脂質抗体の病原性の研究は、 β 2GPIの分子構造や機能の解析とあいまって、 β 2GPIを介した自己抗体の向血栓細胞への作用へと拡大さ

れてきた。内皮細胞や単球への作用の研究が中心であったが、最近では血小板分子へのβ2GPIの作用も注目される。また、APSの病態とは直接無関係であると考えられていた補体系の役割が明らかになってきている。

抗リン脂質抗体症候群の診断のための検査は、複雑で標準化が困難である。国際血栓止血学会の標準化委員会は、ループスアンチコアグラントの検出ガイドラインを出しているが、それが約15年ぶりに改訂され、推奨されるアッセイの組み立てが簡素化、明確化された。

**A. 抗リン脂質抗体の主要な対応抗原：
β2-グリコプロテインI**

1990年代にKoikeら¹⁾はヒトのファクターHのドメイン構造をもとにしたNMR解析によって、β2GPIが環状構造をとっていることを提唱した。一方、1999年にβ2-グリコプロテインIの結晶構造が明らかにされた²⁾。第1～3ドメインは直線状、第4ドメインから第5ドメインにかけては屈曲して釣り針のような形態をし、第5ドメインのなかほどで強く偏移した構造をとっていた。この結晶構造解析以来、NMR解析による環状構造のβ2GPIはほとんど注目されなくなっていた。しかし、aCL/β2GPIがなぜ液相のβ2GPIに結合しないのか、詳細についての報告はなかった。Agarら³⁾は、電子顕微鏡的解析を用いて、β2GPIには2つの形態があることを視覚的に示すことに成功した。すなわち、溶液中のβ2GPIはクローズドフォームといわれる分子が丸くなった構造をしており、細胞表面でリン脂質に結合すると釣り針のようなオープンフォームに変わっていた(図1a)。そして、彼らは溶液のpHを11.0にするとβ2GPIがオープンフォームになり、それを酸性にするとクローズドフォームにもどることを見出した。β2GPIをトリプシン

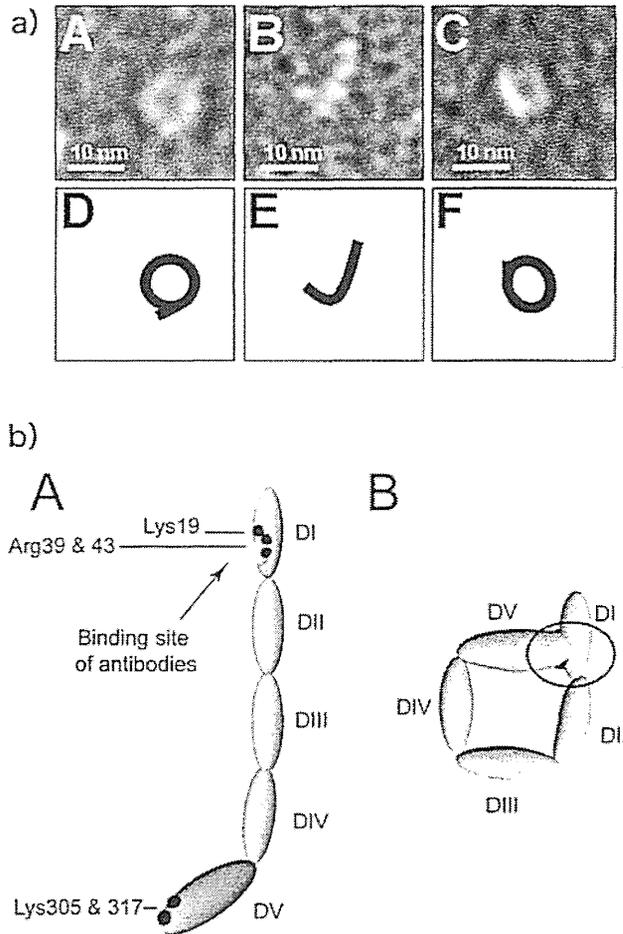


図1 β2-グリコプロテインIの2つのフォーム (文献3より)

- a) 電子顕微鏡イメージとシェーマ
A (D) が通常の血漿中のクローズドフォームで、pH 11.0にするとB (E) のオープンフォームとなり、再度中性にもどすとC (F) のクローズドフォームにもどった。
- b) クローズドフォーム (B) では、第1ドメイン上のエピトープ (A) が第5ドメインに覆われて隠されていた。

で処理してアミノ酸シーケンスを行ったところ、クローズドフォームではドメインIのLys19, Arg39, Arg43およびドメインVのLys305, Lys317が検出されなかった。すなわち、クローズドフォームになったとき、ドメインIとドメインVのこれらのアミノ酸が重なるように結合すると考察した(図1b)。β2GPIはオープンフォームになり、かつダイマーになって初めて抗リン脂

質抗体症候群に関連する β 2GPIの活性（あるいはループスアンチコアグラント活性）が発揮された。この β 2GPIの2種類のフォームの存在が、これまで仮説にすぎなかった「 β 2GPIの構造変化とクリプティックエピトープ」を証明したことになる。

また、最近 β 2GPIの翻訳後修飾が病態にかかわる可能性が報告され、興味深い。Ioannouらは、チオレドキシン1 (TRX-1) という酸化還元酵素が β 2GPI分子内の遊離チオールを産生させ、それが血小板粘着にかかわっていることを報告した。さらに彼らは、TRX-1や他の酸化還元が培養内皮細胞から蛋白ジスルフィドイソメラーゼとともに産生され、それらが β 2GPI分子内チオールを増加させて、内皮細胞の酸化ストレスとそれに

よる細胞死から内皮細胞を防御している可能性をあわせて報告した。aCL/ β 2GPIがこの機構を破壊するなら、APSにみられる内皮細胞障害の新たなメカニズムとして注目される。

β 2GPIの新たな機能として最近注目されるのが、血管新生に対する効果である。 β 2GPIは VEGFと basic fibroblast growth factor (bFGF) による内皮の増殖、遊走、管腔形成を in vitroで抑制した⁴⁾。この抑制作用は β 2GPIのドメインIの欠落では起こらなかった。内皮細胞の VEGFレセプターである KDR/Flk-1の発現を抑制し、その下流のシグナルのリン酸化を抑制することが β 2GPIの血管新生の抑制機序であった。なお、ニック β 2GPI (プラスミン処理による β 2GPIの産物で、リン脂質結合能を欠くため、 β 2GPIと

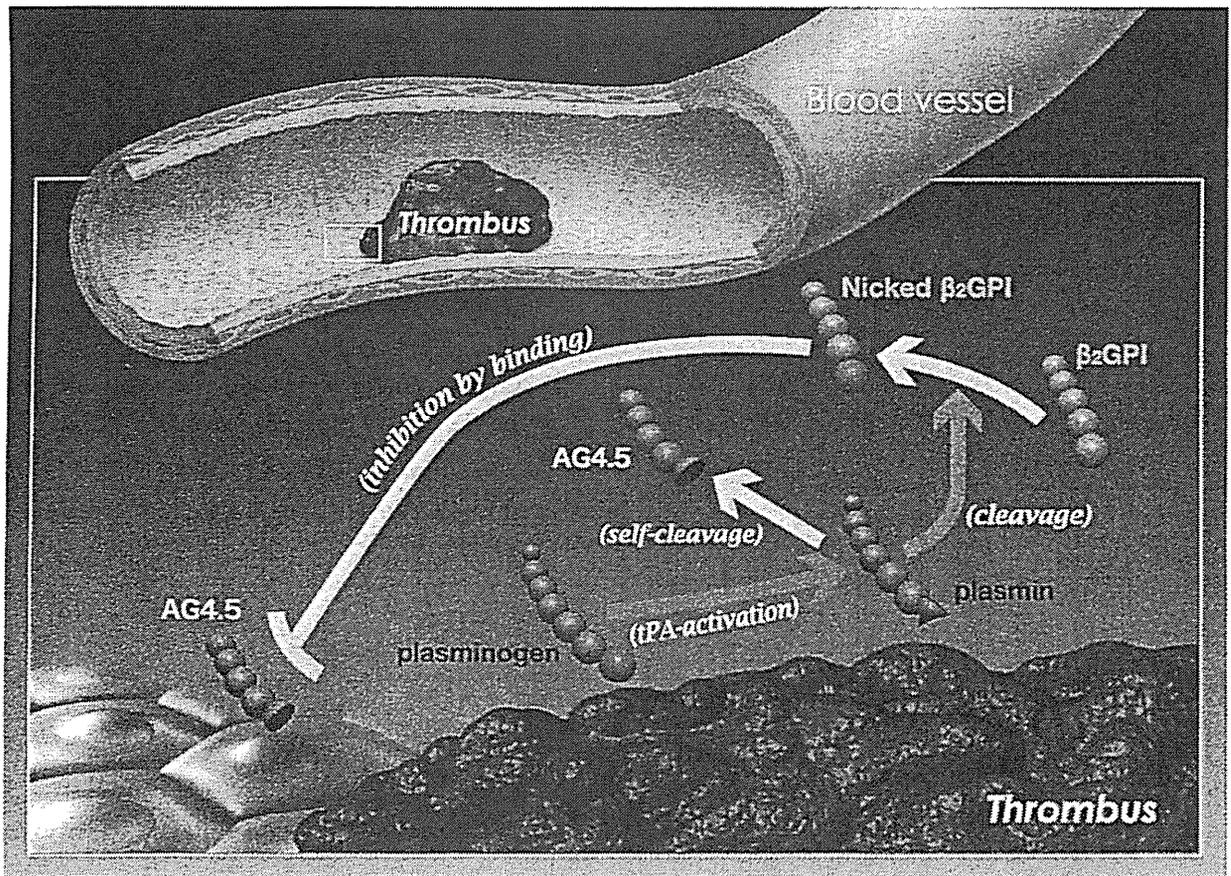


図2 ニック β 2-グリコプロテインIのアンジオスタチン (AG4.5) を介した血管新生の促進作用
血管内で血栓ができたとき、 β 2-グリコプロテインI (β 2GPI) は血栓表面でプラスミンによってニック β 2GPIとなる。ニック β 2GPIはAG4.5に直接結合して、AG4.5の血管新生抑制作用を負に制御する。

はまったく異なる機能をもつ) はまた別の作用をもつ。ニックβ2GPIはプラスミノゲンに結合して線溶反応を抑制し、血管新生を抑制する機能をもつアンジオスタチンはプラスミノゲンと相同性が高い。最近我々は、in vitroおよびin vivoモデルの両方で、ニックβ2GPIがアンジオスタチンを介する血管新生制御機構を負に制御して、結果として血管新生を促進する方向に作用することを見出した⁵⁾ (図2)。一連の現象は、血栓形成とはまた別にAPS患者にみられる虚血性病変の進展の機序に關与する可能性がある。

B. 抗リン脂質抗体とβ2-グリコプロテインIの相互作用

抗リン脂質抗体がβ2GPIなどの対応抗原を介して向血栓細胞に作用し、向血栓分子を誘導することはほぼコンセンサスとなっている。一連の研究は、外因系凝固反応のイニシエータである組織因子を発現する単球や内皮細胞を中心に行われてきた。そして、多くの研究者がβ2GPIの細胞表面レセプターの同定を試みた結果、ここ数年で非常に多くの分子がβ2GPIに対するレセプターの候補としてリストアップされた (表1)⁶⁾。最近われわれ⁷⁾もゲルゾリンを介してインテグリンα5β1が単球表面レセプターとして機能する可能性を示した。それぞれのレセプターに対応するリガンドも多様であり、すなわちマルチリガンド

とマルチレセプターの相互作用の結果として向血栓細胞が活性化されることが考えられ、事態はかなり複雑である。

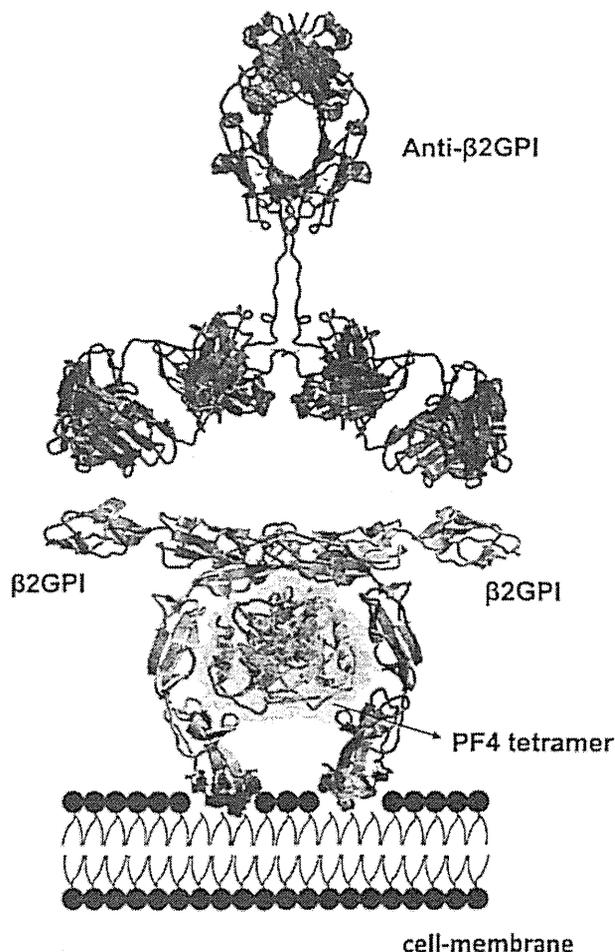


図3 β2-グリコプロテインI依存性抗カルジオリピン抗体 (aCL/β2GPI) と血小板 (文献9より) aCL/β2GPIは血小板表面のPF4テトラマーに結合したβ2GPIダイマーを認識する。

表1 β2-グリコプロテインIの細胞表面レセプター候補

LRP8 (low-density-lipoprotein receptor protein 8) = apolipoprotein E receptor 2
アネクシンA2
グリコプロテインIb α
LRP (low-density-lipoprotein receptor-related protein)
メガリン
Toll様レセプター 4
VLDLレセプター
P-セレクチングリコプロテイン・リガンド1
ゲルゾリン-インテグリンα5β1複合体

最近は血小板に対する β 2GPIやaCL/ β 2GPIの作用も注目される。Sikaraら⁸⁾は β 2GPIと結合する血小板膜蛋白をスクリーニングし、それが血小板第4因子(PF4)であることを同定した。PF4に結合した β 2GPIは抗原性を発揮し、APS患者由来のaCL/ β 2GPIはPF4と β 2GPIの複合体を認識した(図3)。さらにaCL/ β 2GPIは、PF4を介してp38MAPKのリン酸化とTXB2の産生を促した。PF4はヘパリン起因性血小板減少症(HIT)および血栓症(HITT)の対応抗原としてもよく知られている。HITTは日本人にはまれであるが、APSの病態と大変よく類似しており、2つの抗体誘発性血栓性疾患がいずれもPF4を介在していることは興味深い⁹⁾。

C. 抗リン脂質抗体と補体

APS、とくに妊娠合併症の病態に関する新たな知見として、補体の活性化が注目をあびている。ヒトAPS患者血清から精製した抗リン脂質抗体を含むIgG分画をマウスに導入すると不育症となる。このモデルを用いた検討では、補体成分のC5aとC5aレセプターの相互作用を抑制する抗体やペプチドの処理によって不育症が改善する。C5の活性化によってTNF α が誘導され、抗TNF α 抗体の処理で妊娠合併症が部分的に回避された¹⁰⁾。したがって、TNF α は少なくとも一部はAPSの妊娠合併症のエフェクターとして作用する可能性がある。このモデルではヘパリンがin vivoで補体活性化を抑制することが示され、ヘパリンがAPSの妊娠合併症に有効な理由はヘパリンの抗凝固作用にとどまらないかもしれない¹¹⁾。Thurmanら¹²⁾は、補体活性化の第二経路を特異的に抑制するファクターBに対する抗体がAPSの不育症モデルに治療効果があることを示し、APS不育症における補体第二経路の重要性を確認した。なお、APSに限らず低補体血症が流死

産と相関することは臨床的にも確かめられ¹³⁾、補体活性化は妊娠予後と直接関連する可能性がある。

APSの血栓症と補体の関連については報告が限られているが、C3欠損およびC5欠損マウスでは抗リン脂質抗体を注入されても血栓傾向にならなかったことが示されている¹⁴⁾。

これらの研究はいずれも動物実験の結果であった。最近我々¹⁵⁾は、APS患者における補体活性化のプロフィールを明らかにした。SLEを合併しない、すなわち原発性APS患者で血清補体価を測定したところ、健常人や非SLEのリウマチ性疾患コントロールに比べて、明らかに低かった。実際、低C3血症は原発性APS患者の69%、低CH50血症は47%にみられた。低補体血症の原因は、C3、C4の分解産物であるアナフィラトキシン(それぞれC3a、C4a)のレベルが低補体血症を認める原発性APS患者で高かったことから、補体の産生障害ではなく補体活性化によって消費されている結果であることがわかった。補体活性化制御蛋白であるファクターHやファクターIの低下は原発性APS患者ではみられず、また原発性APS患者血清の約70%に免疫複合体が検出されたことから、免疫複合体の過形成が補体活性化の直接の原因である可能性が示唆された。原発性APSでは血清補体価が抗凝固活性(すなわちLA活性)と相関していることから、その免疫複合体は抗リン脂質抗体と対応抗原からなる可能性がある。さらに低補体血症を認める原発性APS患者では血清TNF α のレベルがやや亢進していたことから、補体活性化は向血栓細胞である単球の活性化と関連していることが推定された。

補体の活性化とは、すなわち炎症病態である。APSはこれまで「非炎症性の」血栓傾向であることが疾患の特徴であると考えられてきたが、我々の検討は、動物実験のこれまでの蓄積と併せて考えると、免疫と血栓のクロスロードを仲介する1

つの現象として、補体活性化を伴う炎症機転が重要であることを示唆するものである。

D. 抗リン脂質抗体の臨床検査としての 進歩

2007年の国際血栓止血学会標準化委員会で最

初にPengoら¹⁶⁾によって提唱されたループスアンチコアグラント検出ガイドラインの改訂案が、J Thromb Haemostに掲載された。エビデンスに基づくものではないが、エキスパートオピニオンとしては承認されたものとみなされている。まず、このガイドラインでは、どのような患者にループスアンチコアグラントを検査すべきかが記載さ

表2 ループスアンチコアグラント改訂ガイドライン (文献16より)

-
- (A) 血漿サンプル
1. 抗凝固療法をする前、もしくは中止後に採血を行う
 2. 静脈血を1:9の割合で0.109Mクエン酸採血する
 3. 二重遠心を行う
 4. 血漿サンプルを保存するときは急速冷凍する
 5. 凍結サンプルを解凍するときは、37°Cで行う
- (B) 凝固時間検査の選択
1. 2種類の原理の異なる検査を組み合わせる
 2. 希釈ラッセル蛇毒凝固時間 (dRVVT) が第一選択検査
 3. 活性化部分トロンボプラスチン時間 (aPTT) が第二選択検査、ただしリン脂質濃度が低く、かつシリカを活性化剤として使用する試薬を使用する
 4. 2つのうちどちらかが延長していれば次のステップへ
 5. カットオフ値は、それぞれの施設で設定する (40人の健常人の99%タイル法を使用する)
- (C) ミキシングテスト
1. プール正常血漿をそれぞれの施設で用意するか、あるいは市販の正常血漿 (正しく用意されたもの) も使用可である
 2. 患者血漿と正常血漿の混和は1:1とし、凝固時間測定前のインキュベーションは不要で、30分以内にアッセイを行う (ただし、INRが1.5以上の場合、抗凝固療法を弱めて1.5以内にしてからミキシングテストを行うか、または患者血漿:正常血漿の比を1:2にしてミキシングテストを行うことをすすめる)
 3. トロンビン時間が延長している場合は判定できない
 4. カットオフ値は40人の健常人の99%タイル法を用いた上限を使用する。もしくは、ループスアンチコアグラント・インデックス (ICA) を用いる [ICA = $(b-c)/a \times 100$: a, b, cは、その順に患者血漿、混和血漿、正常血漿の凝固時間]
- (D) 確認テスト
1. 確認テストは、スクリーニングテストのリン脂質濃度を高めて行う
 2. 2層またはヘキサゴナル (II) フェーズのリン脂質を使用する
 3. カットオフ値はそれぞれの施設できめられ、その計算は [スクリーニング凝固時間-確認試験凝固時間] $\times 100$ を使用する。ループスアンチコアグラント血漿はリン脂質濃度を高めても凝固時間が正常範囲まで縮まらない可能性があるため、正常コントロール血漿にこの確認試験を行って正常値を設定すべきである
- (E) 結果の表現方法
1. ループスアンチコアグラントの結果は、スクリーニング、ミキシング、確認試験いずれも正常血漿との比で表されるべきである
- (F) 結果の報告方法
1. ループスアンチコアグラントの報告には、なぜそのような判定になったのかの説明が加えられるべきである
-

れた。はじめに、APSの存在を疑う場合にのみループスアンチコアグラントは検査すべきである、とした。抗リン脂質抗体症候群疑いのレベルを、低（高齢者の血栓症）、中（偶然みつかった凝固時間延長、早期の流産、他に原因の考えられる若年者の静脈血栓症）、高（50歳以下の血栓症、通常でない部位の血栓症、中後期の流産、全身性エリテマトーデス・関節リウマチ・自己免疫性血小板減少症・自己免疫性溶血性貧血のある場合）と分類して、その必要度を考えてから検査をするよう勧告した。そして、12週の間隔をおいて再検することをすすめた（抗リン脂質抗体症候群のサッポロクライテリア・シドニー改変に準ずる）。

実際の検査のステップを表2にまとめた。まず、ヘパリンの使用下ではループスアンチコアグラントの検査は成立しないので、ヘパリンを使用しなくなってもよくなってから検査を行うこととした。低分子ヘパリン使用下では可能かもしれないが、報告がほとんどないのでガイドラインへの記載は適さないとした。経口抗凝固薬使用中の患者については、表2に記載したとおりである。そのほか、第Xa因子阻害薬、抗血小板薬の関与は、現時点では不明である。ヒドロキシクロロキンは弱く干渉する可能性がある。検査の結果を臨床にフィードバックするときは、陽性または陰性で表現することとした。ボーダーラインや疑いは避けるべきとした。

文献

- 1) Koike T, Ichikawa K, Kasahara H, et al. Epitopes on beta2-GPI recognized by anticardiolipin antibodies. *Lupus*. 1998; 7 (Suppl 2): S14-7.
- 2) Schwarzenbacher R, Zeth K, Diederichs K, et al. Crystal structure of human beta2-glycoprotein I: implications for phospholipid binding and the antiphospholipid syndrome. *EMBO J*. 1999; 18(22): 6228-39.
- 3) Agar C, van Os GM, Morgelin M, et al. (beta)2-Glycoprotein I can exist in two conformations: implications for our understanding of the antiphospholipid syndrome. *Blood* (in press).
- 4) Yu P, Passam FH, Yu DM, et al. Beta2-glycoprotein I inhibits vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor induced angiogenesis through its amino terminal domain. *J Thromb Haemost*. 2008; 6(7): 1215-23.
- 5) Nakagawa H, Yasuda S, Matsuura E, et al. Nicked (beta)2-glycoprotein I binds angiostatin 4.5 (plasminogen kringle 1-5) and attenuates its antiangiogenic property. *Blood*. 2009; 114(12): 2553-9.
- 6) de Groot PG, Derksen RH, Urbanus RT. The role of LRP8 (ApoER2) in the pathophysiology of the antiphospholipid syndrome. *Lupus*. 2010; 19(4): 389-93.
- 7) Bohgaki M, Matsumoto M, Atsumi T, et al. Plasma gelsolin facilitates interaction between beta (2) glycoprotein I and alpha 5 beta1 integrin. *J Cell Mol Med* (in press).
- 8) Sikara MP, Routsias JG, Samiotaki M, et al. (beta)2 Glycoprotein I ((beta)2GPI) binds platelet factor 4 (PF4): implications for the pathogenesis of antiphospholipid syndrome. *Blood*. 2010; 115(3): 713-23.
- 9) Vlachoyiannopoulos PG, Routsias JG. A novel mechanism of thrombosis in antiphospholipid antibody syndrome. *J Autoimmun*. 2010 (in press).
- 10) Berman J, Girardi G, Salmon JE. TNF-alpha is a critical effector and a target for therapy in antiphospholipid antibody-induced pregnancy loss. *J Immunol*. 2005; 174(1): 485-90.
- 11) Salmon JE, Girardi G, Lockshin MD. The antiphospholipid syndrome as a disorder initiated by inflammation: implications for the therapy of pregnant patients. *Nat Clin Pract Rheumatol*. 2007; 3(3): 140-7.
- 12) Thurman JM, Kraus DM, Girardi G, et al. A novel inhibitor of the alternative complement pathway prevents antiphospholipid antibody-induced pregnancy loss in mice. *Mol Immunol*. 2005; 42(1): 87-97.
- 13) Sugiura-Ogasawara M, Nozawa K, Nakanishi T, et al. Complement as a predictor of further miscarriage in couples with recurrent mis-

- carriages. *Hum Reprod.* 2006; 21(10): 2711-4.
- 14) Pierangeli SS, Girardi G, Vega-Ostertag M, et al. Requirement of activation of complement C3 and C5 for antiphospholipid antibody-mediated thrombophilia. *Arthritis Rheum.* 2005; 52(7): 2120-4.
- 15) Oku K, Atsumi T, Bohgaki M, et al. Complement activation in patients with primary antiphospholipid syndrome. *Ann Rheum Dis.* 2009; 68(6): 1030-5.
- 16) Pengo V, Tripodi A, Reber G, et al. Update of the guidelines for lupus anticoagulant detection. *J Thromb Haemost.* 2009; 7(10): 1737-40.

8. 抗リン脂質抗体症候群

1 抗リン脂質抗体症候群とは

抗リン脂質抗体症候群 (APS : antiphospholipid syndrome) の概念は、自己免疫血栓症および自己免疫妊娠合併症であり、抗リン脂質抗体が存在する患者に血栓症や妊娠合併症が起これば APS と定義する。APS では下肢深部静脈血栓症が多く、しばしば肺塞栓を合併する。さらに特徴的な点は、APS では静脈のみならず動脈に血栓を起こすことである。しかも脳梗塞、一過性脳虚血発作などの脳血管障害が圧倒的に多く、虚血性心疾患が少ない。妊娠合併症には、妊娠高血圧症と不育症・流産がある。

2 抗リン脂質抗体の検出方法と臨床的意義

抗リン脂質抗体測定 of 臨床的意義は、APS あるいは抗リン脂質抗体関連疾患を診断することである。APS と診断するためには、抗リン脂質抗体の証明が必須である (表 1)¹⁾。しかし抗リン脂質抗体のもつ多様性のため、しばしばその判断は容易ではない。

1. 抗カルジオリピン抗体と抗 β_2 グリコプロテイン I 抗体

一連の抗リン脂質抗体の測定法のなかで、抗カルジオリピン抗体 (aCL) は最も早くに確立された免疫学的な抗リン脂質抗体の検出法である。当初はリン脂質であるカルジオリピンが aCL の直接の対応抗原と考えられていたが、現在で

表1 抗リン脂質抗体症候群診断基準案(サッポロ基準のシドニー改変(2006年))

臨床所見
1. 血栓症 画像診断, ドプラ検査または病理学的に確認されたもので, 血管炎による閉塞を除く 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, または b. 妊娠中毒症, 子癇または胎盤機能不全による妊娠 34 週以前の形態学的異常のない胎児の 1 回以上の早産, または c. 妊娠 10 週以前の 3 回以上続けての形態学的, 内分泌学的および染色体異常のない流産
検査基準
1. 標準化された ELISA 法による IgG または IgM 型抗カルジオリピン抗体(中等度以上の力価または健常人の 99%-tile 以上) 2. IgG または IgM 型抗 β_2 グリコプロテイン I 抗体陽性(健常人の 99%-tile 以上) 3. 国際血栓止血学会のループスアンチコアグラントガイドラインに沿った測定法で, ループスアンチコアグラントが陽性

臨床所見の 1 項目以上が存在し, かつ検査項目のうち 1 項目以上が 12 週の間隔をあけて 2 回以上証明される時, 抗リン脂質抗体症候群と分類する。(文献 1 より引用)

は APS と関連した aCL と, 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 [systemic lupus erythematosus : 全身性エリテマトーデス] やシェーグレン症候群) や感染症患者にみられる非特異的な aCL は, 真の対応抗原の違いにより区別され得ることがわかっている。すなわち, APS 患者に検出される aCL はカルジオリピンと β_2 グリコプロテイン I (β_2 GPI) との複合体に結合しており, しかもその結合エピトープは β_2 GPI の分子上に存在する。したがって APS に特異性の高い aCL は, 「 β_2 GPI 依存性 aCL」とよばれるアッセイで検出される抗体である。この ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay : 酵素免疫測定法) では β_2 GPI の存在下および非存在下で同時に aCL の測定を行い, 前者の力価が基準値を超え, かつ β_2 GPI の存在下での aCL の力価が非存在下での力価よりも高いものを陽性とする。 β_2 GPI 依存性と非依存性の aCL が混在している場合があり, また非依存性 aCL が ELISA プ

レート底に β_2 GPI が結合していないフリーのカルジオリピンに結合している場合があるので、 β_2 GPI の存在下での aCL 力価と非存在でのそれとを比較して判定する。

抗 β_2 GPI 抗体は直接 β_2 GPI を ELISA プレートに固相化して行うアッセイであり、基本的には β_2 GPI 依存性 aCL と同じ抗体を検出する。わが国では行われていない検査であるが、海外では複数のキットが発売されている。APS 分類基準に記載されているため、今後はわが国にも導入される可能性がある。

2. ループスアンチコアグラント

ループスアンチコアグラント (LA) は、*in vitro* のリン脂質依存性凝固反応を阻害する免疫グロブリンと定義される。これらの凝固反応自体は簡易な検査であるが、臨床検査上の LA の同定はその多様性から必ずしも容易でない。また、使用する試薬によって感度がかなり異なっているが、それは主に凝固試薬に含まれるリン脂質濃度に依存する。2009 年、国際血栓止血学会の抗リン脂質抗体標準化委員会が LA 検査のガイドラインを改訂した²⁾。すなわち、① 希釈ラッセル蛇毒時間 (dRVVT) または活性化部分トロンボプラスチン時間 (APTT) 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 ミキシングテスト (患者血漿サンプルと正常血漿の比が 1 : 1, ワルファリン使用中は 1 : 2) でこの凝固時間延長が患者血漿中にインヒビターが存在するためであることを示す、③ リン脂質による吸収中和試験でこのインヒビターが抗リン脂質抗体であることを確証、④ 特定の凝固因子に対するインヒビターを除外する、のステップである。

日常臨床では、はじめに APTT でスクリーニングし (ただし、試薬によって LA の感度が異なるので注意)、延長がみられた場合に確認試験へすすむ。わが国では、2 種類の LA 確認検査が保険診療で可能である。なお、凝固時間の延長がなければ LA は陰性なので、確認試験を行う必要はない。

3. ホスファチジルセリン依存性抗プロトロンビン抗体

LAには少なくとも2つのサブタイプがあり、 β_2 GPI依存性LAおよびプロトロンビン依存性LAとよばれる。前者はaCLに該当するが、後者は抗プロトロンビン抗体である。ホスファチジルセリンを固相化、プロトロンビンを吸着して抗原としたものを用いてELISAを行うと(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)、APSの臨床症状やLAの存在と非常に強い相関があることが示された³⁾。LA陽性者の半数はaPS/PTが陽性であり、逆にaPS/PT陽性者は9割以上がLA陽性であった。すなわち、aPS/PTはLAあるいはAPSの新しいマーカーである。とりわけLAの補助診断としての意義は高いことがわかる⁴⁾。LAの判断は、典型的なパターンをとるものは別にして、通常は容易とはいえない。また、良質な血漿サンプルがないと信頼できる結果が得られない。aPS/PTが陽性なら高い確率でLA陽性であるといえるので、ワルファリンやヘパリンなどの抗凝固療法を施行中でLAアッセイに向かない患者の場合、あるいは何らかの理由により血漿サンプルが得られないときなどにはaPS/PTアッセイの価値は高い。

3 抗リン脂質抗体症候群の病態

抗リン脂質抗体は、リン脂質結合蛋白を介して血小板や内皮細胞を刺激して活性化する。抗 β_2 GPI抗体は β_2 GPIの存在下で向血栓内皮細胞(血小板、内皮細胞や単球)へ結合し、内皮細胞を活性化あるいは障害をもたらす。そして、活性化した細胞は、たとえば外因系凝固反応のトリガーである組織因子を発現する。その細胞活性化のシグナル伝達の経路も明らかとなっている⁵⁾。 β_2 GPIはいわばアンカーとして存在しており、この機序説明においてはAPSの発症に β_2 GPI自体の機能はあまり重要でないことになる。 β_2 GPIが結合するリン脂質は主にホスファチジルセリンで、通常の状態では細胞表面には出ていない。何かの刺激でホスファチジルセリンが内皮表面に出たときに、一連の反応が起こると考えられる。

APSの病態に関する新たな知見として、補体の活性化が注目をあびている⁶⁾。最近我々⁷⁾は、APS患者における補体活性化のプロフィールを明らかにした。SLEを合併しない、すなわち原発性APS患者で血清補体価を測定したところ、健常人や非SLEのリウマチ性疾患コントロールに比べて、明らかに低かった。低補体血症の原因は、C3、C4の分解産物であるアナフィラトキシン(それぞれC3a、C4a)のレベルが低補体血症を認める原発性APS患者で高かったことから、補体の産生障害ではなく補体活性化によって消費されている結果であることがわかった。補体の活性化とは、すなわち炎症病態である。APSはこれまで「非炎症性の」血栓傾向であることが疾患の特徴であると考えられてきたが、我々の検討は、動物実験のこれまでの蓄積と併せて考えると、免疫と血栓のクロスロードを仲介する1つの現象として、補体活性化を伴う炎症機転が重要であることを示唆するものである。

4 治療の指針

APSの基本は、自己抗体と関連する血栓傾向や妊娠合併症の疾患である。ある意味では臓器特異的自己免疫疾患であり、ステロイドや免疫抑制薬は、集中治療が必要な劇症型APSなど特殊な病態を除いて、通常のAPSの治療の原則にならない。実際、レトロスペクティブ解析では免疫抑制療法で抗体価の抑制は必ずしも得られず、血栓再発予防にも効果はなかった⁸⁾。

肺血栓塞栓症を含めて急性期の動・静脈血栓症に対しては、線溶療法やヘパリン療法など一般の救急処置が行われる。APSに特別な治療法はない。急性発症の深部静脈血栓症に対して、下大静脈に不安定な血栓が存在する場合、出血のリスクがあって十分な抗凝固療法ができない場合、抗凝固療法を行っても血栓の進展が制御できない場合、心不全合併例や循環動態が不安定で小肺塞栓の続発が致命的になる場合などには、大静脈内フィルター留置の適応を考えることも通常の急性深部静脈血栓症と同じである。

再発予防がAPSの治療で最も重要である。血栓の再発は、抗リン脂質抗体が

陽性患者と陰性患者では前者のほうが高いことが知られている^{9, 10)}。深部静脈血栓症を発症した場合、抗リン脂質抗体陰性患者では抗凝固療法は通常3～6カ月継続のあと終了となるが、APSと診断された場合は長期の抗凝固療法が必要である。興味深いことは、動脈血栓で発症したAPS患者は90%が動脈血栓を再発し、静脈血栓で発症すれば70%は再発も静脈血栓である。

後述するエビデンスは、もっぱらワルファリンによるものである。しかし筆者は、病態の異なる動脈血栓と静脈血栓とを同一群にしてマネージメントを論ずることに矛盾があると考えている。それぞれの報告の結果からも、APSの凝固異常に由来する静脈血栓症の患者に対しては、他の血栓傾向患者と同様にINR (international normalized ratio: 国際標準化) 約2.0を目標としたワルファリン投与で十分であろう。

処方例 (静脈血栓で発症した場合)

ワルファリン 1～7 mg/分1 (INR 2.0～2.5 目標)

ワルファリン (ワルファリン)

一方、動脈血栓は動脈硬化やスパズムのような血管壁の変化によるずり応力によって血小板が粘着、凝集、活性化するところに発症のきっかけがある。動脈血栓症の患者に対しては、わが国の「脳卒中治療ガイドライン」に準じてワルファリンよりもむしろ抗血小板薬を積極的に使用すべきと考えている。当科 (北海道大学病院第二内科) ではワルファリンは動・静脈両者に血栓がある場合、弁膜症を合併している場合、あるいはトロンビン生成 / 線溶活性化のマーカー (TAT [トロンビン- アンチトロンビン複合体], PIC [プラスミン- α_2 プラスミンインヒビター複合体], Dダイマー, プロトロンビンフラグメント F1 + 2 など) の平常時での上昇があれば併用している。

処方例（動脈血栓で発症した場合）

下記のいずれか、もしくは①+②または①+③の併用

- ① バイアスピリン® (100 mg) 1錠 / 分 1
- ② プレタール® (100 mg) 2錠 / 分 2
- ③ プラビックス® (75 mg) 1錠 / 分 1

バイアスピリン®(アスピリン), プレタール®(シロスタゾール),
プラビックス®(クロピドグレル)

これらの方針を案として表2にまとめた。

表2 抗リン脂質抗体症候群における血栓の二次予防案

静脈血栓症で発症した場合
<ul style="list-style-type: none">・ワルファリン(ワーファリン)が第一選択 (INR 2.0 ~ 2.5, Dダイマー陰性目標)・少量アスピリン(バイアスピリン® 100 mg 1錠 / 日)の併用
動脈血栓症で発症した場合
<ul style="list-style-type: none">・少量アスピリン(バイアスピリン® 100 mg 1錠 / 日)または / かつ・抗血小板薬の併用: シロスタゾール(プレタール®) 200 mg / 日, クロピドグレル(プラビックス®) 50 ~ 75 mg / 日のいずれか・症例により*ワルファリン(ワーファリン)の併用 (INR 2.0 ~ 2.5, Dダイマー陰性目標)

*動静脈両者の血栓症の場合, 抗血小板薬のみで再発した場合, トロンビン生成マーカーが高値の場合など (筆者作成)

5 EBM のデータ

ワルファリンがAPSの治療薬として標準薬となったのは、1995年のKhamashtaら⁸⁾の報告による。彼らはAPSの診断で治療観察されていた147例をレトロスペクティブに解析した。そのうち111例(69%)に合計186回の血栓の再発がみられた。すなわち、治療にかかわらず平均2.3回の血栓を起こしたことになる。再発までの平均期間は約12カ月であった。再発予防にはワルファリ

ンによる抗凝固療法がアスピリンに比して有効であり、静脈血栓の再発は INR 2.0 で、動脈血栓の再発は INR 3.0 のレベルで有意に予防できていた。この報告以来、高強度のワルファリン投与が APS の血栓二次予防として適切かどうか議論されてきた。

高強度の抗凝固療法を推奨する Ruiz-Irastorza ら¹¹⁾は、INR 3.5 を目標に抗凝固療法を行っている APS 患者 66 人のレトロスペクティブ解析を行った。この患者群では血栓再発は毎年 9% であり、いずれも血栓発症時は INR が 2.1 ~ 2.6 に落ちた時であった。一方、出血性合併症は毎年 6% にみられ、特に頭蓋内出血は毎年 1.5% の頻度であったと報告した。このような高頻度の重篤な出血性合併症のリスクを負ってまで、高強度の抗凝固療法の維持が必要なのだろうか？

APS 患者 114 人の抗凝固療法の強度の意義を検討する二重盲検試験が、カナダで行われた¹²⁾。この試験では、血栓を起こした APS 患者を INR 2.0 ~ 3.0 目標群と 3.1 ~ 4.0 目標群間に分けて、平均 2.7 年観察し、血栓の再発をエンドポイントとした。INR は主治医にブラインドとされ、すなわち主治医は血液の検体を試験センターに送付して、INR の結果の報告を受けないままワルファリンの投与量の調整をセンターから指示されて試験が行われた。その結果、INR 2.0 ~ 3.0 群で血栓再発率が 3.4%、出血性合併症が 6.9% であり、INR 3.1 ~ 4.0 群で血栓再発 10.7%、出血性合併症 5.4% であった。すなわち、高強度の抗凝固療法の優位性は証明されなかった。このスタディに対する批判は、参加した患者は動脈血栓より静脈血栓が多かったこと(後者が 76%)、そして INR 3.1 ~ 4.0 群の血栓の再発はほとんどが INR 3.0 以下になってしまった時に起きていることがある。

6 治療上の注意点

抗凝固薬、抗血小板薬とも、注意点は一般の血栓症に対する投与の場合と同様である。再発が多いことから、抗血栓療法は長期におよぶので、血栓傾向および出血傾向のモニターのための問診や Dダイマーなどの定期検査は欠かせない。