



Title	抗リン脂質抗体症候群の治療と病態機序に関する研究
Author(s)	佐藤, 太貴
Description	配架番号 : 2693
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第14951号
Issue Date	2022-03-24
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k14951
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/85892
Type	doctoral thesis
File Information	SATO_Taiki.pdf



学位論文

抗リン脂質抗体症候群の治療と病態機序 に関する研究

**(Treatment and pathophysiology in antiphospholipid
syndrome)**

2022年3月

北海道大学

佐藤 太貴

Sato Taiki

学位論文

抗リン脂質抗体症候群の治療と病態機序 に関する研究

**(Treatment and pathophysiology in antiphospholipid
syndrome)**

2022年3月

北海道大学

佐藤 太貴

Sato Taiki

目次

発表論文目録および学会発表目録	1
1. 要旨	3
2. 略語表	6
3. 緒言	8
3.1 抗リン脂質抗体症候群	8
3.2 aPL と APS における血栓リスクの層別化	11
3.3 APS における末梢血リンパ球サブセットと抗体産生機序	13
3.4 APS の治療	14
3.5 直接作用型経口抗凝固薬 (Direct oral anticoagulant: DOAC)	15
4. 第一章 抗リン脂質抗体症候群における第 Xa 因子阻害薬の有効性と安全性の 検討	17
4.1 背景	18
4.2 目的	21
4.3 方法	22
4.4 結果	29
4.5 考察	39
4.6 結語	41
5. 第二章 IgM 型抗リン脂質抗体の長期持続陽性と血栓リスクについて	42
5.1 背景	43
5.2 目的	44
5.3 方法	45
5.4 結果	55
5.5 考察	68
5.6 結語	70
6. 総括	71
7. 謝辞	73
8. 利益相反	74

9. 引用文献.....	75
--------------	----

発表論文目録および学会発表目録

本研究の一部は下記の論文として投稿した.

1. Taiki Sato, Hiroyuki Nakamura, Yuichiro Fujieda, Naoki Ohnishi, Nobuya Abe, Michihito Kono, Masaru Kato, Kenji Oku, Toshiyuki Bohgaki, Olga Amengual, Shinsuke Yasuda, Tatsuya Atsumi. Factor Xa inhibitors for preventing recurrent thrombosis in patients with antiphospholipid syndrome: a longitudinal cohort study. *Lupus* 2019 Nov;28(13):1577-1582

本研究の一部は下記の学会で発表した.

1. 佐藤 太貴, 藤枝 雄一郎, 中村 浩之, 大西 直樹, 麻生 邦之, 蜷川 慶太, 阿部 靖矢, 河野 通仁, 加藤 将, 奥 健志, 坊垣 暁之, アメングアル オルガ, 保田 晋助, 渥美 達也. 抗リン脂質抗体症候群患者における直接作用型経口抗凝固薬の有効性と安全性の検討. 第46回日本臨床免疫学会総会, 2018年11月8-10日, 長野.
2. Taiki Sato, Yuichiro Fujieda, Hiroyuki Nakamura, Naoki Ohnishi, Nobuya Abe, Michihito Kono, Masaru Kato, Kenji Oku, Toshiyuki Bohgaki, Olga Amengual, Shinsuke Yasuda, Tatsuya Atsumi. Factor Xa inhibitors for preventing recurrent thrombosis in patients with antiphospholipid syndrome: A longitudinal cohort study with propensity score-based analysis. 第63回日本リウマチ学会総会・学術集会, 2019年4月15-17日, 京都.
3. 佐藤 太貴, 藤枝 雄一郎, 中村 浩之, 大西 直樹, 麻生 邦之, 蜷川 慶太, 阿部 靖矢, 河野 通仁, 加藤 将, 奥 健志, 坊垣 暁之, アメングアル オルガ, 保田 晋助, 渥美 達也. 抗リン脂質抗体症候群患者における第Xa因子阻害薬の有効性と安全性の検討. 第41回日本血栓止血学会学術総会, 2019年6月20-22日, 三重
4. Taiki Sato, Olga Amengual, Yuichiro Fujieda, Hiroyuki Nakamura, Naoki Ohnishi, Nobuya Abe, Michihito Kono, Masaru Kato, Kenji Oku, Toshiyuki Bohgaki, Shinsuke Yasuda, Tatsuya Atsumi. IgM antiphospholipid antibodies: long term

follow-up and thrombotic risk. The XXVII Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis, Melbourne, Australia, 6-10 Jul. 2019.

5. Taiki Sato, Yuichiro Fujieda, Hiroyuki Nakamura, Naoki Ohnishi, Nobuya Abe, Michihito Kono, Masaru Kato, Kenji Oku, Toshiyuki Bohgaki, Olga Amengual, Shinsuke Yasuda, Tatsuya Atsumi. Longitudinal efficacy and safety of direct factor Xa inhibitors in patients with antiphospholipid syndrome. 16th International Congress on Antiphospholipid Antibodies, Manchester, UK, 17-20 Sep. 2019.

6. Taiki Sato, Olga Amengual, Yuichiro Fujieda, Hiroyuki Nakamura, Naoki Ohnishi, Nobuya Abe, Michihito Kono, Masaru Kato, Kenji Oku, Toshiyuki Bohgaki, Shinsuke Yasuda, Tatsuya Atsumi. Long-term persistence of IgM antiphospholipid antibodies and thrombotic risk. 第 64 回日本リウマチ学会総会・学術集会, 2020 年 8 月 17 日-9 月 15 日, WEB 開催.

1. 要旨

膠原病は自己免疫機能の異常により種々の臓器に障害を呈する全身性自己免疫疾患の総称である。その中でも抗リン脂質抗体症候群 (Antiphospholipid syndrome: APS) は、抗リン脂質抗体 (antiphospholipid antibody: aPL) に関連した自己免疫血栓症および妊娠合併症と定義される。APS はその希少性から信頼性の高い臨床・基礎データが少ないのが現状であり、病態機序は依然として不明な点が多く、治療についてもさらなる検証の余地がある。本研究では APS の治療法の検証と病態機序の解明を目的とし、二つの臨床研究を行った。第一章では第 Xa 因子阻害薬の APS における血栓再発予防に対する有効性と安全性について検証した。第二章では IgM 型 aPL の長期持続陽性がどのような病態的意義を持つのかについて研究した。

<第一章>

【背景と目的】APS は動静脈血栓症や妊娠合併症を主要徴候とし、aPL の出現を特徴とする難治性の自己免疫疾患である。血栓二次予防治療の gold standard はワルファリンであるが、ワルファリンによる二次予防下でも年に 11% の血栓症再発が認められる。またワルファリン内服中は PT-INR を至適域に調整する必要があり、薬剤間の相互作用や納豆などのビタミン K 含有食材の影響を考慮する必要がある。そのような背景の中、APS に対する直接作用型経口抗凝固薬 (Direct oral anticoagulant: DOAC) の有効性の検証が望まれている。本研究の目的は、DOAC の一種である第 Xa 因子阻害薬の APS に対する有効性と安全性を、明らかにすることである。

【対象と方法】1990 年 4 月から 2018 年 6 月の期間に当院で加療を受けた APS 患者を対象とし、後ろ向きコホート研究を行った。第 Xa 因子阻害薬で加療歴のある患者を抽出し、同一患者のワルファリン治療期間と比較した。またワルファリンで加療された患者のうち、年齢、性別、SLE 合併の有無、抗血小板薬併用の有無をマッチさせて対照群を抽出した。対照群との比較において、交絡因子の調整には傾向スコアを用いて Cox 比例ハザードモデルで解析した。エンドポイントは 5 年間のイベントフリー生存期間とし、イベントは動静脈血栓症再発、入院加療または輸血を要する重篤出血と定義した。

【結果】APS 患者総数は 206 人でそのうち 18 人に第 Xa 因子阻害薬の加療歴が

あった (リバーロキサバン 5 人, エドキサバン 12 人, アピキサバン 1 人). 18 人のうち 14 人は, ワルファリンから第 Xa 因子阻害薬に切り替えていた. 第 Xa 因子阻害薬治療期間のイベントフリー生存期間はワルファリン治療期間と比べて有意に短かった (ハザード比: 12.1, 95%信頼区間: 1.73-248, $p=0.01$). また第 Xa 因子阻害薬で加療された患者のイベントフリー生存期間は対照群と比べて有意に短かった (ハザード比: 4.62, 95%信頼区間: 1.54-13.6, $p=0.0075$). 交絡因子を傾向スコアで調整後も, 第 Xa 因子阻害薬で加療された患者のイベントフリー生存期間は依然として有意に短かった (ハザード比: 11.9, 95%信頼区間: 2.93-56.0, $p=0.00057$).

【考察】 APS 患者のうち血栓症のリスクがより高いと考えられる症例では, 単一の凝固因子を阻害する第 Xa 因子阻害薬よりも, 複数の凝固因子を阻害し効果を発揮するワルファリンが, より強固に凝固カスケードを抑制し, 血栓形成を抑える可能性がある. また興味深いことに, 既報や本研究において第 Xa 因子阻害薬での血栓症再発例は動脈血栓症が多い. マウスモデルにおいて, ダビガトランが血小板凝集を介して動脈血栓症形成を促進させるとされており, DOAC とワルファリンでは血小板活性化に対する作用に違いがあり, それが動脈血栓症の生じやすさに違いをもたらしているのかもしれない.

【結論】 APS 患者に対して第 Xa 因子阻害薬は推奨されない可能性がある.

<第二章>

【背景と目的】 APS において aPL は血栓症におけるリスクファクターと認識されている. APS の分類基準においては IgG 型のみならず IgM 型の aPL も含まれているが, IgM 型 aPL を測定する意義については未だ議論されている. 多くの研究で IgM 型 aPL の意義が検証されているが, ほとんどがある一点での測定値のみを用いており, 抗体価の変動による影響や陰性化することの臨床的意義は十分に検討されていない. 本研究は APS 患者において IgM 型 aPL が陽性の患者を後方視的に検証し, IgM 型 aPL の長期持続陽性と血栓との関係を明らかにすることを目的とした.

【対象と方法】 2003 年から 2018 年の間に当科で APS と診断された患者において測定された aPL を用いて検証した. aPL は抗カルジオリピン抗体 (aCL), 抗 β_2 GPI 抗体 ($a\beta_2$ GPI), 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), ループスアンチコアグラントを測定した. APS 患者のうち, IgM 型の

aPL が 1 回以上陽性でかつ測定サンプルが 3 検体以上ある患者を抽出した。IgM 型 aPL が持続陽性である群 (aCL, a β ₂GPI, aPS/PT IgM いずれかが 12 週以上の間隔をあけて 2 回以上陽性) と一過性に陽性である群 (aCL, a β ₂GPI, aPS/PT IgM いずれかが 1 回のみ陽性) とに分けて検証した。患者記録は電子カルテから後方視的に集計した。

【結果】 53 人の APS 患者が抽出された。このうち 40 人は IgM 型 aPL が持続陽性、13 人は一過性に陽性であった。一過性陽性群では血栓再発が認められなかったのに対し、持続陽性群では 11/40 人 (28%) に血栓再発を認めた。さらに、持続陽性群を長期持続陽性群 (aCL, a β ₂GPI, aPS/PT IgM いずれかが 2 年以上にわたって 6 週以上の間隔をあけて 3 回以上陽性) と短期持続陽性群 (aCL, a β ₂GPI, aPS/PT IgM いずれかが 2 年以上にわたって 2 回以下陽性) に分類した。IgM 型 aPL が長期持続陽性群では血栓再発フリー生存率が有意に低い結果であった (log-rank test, p=0.0841)。

【考察】 我々は既報において、APS 患者において形質細胞の前段階である Plasmablast が APS 患者の血液中で増加しており、aPL の産生において重要な役割を担っている可能性を示した。APS 患者において IgM 型の aPL が長期に持続陽性であるような患者は、Plasmablast を主体とした CD20 陰性 B 細胞が活性化され、IgM 型の aPL が長期に産生されている可能性がある。

【結論】 IgM 型 aPL の持続陽性は血栓再発のリスク因子となり得る。IgM 型 aPL を測定することでより正確に血栓リスクを層別化できる可能性がある。

本研究により、APS における第 Xa 因子阻害薬の位置づけや、IgM 型 aPL の臨床的・病態的意義を解析することで、APS 治療や病態解明のさらなる発展につながると考えられる。

2. 略語表

本文中および図中で使用した略語は以下のとおりである。

a β ₂ GPI	anti- β ₂ glycoprotein I
aCL	anticardiolipin antibodies
ACR	American College of Rheumatology
aPL	antiphospholipid antibodies
aPL-S	antiphospholipid score
APS	antiphospholipid syndrome
aPS/PT	phosphatidylserine dependent antiprothrombin antibodies
BMI	body mass index
CI	confidence interval
CKD	chronic kidney disease
CT	computed tomography scan
DAPT	dual antiplatelet therapy
DOAC	direct oral anticoagulant
DVT	deep venous thrombosis
ELISA	Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay
ETP	endogenous thrombin potential
EULAR	European Alliance of Associations for Rheumatology
HbA1c	hemoglobin A1c
HDL	high density lipoprotein
HLA	Human Leucocyte Antigen
LA	lupus anticoagulant
LDA	low dose aspirin
LDL	low density lipoprotein
MRI	magnetic resonance imaging
NOAC	novel oral anticoagulant
PAPS	primary antiphospholipid syndrome
PBMC	peripheral blood mononuclear cells
PE	pulmonary embolism
PS	phosphatidylserine
PT	prothrombin
PT-INR	prothrombin time-international normalized ratio

RCT	randomized controlled trial
RI	radio isotope
SLE	systemic lupus erythematosus
TG	triglyceride
VTE	venous thromboembolism

3. 緒言

3.1 抗リン脂質抗体症候群

抗リン脂質抗体症候群 (Antiphospholipid syndrome: APS) は、抗リン脂質抗体 (antiphospholipid antibody: aPL) と呼ばれる自己抗体を有し、臨床的に動・静脈血栓症や習慣流産、死産、子宮内胎児死亡などの妊娠合併症を呈する自己免疫性疾患である (Amengual and Atsumi, 2018). aPL には、リン脂質あるいはリン脂質結合タンパクに対する自己抗体である抗カルジオリピン抗体 (anticardiolipin antibodies: aCL) や抗 β_2 GPI 抗体 (anti- β_2 glycoprotein I: $\text{a}\beta_2$ GPI), またはリン脂質依存性凝固反応を抑制する免疫グロブリンであるループスアンチコアグラント (lupus anticoagulant: LA) などがあげられる. APS は後天性血栓症疾患としては最も頻度が高いもののひとつであり、他の血栓傾向疾患と比べて再発が非常に多く、ときに重篤な血栓症が生命予後や生活機能に影響を及ぼす. APS は基礎疾患を持たない原発性 APS (primary APS: PAPS) と全身性エリテマトーデス (systemic lupus erythematosus: SLE) などに伴う続発性 APS に分類される. 本邦では、男女比は 1:5 と女性に多く、平均発症年齢は 30-40 歳前後である. また欧州白人における APS は動脈系と静脈系の血栓症の比が等しいか静脈血栓症がやや多い傾向がある一方、本邦における APS は動脈血栓症が静脈血栓症に比べ約 2 倍の有病率であり、高頻度の動脈血栓症が日本人 APS の特徴である (Fujieda et al., 2012).

APS の診断には、2006 年に改定された分類基準 (札幌クライテリア・シドニー改変) (Miyakis et al., 2006) が用いられる. 臨床所見は、①動脈または静脈血栓症を認めること、または②妊娠合併症 (妊娠 10 週以降の胎児奇形のない子宮内胎児死亡、妊娠高血圧もしくは胎盤機能不全による妊娠 34 週以前の早産、3 回以上つづけての妊娠 10 週以前の流産)、検査所見は、LA, aCL, または $\text{a}\beta_2$ GPI のいずれかの aPL が 12 週以上の間隔を開けて 2 回以上陽性、と定義され、少なくとも 1 つの臨床所見と 1 つの検査所見が存在するときに APS と診断される (Table 1). aCL と $\text{a}\beta_2$ GPI には IgG 型および IgM 型の抗体が存在し、いずれのアイソタイプも分類基準に含まれる.

また血栓症や妊娠合併症以外にも診断基準外の症状として、aPL 関連腎症、血小板減少症、神経症状、などが現れることがあり、その症状は多彩である.

APS の血栓形成の機序として、aPL の存在下で単球や血管内皮細胞、血小板が血栓準備状態となり (first hit)、感染、手術侵襲、エストロゲン製剤の使用、長期

臥床などの要素が加わり (second hit), 血栓が形成される 2nd hit theory が想定 (Pierangeli and Erkan, 2010) されているが, その病態解明は未だ不十分である.

Table 1 抗リン脂質抗体症候群 (APS) の分類基準 (札幌クライテリア・シドニー改変)

臨床所見

1. 血栓症

画像診断, あるいは病理学的に確認された血管壁の炎症を伴わない動静脈あるいは小血管の血栓症

2. 妊娠合併症

a. 妊娠 10 週以降で, 他の原因のない正常形態胎児の死亡, または

b. ①子癇, 重症の妊娠高血圧腎症または②胎盤機能不全による妊娠 34 週以前の正常形態胎児の早産, または

c. 3 回以上続けての, 妊娠 10 週以前の流産 (母体の解剖学的異常, 内分泌学的異常, 父母の染色体異常を除く)

検査所見

1. International Society of Thrombosis and Hemostasis のガイドラインに基づいた測定法で,

ループスアンチコアグラントが 12 週間以上の間隔において 2 回以上検出される

2. 標準化された ELISA 法において, 中等度以上の力価の (>40GPL or MPL, または>99 パーセンタイル) IgG 型

または IgM 型の抗カルジオリピン抗体が, 12 週間以上の間隔において 2 回以上検出される

3. 標準化された ELISA 法において, 中等度以上の力価の (>99 パーセンタイル) IgG 型または IgM 型の

抗 β_2 -グリコプロテイン I 抗体が, 12 週間以上の間隔において 2 回以上検出される

Miyakis S. et al. J Thromb Haemost. 2006 (筆者翻訳)

3.2 aPL と APS における血栓リスクの層別化

APS は血栓症再発傾向が強く、二次予防が重要である。一方で aPL が他の要因で一過性に検出されたり、APS の中でも二次予防下にも関わらず血栓症を繰り返す群が存在したりすることから、画一的な治療は不適切といえる。例えば、aPL は感染症や自己免疫疾患、悪性疾患、健常人でも出現することがあるが (Ambrozic et al., 2002; Giron-Gonzalez et al., 2004; Pengo et al., 2007)、健常人で偶発的に検出された aPL の血栓症発症リスクは低く (Lim et al., 2006)、aPL 陽性の SLE が APS を続発するリスクは 40% と高い (Ruiz-Irastorza et al., 2004; Tektonidou et al., 2009)。また APS において二次予防を行っているにも関わらず血栓症を繰り返し、著しい生活の質の低下を認める一群もある (Zuily et al., 2015)。そのため、血栓症リスクの多寡を適切に評価し、治療の種類や強度の適正化を図ることが、APS における課題として議論されてきた。

APS 分類基準に定義されている criteria aPL (LA, aCL, a β_2 GPI) に関して、その種類や抗体価が血栓症発症のリスク因子であるという報告が、多くなされている。LA は systematic review (Galli et al., 2003) において、血栓症発症の強力な独立したリスク因子であることが報告された。また、中力価以上の aCL IgG が APS および無症候性 aPL 陽性者において独立した血栓リスク因子であること (Finazzi et al., 1996; Ruffatti et al., 2009) や、a β_2 GPI が凝固時間延長と相関し、血栓症発症の強力なリスク因子であること (De Laat et al., 2011) などが報告されている。

aPL は単独陽性よりも複数で検出される方が、血栓リスクがより高いという報告もされてきた。LA と a β_2 GPI の両者が陽性の患者 (de Groot et al., 2005)、LA, aCL, a β_2 GPI の全てが陽性の triple positive の患者 (Pengo et al., 2005) で血栓症発症リスクが著しく上昇することが示されている他、無症候性 aPL 陽性患者 (Becarevic et al., 2016) や SLE 患者 (Sciascia et al., 2012) において、triple positive を呈する症例は血栓症発症と有意に相関することが報告されている。

また、APS 分類基準に定義されている criteria aPL (LA, aCL, a β_2 GPI) 以外にも、non-criteria aPL と称される aPL の存在やその病的意義が数多く報告されており、non-criteria aPL を念頭に APS 診療を行うことは重要である (Radin et al., 2017)。non-criteria aPL のうち、ホスファチジルセリン (phosphatidylserine: PS) に結合したプロトロンビン (prothrombin: PT) を対応抗原とする aPL は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 antiprothrombin antibodies: aPS/PT) と呼ばれている。この抗体は感度、特異度と

もに aCL/ β_2 GPI と遜色なく，APS の診断に有用である可能性が報告された (Amengual et al., 2003; Atsumi et al., 2004). また aPS/PT は APS の診断のみではなく，APS の臨床症状と LA に強い相関をもつことが渥美ら (Atsumi et al., 2000) に よって報告され，Amengual ら (Amengual et al., 2017) の国際多施設研究においても同様の結果が報告されている。

上記のような aPL と血栓リスクの知見から，aPL の種類や抗体価によって血栓症再発リスクを評価する重要性が再認識されている。そこで我々は，aPL の多様性を考慮し，各患者の aPL プロファイルを点数化することで患者の血栓リスクを評価する aPL-Score (aPL-S) を提唱した (Otomo et al., 2012)。これは aPL プロファイルと APS 症状との相関をオッズ比で示し，それらを数式処理することによって定義され，aPL-S 高値は血栓症発症と有意な相関を示す。この研究は 2012 年に米国リウマチ学会雑誌「Arthritis & Rheumatology」に掲載され，aPL を“疾患の診断ツール”から“リスク因子”という概念に昇華したと評価された (Andreoli and Tincani, 2012)。

3.3 APS における末梢血リンパ球サブセットと抗体産生機序

aPL-S 高値が血栓症発症リスクと有意な正の相関を示すこと (Otomo et al., 2012) や、マウスモデルにおいて患者由来の aPL の注射により血栓形成が増強される (Arad et al., 2011) など、多くの研究では aPL は凝固促進を誘発する病原性自己抗体であると考えられている。一方で aPL 産生の機序についてはほとんど知られておらず、APS に対して抗血栓療法ではなく免疫抑制療法が有効か否かについても不明な点が多い。

我々は aPL 産生機序の解明を目的として、APS 患者のリンパ球サブセット解析と、さらに aPL 産生に寄与する B 細胞サブセットの同定を試みた (Hisada et al., 2019)。APS 患者の T 細胞および B 細胞サブセットは、Th2, Th17, Plasmablast の増加や Treg, memory B 細胞の減少など SLE 患者でこれまで報告されていたもの (Jacobi et al., 2010; Ohl and Tenbrock, 2015; Rodriguez-Bayona et al., 2010; Talaat et al., 2015) と同様であり、SLE と APS の病態生理の類似性を示唆した。また aPL 産生能を持つ主要な細胞サブセットとして、CD20 陰性 B 細胞を特定した。ナイーブ B 細胞、メモリー B 細胞を含む末梢血 B 細胞の中で Plasmablast が CD20 陰性 B 細胞の大多数を占めており (Edwards and Cambridge, 2006)、Plasma cell など他の CD20 陰性 B 細胞は末梢血ではほとんど見られないため、aPL 産生における Plasmablast の役割が強く示唆された。実際、抗 CD20 モノクローナル抗体であるリツキシマブは ANCA 関連血管炎などのいくつかの自己免疫疾患の治療に使用されている (Jones et al., 2010) が、APS においては第 II 相試験でリツキシマブ療法後に aPL 力価の減少を観察できなかった (Erkan et al., 2013) ことも、CD20 陰性 B 細胞の重要性を示している。通常の CD20 陽性 B 細胞ではなく、CD20 陰性細胞、特に Plasmablast を標的とする新しい APS の治療戦略について、今後の更なる研究が望まれる。

3.4 APS の治療

APS は希少疾患であるだけでなく、aPL の測定に関する標準化がなされていないこと、合併する臨床症状は多彩な因子が関係していることから、臨床研究を行うことが難しい疾患である。またその希少性から十分な規模の試験を実施することが難しく、質の高い無作為化比較試験 (randomized controlled trial: RCT) が少ないのが現状である。これまで蓄積されたエビデンスにおいては、現時点で APS に特異的な治療法はなく、ステロイドや免疫抑制剤の有効性は示されていない。APS の治療は血栓症の治療と予防、妊娠合併症の管理が中心であり、血栓性 APS 患者の治療においては血栓症の二次予防が最も重要である。

APS の治療ガイドラインについてはこれまでいくつか報告されたものがあるが、代表的なものとして 2012 年に Keeling らが発表した報告がある(Keeling et al., 2012)。これによると、血栓二次予防治療の標準治療はワルファリンであり、動静脈血栓に関わらずプロトロンビン時間国際基準化比 (prothrombin time-international normalized ratio: PT-INR) 2.0-3.0 での管理が推奨されている。抗血小板薬については脳梗塞のような動脈血栓症に対して考慮はされるものの、十分なエビデンスに乏しく、積極的な推奨はされていない。

その後 2019 年に欧州リウマチ学会 (European Alliance of Associations for Rheumatology: EULAR) によって EULAR recommendation (Tektonidou et al., 2019)が発表された。この recommendation では、aPL の多様性を考慮し、高リスクプロファイル群 (複数の aPL 陽性, LA 陽性, aPL が持続的に高力価を呈する場合) が定義され、血栓リスクに応じた治療管理が推奨されている。また、静脈血栓症と動脈血栓症を区別した血栓二次予防治療が提唱されている。具体的には、静脈血栓症はワルファリンによる PT-INR 2.0-3.0, 動脈血栓症はワルファリンによる PT-INR を 3.0 以上の管理、もしくは抗血小板を併用の上で、ワルファリンによる PT-INR 2.0-3.0 で管理することを推奨されている。血栓一次予防に関しても、SLE 患者で血栓症や産科 APS 既往歴のない場合、産科 APS 既往歴のみで血栓症既往のない非妊娠女性の場合、高リスク aPL プロファイルの全ての患者、などに関しては低用量アスピリン (low dose aspirin: LDA) が推奨されている。一次予防や動脈血栓症の二次予防に対して抗血小板薬の使用や併用が推奨されており、これまでワルファリン治療が主体であった APS 治療において、抗血小板薬の位置付けがより重要視された。さらに我々は動脈血栓症の再発予防に焦点を当てた臨床研究を行い、動脈血栓症の既往を有する APS 患者において抗血小板薬二剤併用療法 (Dual antiplatelet therapy: DAPT) の有効性と安全性を示した (Ohnishi et al., 2019)。

3.5 直接作用型経口抗凝固薬 (Direct oral anticoagulant: DOAC)

経口の抗凝固薬は 1948 年にワルファリンが合成され、1962 年からわが国で販売開始となり、以降 50 年近くにわたり唯一の経口抗凝固薬としてワルファリンが使用されてきた。しかし 2011 年から新規経口抗凝固薬 (novel oral anticoagulant: NOAC) が使用できるようになり、優れた特性から経口薬としてワルファリンしかなかった抗凝固治療に変革を起こした。発売当時は「新規」であった NOAC もいつまでも新規とはいえず、直接凝固カスケードを阻害することから、2015 年には国際血栓止血学会から DOAC (direct oral anticoagulant: 直接作用型経口抗凝固薬) と呼ぶことが推奨されている。

DOAC は現在国内で 4 種類が使用されており、標的因子の違いからトロンビン阻害薬に分類されるダビガトランと、第 Xa 因子阻害薬のリバーロキサバン、エドキサバン、アピキサバンの 2 種類に大きく分類できる。生体内の凝固反応は、①活性化第 VIIa 因子が、凝固開始因子である組織因子と複合体を形成することで少量の初期トロンビンが産生される (凝固開始期)。②初期トロンビンによって血小板や凝固因子が活性化されて、活性化内因子系凝固因子が第 X 因子活性化複合体 (Xase) を形成し大量の Xa を産生する (凝固増幅期)。③Xa は Va とプロトロンビナーゼ複合体を形成し、プロトロンビンから膨大なトロンビンを産生する (凝固増大期)。④トロンビンは増幅期にフィードバックし、さらに大量の Xa やトロンビン産生を促し、トロンビンバーストがフィブリノゲンからフィブリンへ変換し、血栓形成がなされる (家子正裕ほか., 2013)。

トロンビン阻害薬は、最大の凝固促進酵素であるトロンビンの活性部位に選択的に結合し、初期トロンビンと増幅期にフィードバックする少量トロンビンを阻害し、凝固増幅期を阻害することでトロンビン産生速度を遅延させ、トロンビンバーストを抑制する。第 Xa 因子阻害薬は凝固増大期に発生するプロトロンビナーゼ複合体を阻害することでトロンビン生産総量および産生速度を阻害し、抗凝固効果を発揮する。

DOAC は静脈血栓塞栓症 (venous thromboembolism: VTE) の治療や長期再発予防を目的とした大規模臨床試験において、良好な結果を示している。エドキサバンは日本人患者を含んだ国際臨床試験 Hokusai-VTE 試験でその有効性と安全性を示し (Hokusai et al., 2013), 日本人を含めた東アジア人の集団のサブ解析でも同様の有用性を確認している (Nakamura et al., 2015b)。一方、リバーロキサバンは国際臨床試験 EINSTEIN PE/DVT 試験 (Investigators et al., 2012; Investigators et al., 2010)で、またアピキサバンは国際臨床試験 AMPLIFY 試験 (Agnelli et al., 2013)でその有効性と安全性を

示し、日本人においてはそれぞれ J-EINSTEIN 試験 (Yamada et al., 2015) と AMPLIFY-J 試験 (Nakamura et al., 2015a) でその安全性が確認された。

APS は希少疾患であるが故に信頼性の高い臨床・基礎データが共に不足している。当院は APS 治療・研究における本邦の中心施設であり、本邦でまとまった APS 患者コホートを有する施設は当院だけである。

第一章では、APS に対してワルファリンの代替治療として期待されている DOAC について、その一種である第 Xa 因子阻害薬の APS に対する有効性と安全性を検証した後ろ向き研究について述べる。

第二章では、APS の分類基準にも含まれている aCL, a β_2 GPI の IgM 型抗体に着目し、IgM 型の aPL が長期的に持続陽性であることが、どのように血栓リスクと関わっているかを検証した研究について述べる。

4. 第一章

抗リン脂質抗体症候群における

第 Xa 因子阻害薬の有効性と安全性の検討

4.1 緒言

APS は動静脈血栓症や妊娠合併症を主要徴候とし、aPL の出現を特徴とする難治性の自己免疫疾患である (Amengual and Atsumi, 2018). これまでに発表された APS のガイドラインや recommendation では、血栓二次予防治療の標準治療はワルファリンである (Keeling et al., 2012; Tektonidou et al., 2019). しかしワルファリンによる二次予防下でも年に 11% の血栓症再発が認められる (Khamashta et al., 1995). またワルファリン内服中は PT-INR を至適域に調整する必要があり、薬剤間の相互作用や納豆などのビタミン K 含有食材の影響を考慮する必要がある。

ワルファリンはビタミン K 依存性凝固因子阻害薬であり、ビタミン K の働きを抑えることで抗凝固作用を発揮するのに対し、DOAC はトロンビンや Xa 因子を選択的に阻害することで抗凝固作用を示す (Figure 1). そのため、ワルファリンと比較して DOAC は食事による影響が少ない、ほかの薬剤との相互作用が少ない、半減期が短く効果がすみやかに現れる、固定用量での投与が可能であり用量調整のための定期的な採血が不要などの利点がある。

DOAC の一種である第 Xa 因子阻害薬はワルファリンに代わる有効かつ安全な治療薬として、心房細動や静脈血栓塞栓症の患者に使用されている。第 Xa 因子阻害薬は、APS 以外の静脈血栓塞栓症患者のトロンビン生成抑制において、ワルファリンと同等の効果を示した (Arachchillage et al., 2015). また大規模臨床試験にとおいても、有効性と安全性を示している。そのような背景から、APS に対する第 Xa 因子阻害薬の有効性の検証が望まれている。

APS において、第 Xa 因子阻害薬がワルファリンに代わる有効かつ安全な治療法となるかどうかを明らかにするために、2 つの RCT が実施された。2016 年に報告された Rivaroxaban in APS (RAPS) 試験 (Cohen et al., 2016) では、静脈血栓症の既往があり、ワルファリンで PT-INR 2.5 と良好なコントロールで治療されていた患者群が、ワルファリンを継続する群 56 人とリバーロキサバンへ変更する群 54 人の 2 群に無作為に割付けられ比較された。主要評価項目は 42 日後の内因性トロンビン産生能

(endogenous thrombin potential: ETP)、副次評価項目は 210 日後までの血栓症再発もしくは出血合併症とした。主要評価項目である ETP はリバーロキサバンへ変更した群では有意に上昇したが、210 日間の観察期間に両群で血栓症の再発を認めず、出血合併症はどちらも約 15% であった。この試験ではリバーロキサバン群はワルファリン群と比較し血栓リスクは増加しなかったと述べられているが、主要評価項目が実際の臨床アウトカムではない点や、動脈血栓既往例やワルファリン治療下の静脈血栓症

再発例が除外され、血栓症のハイリスクとされる triple positive (LA, aCL, a β ₂GPI の全てが陽性) 例も 30%弱に留まるなどの特徴があり、解釈には注意が必要である。また、リバーロキサバンへの変更群で血栓症の代替マーカーである ETP が有意に上昇していたこともあり、リバーロキサバンを第一選択薬とする根拠は十分ではない。

もう 1 つの RCT は 2018 年に発表された Trial on Rivaroxaban in Antiphospholipid Syndrome (TRAPS) 試験 (Pengo et al., 2018) である。血栓症を発症した APS 患者をワルファリンで治療する群 (目標 PT-INR 2.5) とリバーロキサバンで治療する群 (20mg/日、腎機能に応じて 15mg/日に減量) とに無作為に振り分け評価した。TRAPS 試験は前述の RAPS 試験と違い、臨床的なアウトカムを主要評価項目としており、リバーロキサバン群の方がワルファリン群よりも血栓・出血イベントの発生頻度が高いことが示された。しかし試験に組み込まれたのは triple positive の血栓ハイリスク症例のみであり、すべての APS profile を反映しているわけではない。試験はリバーロキサバン群で血栓や出血といったイベントが有意に多かったため早期に中止となっており、観察期間が短いという側面もある。

上述の EULAR recommendation (Tektonidou et al., 2019) においても、この TRAPS 試験を根拠にリバーロキサバンは aPL が triple positive の症例には使用すべきでないと言われているが、aPL の多様性を反映した第 Xa 因子阻害薬の有効性の検証は十分とはいえない。

これらの点をふまえ、APS に対する第 Xa 因子阻害剤の実臨床でのエビデンスはまだ確立されていないことから、一般の臨床現場における APS 患者に対する第 Xa 因子阻害薬の有効性と安全性を検討するために、後ろ向きコホート研究を実施した。

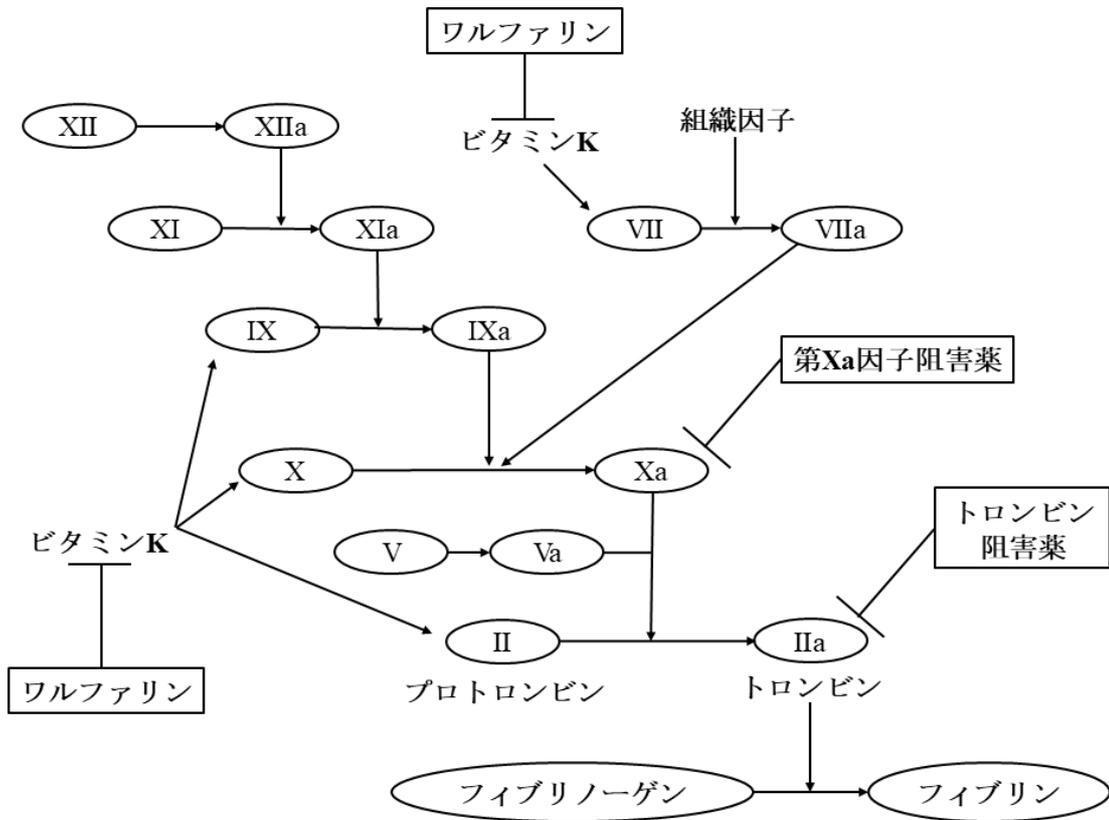


Figure 1 ワルファリンと DOAC の作用点

DOAC はトロンビンや Xa 因子を選択的に阻害する.

4.2 目的

実臨床において **triple positive** 以外の症例も含めた **heterogenous** な **aPL profile** を有する **APS** 患者において、リバーロキサバン以外の薬剤も含めた第 **Xa** 因子阻害薬の有効性と安全性を明らかにすることとした。

4.3 方法

4.3.1 研究デザイン

本研究は北海道大学病院第二内科で実施した単施設の後向きコホート研究である。臨床検査値、画像所見、臨床経過などの患者データは医療記録を用いて収集した。この研究はヘルシンキ宣言と臨床試験の基本理念に従って施行し、北海道大学大学院医学研究科倫理委員会の承認を得て行った (承認番号: 018-0136)。

4.3.2 対象および主要評価項目

当院で札幌クライテリア・シドニー改変 (Miyakis et al., 2006)を用いて APS と診断した患者データベースを用い、1990年4月から2018年3月の期間で通院歴がある206人を対象とした。SLEの併発は、米国リウマチ学会 (American College of Rheumatology: ACR) の改訂基準 (Hochberg, 1997)に従って診断した。APS以外の理由で第Xa因子阻害薬を投与されたことのある患者は、コホートから除外した。206人の中からAPSの治療として第Xa因子阻害薬を投与された患者を抽出した。

検証①として、患者がワルファリンから第Xa因子阻害薬へ切り替え例である場合、同一患者での第Xa因子阻害薬治療期間とワルファリン治療期間を比較した。同一患者のそれぞれの治療期間で比較することにより、患者背景を揃えた上で比較できるというメリットがある。また検証②では、第Xa因子阻害薬群に対して年齢、性別、SLE合併の有無、抗血小板薬併用の有無をマッチさせた対照群 (ワルファリン群) を1:2の割合でコホートから抽出し、比較した。ワルファリン群において、治療強度はPT-INRが2.0~3.0になるようにコントロールした。

第Xa因子阻害薬またはワルファリンによる治療開始後からイベント発症までを観察期間とした。イベントは、動脈・静脈血栓症の再発および入院・輸血を必要とする重篤な出血と定義した。動脈血栓症の診断は magnetic resonance imaging (MRI)、血管造影、computed tomography scan (CT)を用いた。心筋梗塞や狭心症を含む虚血性心疾患は、心電図変化や筋原性酵素の上昇や心血管造影検査を用いた。静脈血栓症の診断は、ラジオアイソトープ (radio isotope: RI) を用いた静脈造影、肺血管シンチグラフィや超音波検査、網膜血管造影を用いた。

動脈・静脈血栓症や出血イベントに関連する潜在的な交絡因子は、治療曝露時にす

べて記録された。交絡因子には、高血圧、糖尿病、脂質異常症、喫煙、肥満、慢性腎臓病 (chronic kidney disease: CKD)、APS の血栓既往の種類 (動脈血栓症および静脈血栓症)、aPL プロファイル、および副腎皮質ステロイドの使用が挙げられた。高血圧症は、降圧剤の使用、または追跡期間中に 2 回以上 140/90mmHg 以上の血圧を記録した場合と定義した。糖尿病は、任意の糖尿病薬の使用またはヘモグロビン A1c (HbA1c) が 6.5%以上と定義した。脂質異常症は、脂質異常症治療薬の使用、血清低密度リポ蛋白質濃度 (low density lipoprotein: LDL) 140mg/dL 以上、高密度リポ蛋白質濃度 (high density lipoprotein: HDL) 40mg/dL 未満、またはトリグリセリド (triglyceride: TG) 150mg/dL 以上と定義した。喫煙の定義は過去にも喫煙をしていた患者も含めて、喫煙ありとした。肥満は体格指数 (body mass index: BMI) が 25 以上、CKD は推定糸球体濾過量が 45mL/min 未満と定義した。ステロイド治療は経口もしくは経静脈的にステロイド治療を観察期間内に受けている患者とした。

4.3.3 臨床検査

0.105M クエン酸を含む試験管に末梢血を採取した。得られた末梢血は 4°C において 3000rpm, 15 min 遠心分離後、上清を回収した。血漿サンプルは血小板除去目的に 0.22 μ m フィルターで濾過し、-80°C で保存した。患者の aPL はすべて初診時と少なくとも 12 週後に測定した。

4.3.4 抗カルジオリピン抗体 (aCL) の測定

IgG/M 抗カルジオリピン抗体 (aCL) は標準 aCL ELISA 測定法を用いた (Harris et al., 1987)。132 名の健常人 aCL ELISA を施行し、結果の 99 パーセントイルを aCL の正常範囲 (IgG > 18.5 GPL および IgM > 7.0 MPL) と設定した。

4.3.5 ループスアンチコアグラント (LA) の測定

LA は semiautomated hemostasis analyzer (STart 4; Diagnostica Stago, Asniéressur sur Seine, France) を用い、国際血栓止血学会 (the Scientific and Standardisation Committee of the International Society of Thrombosis and Haemostasis: SSC-ISTH) 旧ガイドライン (Brandt et al., 1995) に基づき、活性化トロンボプラスチン時間: aPTT, 希釈ラッセル

蛇毒時間: Dilute Russell Viper venom Time (dRVVT), カオリン凝固時間: kaolin clotting time (KCT) で判定した. aPTT 測定のスクリーニングとミキシングテストに PTT-LA (Diagnostica Stago, Asnières-sur-Seine, France) を用い, Staclot LA kit (Diagnostica Stago, Asnières-sur-Seine, France) で確認試験をおこなった. dRVVT はスクリーニングと確認試験に Gradipore LA test (Sydney New South Wales, Australia) を用いた. KCT は kaolin solution (Dade Behring, Liederbach, Germany) 標準プロトコールを用いて測定した. 40 人の健常者の 99 パーセントイルを LA テストのカットオフと設定した.

4.3.6 抗 β_2 GPI 抗体の測定

IgG および IgM 抗 β_2 GPI 抗体は既報の ELISA 法により測定した (Amengual et al., 1996). 精製ヒト β_2 GPI はヤマサ製 (Tokyo, Japan) を使用し, 照射マイクロタイタープレートは, MAXI SORP (NUNC, Denmark) を使用した. $4\mu\text{g/ml}$ 精製 β_2 GPI \cdot PBS 溶液をプレートに撒き 4°C で固相化, PBS で 2 回洗浄した. 非特異的結合を避けるため $150\mu\text{l}$ 3%ゼラチン (BDH Chemicals, Poole) でブロッキング処理した. 0.05%ツイーン 20 (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA) を含む PBS (PBS-Tween) で 3 回洗浄後, 1%ウシ血清アルブミン (BSA ; Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA) を含む PBS (PBS-1%BSA) で 50 倍希釈した患者血清 $50\mu\text{l}$ を 2well ずつアプライした. プレートを室温で 1 時間インキュベートし, PBS-Tween で 3 回洗浄した. PBS-1%BSA でアルカリホスファターゼ (ALP) 標識ヤギ抗ヒト IgG および IgM 抗体 (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA) を希釈し, $50\mu\text{l/well}$ を追加, 室温で 1 時間インキュベートし, PBS-Tween での 4 回洗浄した. 1 M ジエタノールアミン緩衝液 (pH 9.8) に 1mg/ml p-ニトロフェニルリン酸二ナトリウム (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA) を加え溶液を $100\mu\text{L}$ ずつ各ウェルに添加した. 405nm 吸光度 (OD) は Multiskan ascent plate reader (Thermo Electron Co., Waltham, USA) で測定した. IgG 抗体 (>2.2 U/ml) および IgM 抗体 (>6.0 U/ml) の正常範囲は, 健常非妊娠 132 名の 99 パーセントイルによって設定した.

4.3.7 ホスファチジルセリン依存性抗プロトロンビン抗体の測定

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) は既報の ELISA 法で測定した (Atsumi et al., 2000). まずホスファチジルセリンの固相化のため, 非照射

マイクロタイタープレート (スミロンタイプ S, 住友ベークライト, Tokyo, Japan) を使用し, 50 μ g/ml ホスファチジルセリン (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA) を各ウェル 40 μ l ずつ撒き 4 $^{\circ}$ Cで一晩静置した. タンパク質の非特異的結合を避けるため, 1%脂肪酸フリーの BSA (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA) および 5mM 塩化カルシウム (BSA-Ca) を含むトリス緩衝生理食塩水 (TBS) 150 μ l でブロッキング処理を行った. 0.05%ツイーン 20 (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA) および 5mM 塩化カルシウムを含む TBS (TBS-Tween-Ca) で3回洗浄した後, 10 μ g/ml の精製ヒト PT (Diagnostica Stago, Asnières sur Seine, France) を含む BSA-Ca を 50 μ l ずつ半分のウェルに, BSA-Ca のみ (検体ブランク) を残りの半分のウェルにアプライし, 37 $^{\circ}$ C1 時間でインキュベーションした. その後プレートを洗浄し, BSA-Ca で 100 倍に希釈した血清 50 μ l を各ウェルに加えた. ALP 結合ヤギ抗ヒト IgG/IgM 抗体と基質を加え, 室温で 1 時間インキュベート後, 吸光度を測定した. 各サンプルの aPS/PT 力価は, 陽性コントロールの希釈倍率に応じた標準曲線から導出した. aPS/PT の正常範囲 (IgG> 2.0 U/ml および IgM> 9.2 U/ml) は, 非妊娠 132 健常対照群の 99 パーセントイルで設定した.

4.3.8 aPL-Score

大友ら (Otomo et al., 2012) は APS における血栓リスクの層別化を目的に aPL-Score を提唱した. aPL-Score は複数の aPL 測定を一元的に定量化し, 適切なカットオフ値を設定することによって高い相関性で血栓症の発症リスクを検出する Score である. $[aPL-Score] = 5 \times \exp(([\text{Odds Ratio}] - 5) / 4)$ の計算式を用いて算出した. aPL-Score が 30 以上であれば, 血栓症を発症するリスクが高いことを示している.

4.3.9 統計解析

連続変数は平均 \pm 標準偏差で表し, t 検定を用いて評価した. カテゴリー変数は実数値もしくはパーセンテージで示し, 群間比較は Fisher's exact test にて統計学的解析を行った. イベントフリー生存率は Kaplan-Meier 法で推定し, すべての潜在的交絡因子は単変量および多変量 Cox 比例ハザードモデルを用いて評価した. 第 Xa 因子阻害薬による治療を受けた患者は比較的少なかったため, 多変量解析の追加共変量として, それぞれのリスク因子に傾向スコアを用いた. 傾向スコアの分布と C 統計量を Figure 2 に示す. また, 2 群間の共変量の分布を Table 2 に示す. すべての統計解析に

において、 $p < 0.05$ は統計的有意性を示すものとした。すべての統計解析は、JMP® Pro 12.2.0 (SAS Institute Inc., Cary, North Carolina, USA) を用いて行った。

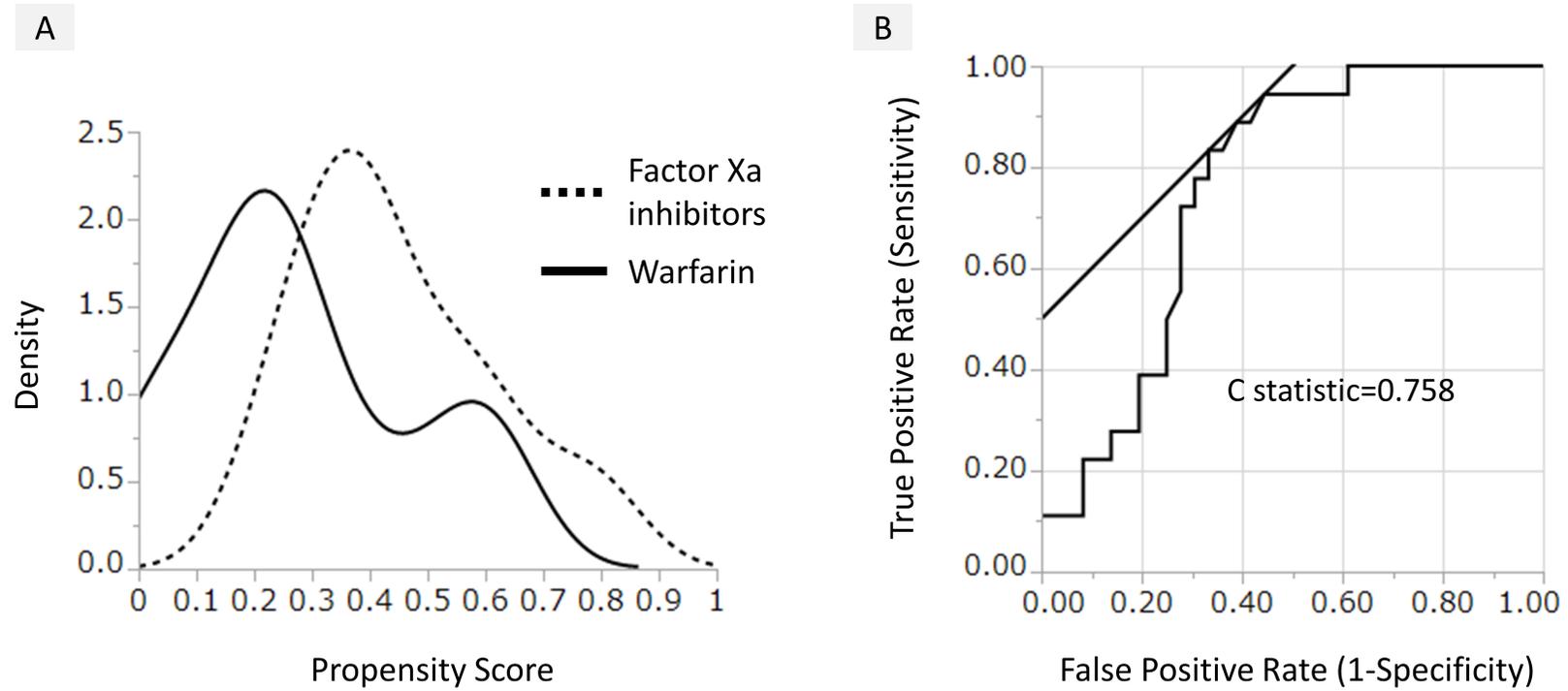


Figure 2 傾向スコアの分布と C 統計量

(A) 第 Xa 因子阻害薬群 (n=18) とワルファリン群 (n=36) における傾向スコアの分布. (B) 共変量の ROC カーブと C 統計量.

Table 2 第 Xa 因子阻害薬群 (n = 18) とワルファリン群 (n = 36) 間の共変量の分布

	Unconditional			Conditional on Inverse probability weighting		
	第 Xa 因子阻害薬	ワルファリン	SD	第 Xa 因子阻害薬	ワルファリン	SD
高血圧症, %	44.4	47.2	0.056	39.3	43.2	0.079
糖尿病, %	0	13.9	0.568	0	9.18	0.450
脂質異常症, %	27.8	44.4	0.351	29.1	39.6	0.222
喫煙, %	38.9	22.2	0.369	32.5	27.4	0.112
肥満, %	16.7	27.8	0.269	18.4	23.5	0.126
CKD, %	11.1	19.4	0.232	15.6	16.1	0.014
動脈血栓症の既往, %	44.4	72.2	0.588	53.2	60.1	0.140
静脈血栓症の既往, %	72.2	52.8	0.409	60.6	59.0	0.033
aPL-Score > 30, %	44.4	52.8	0.169	47.7	50.7	0.060
ステロイド使用, %	77.8	75.0	0.066	79.6	77.4	0.054

SD, standardized difference; CKD, chronic kidney disease; aPL, antiphospholipid antibodies

4.4 結果

APS 患者 206 人の平均年齢は 42.8 ± 16.3 歳で、178 人 (86%) が女性、101 人 (49%) が SLE を併発していた。動脈血栓症の既往を 119 人 (58%) に認め、静脈血栓症の既往を 66 人 (32%) に認めた。206 人のうち、18 人に第 Xa 因子阻害薬が使用されていた (リバーロキサバン 5 人、エドキサバン 12 人、アピキサバン 1 人)。18 人の患者のうち 14 人は、納豆をはじめとしたビタミン K を多く含む食品の制限を避けたいという希望から、ワルファリンから第 Xa 因子阻害薬に変更されていた。

検証①ではワルファリンから第 Xa 因子阻害薬に切り替えられた 14 人の患者について、ワルファリン治療期間と第 Xa 因子阻害薬治療期間とで比較した (Figure 3)。検証②では、18 人の第 Xa 因子阻害薬群に対して年齢、性別、SLE 合併の有無、抗血小板薬併用の有無をマッチさせた対照群 (ワルファリン群) を 1:2 の割合で 36 人をコホートから抽出し、比較した (Figure 3)。

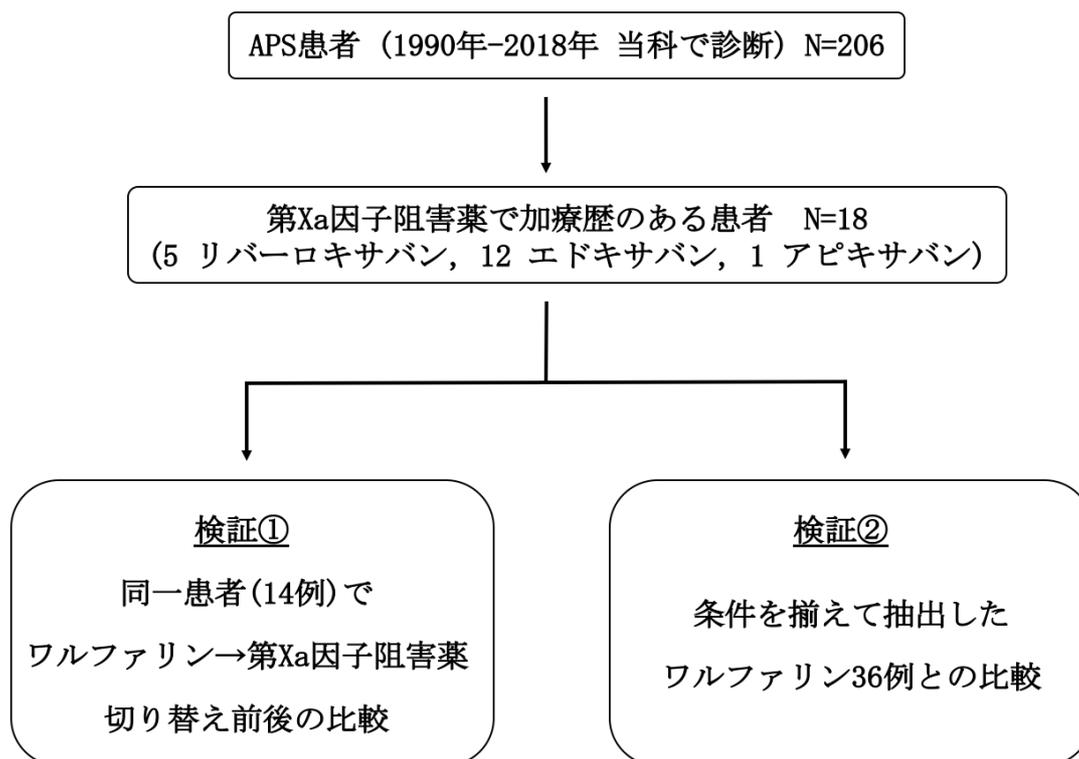


Figure 3 研究デザイン

第 Xa 因子阻害薬で加療された患者数が 18 人という比較的少ない人数だったため、2 つの異なる方法でワルファリンとの比較を行った。

4.4.1 検証① 同一患者における第 Xa 因子阻害薬治療期間とワルファリン治療期間の比較

4.4.1.1 患者背景

各薬剤投与開始時の患者背景を Table 3 にまとめた。各群の背景には統計学的に有意な差はなかった。

4.4.1.2 イベント発生率

イベントフリー生存期間は、第 Xa 因子阻害薬投与時の方がワルファリン投与時よりも有意に短かった (Figure 4)。全員が当初ワルファリンを使用し、その後第 Xa 因子阻害薬に切り替えたため、ワルファリン療法では必然的に患者の年齢が若くなることを考慮し、年齢を共変量として含む多変量 Cox 比例ハザードモデルを使用したところ、やはり第 Xa 因子阻害薬はハザード比 14.0 (95%CI: 1.76-306, $p=0.0108$) と有意に関連していた。

血栓症の再発はそれぞれ、ワルファリン投与中に 1 例 (1.92/100 人年)、第 Xa 因子阻害薬投与中に 4 例 (18.5/100 人年) 認められた。血栓症の内容は、ワルファリン治療期間群に網膜静脈分枝閉塞症を認め、第 Xa 因子阻害薬治療期間群に脳梗塞と深部静脈血栓症をそれぞれ 2 例ずつ認めた。重篤な出血事象はワルファリンの治療期間には認められなかったが、第 Xa 因子阻害薬の治療期間にくも膜下出血が 1 例

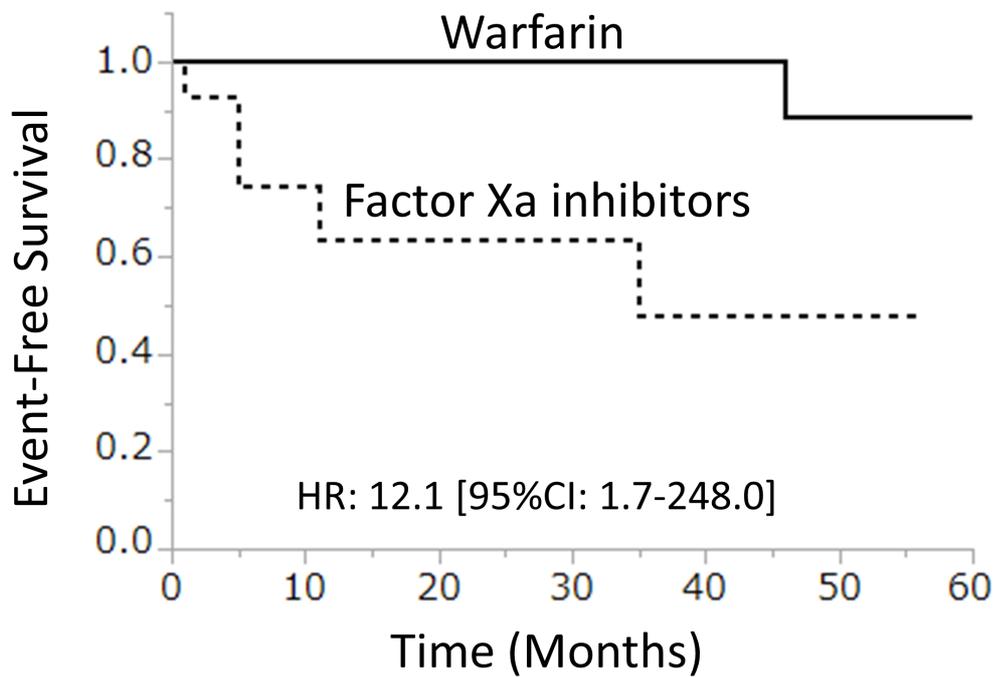
(4.62/100 人年) 認められた。aPL-Score は、ワルファリン治療期間 (37.5 ± 4.96) と第 Xa 因子阻害薬治療期間 (32.5 ± 5.61 , $p=0.51$) の間で有意な差はなかった。

Table 3 患者背景 (各薬剤投与開始時)

	ワルファリン (n = 14)	第 Xa 因子阻害薬 (n = 14)	P value
年齢 (歳)	38.3±17.2	46.1±15.9	0.2202
女性	12(85.7%)	12(85.7%)	1.0000
SLE 合併	8(57.1%)	11(78.6%)	0.2248
SLEDAI	2.88±1.46	2.72±1.62	0.8377
抗血小板薬使用	4(28.6%)	8(57.1%)	0.1266
既往			
動脈血栓症	4(28.6%)	5(35.7%)	0.6857
静脈血栓症	11(78.6%)	11(78.6%)	1.0000
産科合併症	3(21.4%)	4(28.6%)	0.6625
aPL の種類			
aCL IgM/IgG	8(57.1%)	8(57.1%)	1.0000
aβ ₂ GPI IgM/IgG	7(50.0%)	7(50.0%)	1.0000
LA	12(85.7%)	11(78.6%)	0.6217
aPS/PT IgM/IgG	11(78.6%)	11(78.6%)	1.0000
Triple positivity	6(42.9%)	6(42.9%)	1.0000
aPL score	36.7±30.2	32.0±25.6	0.6602
aPL score > 30	7(50.0%)	6(42.9%)	0.7047
合併症			
高血圧症	4(28.6%)	6(42.9%)	0.4302
糖尿病	0(0%)	0(0%)	N/A
脂質異常症	0(0%)	3(21.4%)	0.0668
スタチン使用	0(0%)	3(21.4%)	0.0668
喫煙	3(21.4%)	3(21.4%)	1.0000
肥満	4(28.6%)	3(21.4%)	0.6625
CKD	0(0%)	1(7.1%)	0.3085
ステロイド使用	8(57.1%)	10(71.4%)	0.4302
免疫抑制薬使用	0(0%)	1(7.1%) [†]	0.3085

SLEDAI, SLE disease activity index; aPL, antiphospholipid antibodies; aCL, anticardiolipin antibodies; aβ₂GPI, anti-beta2 glycoprotein I antibodies; aPS/PT, phosphatidylserine-dependent anti-prothrombin antibodies; N/A, not applicable; CKD, chronic kidney disease

[†], tacrolimus



Number at risk

Warfarin	14	14	13	13	13	10	10	9	9	9	8	8	8
Factor Xa inhibitors	14	10	7	6	5	5	5	4	3	1	1	1	0

Figure 4 イベントフリー生存曲線

同一患者における第 Xa 因子阻害薬治療期間とワルファリン治療期間でのイベント発生率を比較した。第 Xa 因子阻害薬投与時の方がワルファリン投与時よりも有意にイベント発生率が多かった。

4.4.2 検証② 第 Xa 因子阻害薬群とワルファリン群の比較

4.4.2.1 患者背景

観察開始時の患者の特徴を Table 4 にまとめた。第 Xa 因子阻害薬群では、8 人 (44.4%) に動脈血栓症の既往、13 人 (72.2%) に静脈血栓症の既往、3 人 (16.7%) に動脈血栓症/静脈血栓症の両方の既往を認めた。aPL の triple positive は 6 人 (33.3%)、aPL-Score が 30 以上の高値を示したのは 8 人 (44.4%) であった。一方、ワルファリン投与群では、26 人 (72.2%) に動脈血栓症の既往、19 人 (52.8%) に静脈血栓症の既往、10 人 (55.6%) に動脈血栓症/静脈血栓症の両方の既往を認めた。aPL の triple positive は 14 人 (38.9%)、aPL-Score が 30 以上の高値を示したのは 19 人 (52.8%) であった。triple positive の患者の割合と aPL-Score が高値の患者の割合は、両群間で有意な差はなかった。ワルファリン治療を受けている患者では、動脈血栓症の既往がある割合が有意に高かった (72.2% 対 44.4%, $p=0.0463$)。

4.4.2.2 イベント発生率

第 Xa 因子阻害薬を投与された患者のイベントフリー生存期間は、ワルファリン群の患者よりも有意に短かった (Figure 5)。すべての交絡因子は、単変量および多変量の Cox 比例ハザードモデルを用いて評価した (Table 5)。単変量の Cox 比例ハザードモデルでは、第 Xa 因子阻害薬がイベント発生と有意に関連していた。多変量 Cox 比例ハザードモデルで交絡因子の影響を考慮したあとでも、第 Xa 因子阻害薬は依然として有意なリスク因子として抽出された。また静脈血栓症の既往歴のある患者は、イベントのリスクが低いことが判明した。

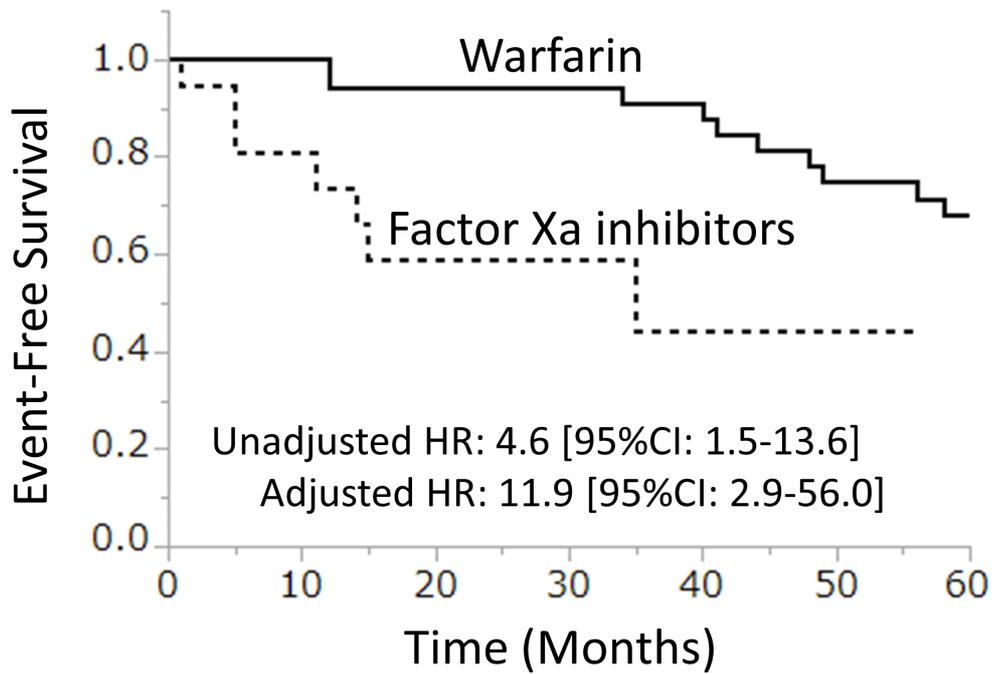
血栓症の再発は、第 Xa 因子阻害薬投与群で 6 例 (21.4/100 人年)、ワルファリン投与群で 8 例 (5.50/100 人年) であった。血栓症の詳細については、第 Xa 因子阻害薬群では 4 例が脳梗塞を発症し、2 例が深部静脈血栓症を発症した。ワルファリン群では、脳梗塞が 5 例、深部静脈血栓症が 1 例、一過性黒内障が 1 例、一過性脳虚血発作が 1 例であった。一方、重篤な出血事象は、第 Xa 因子阻害薬群で 1 例 (3.56/100 人年)、ワルファリン群で 2 例 (1.32/100 人年) に認められた。前者はくも膜下出血、後者は小脳出血および憩室出血であった。

Table 4 患者背景 (各薬剤投与開始時)

	第 Xa 因子阻害薬 (n = 18)	ワルファリン (n = 36)	P value
年齢 (歳)	47.7±17.1	42.6±13.4	0.2791
女性	15(83.3%)	30(83.3%)	1.0000
SLE 合併	13(72.2%)	24(66.7%)	0.6786
SLEDAI	2.92±1.55	5.59±5.59	0.0764
抗血小板薬使用	11(61.1%)	19(52.8%)	0.5613
既往			
動脈血栓症	8(44.4%)	26(72.2%)	0.0463
静脈血栓症	13(72.2%)	19(52.8%)	0.1704
産科合併症	4(22.2%)	7(19.4%)	0.8112
aPL の種類			
aCL IgM/IgG	10(55.6%)	17(47.2%)	0.5637
aβ ₂ GPI IgM/IgG	7(50.0%)	23(63.9%)	0.3681
LA	14(77.8%)	33(91.7%)	0.1520
aPS/PT IgM/IgG	15(83.3%)	25(69.4%)	0.2723
Triple positivity	6(33.3%)	14(38.9%)	0.6902
aPL score	32.5±23.8	37.5±29.8	0.5058
aPL score > 30	8(44.4%)	19(52.8%)	0.5637
合併症			
高血圧症	8(44.4%)	17(47.2%)	0.8470
糖尿病	0(0%)	5(13.9%)	0.0969
脂質異常症	5(27.8%)	16(44.4%)	0.2363
スタチン使用	5(27.8%)	15(41.7%)	0.3191
喫煙	7(38.9%)	8(22.2%)	0.1974
肥満	3(16.7%)	10(27.8%)	0.3680
CKD	2(11.1%)	7(19.4%)	0.4386
ステロイド使用	14(77.8%)	27(75.0%)	0.8219
免疫抑制薬使用	1(5.6%) [¶]	7(19.4%) [§]	0.1756

SLEDAI, SLE disease activity index; aPL, antiphospholipid antibodies; aCL, anticardiolipin antibodies; aβ₂GPI, anti-beta2 glycoprotein I antibodies; aPS/PT, phosphatidylserine-dependent anti-prothrombin antibody; CKD, chronic kidney disease

¶, tacrolimus; §, 2 tacrolimus, 2 azathioprine, 2 cyclophosphamide, 1 mizoribine



Number at risk

Warfarin	36	34	34	32	32	32	31	29	28	25	23	22	19
Factor Xa inhibitors	18	14	11	9	6	6	6	4	3	1	1	1	0

Figure 5 イベントフリー生存曲線

18例の第Xa因子阻害薬群と条件を揃えてコホートから抽出した36例のワルファリン群でのイベント発生率を比較した。第Xa因子阻害薬群の方がワルファリン群よりも有意にイベント発生率が多かった。

Table 5 血栓のリスクとなりうる交絡因子の解析

	Univariate analysis			Multivariate analysis		
	Unadjusted HR	(95% CI)	P value	Adjusted HR	(95% CI)	P value
高血圧症	1.13	(0.433-3.03)	0.7952	1.26	(0.446-3.63)	0.6592
糖尿病	0.960	(0.151-3.42)	0.9568	1.00	(0.0245-40.8)	1.0000
脂質異常症	0.560	(0.178-1.51)	0.2615	1.04	(0.270-3.61)	0.9571
喫煙	1.28	(0.403-3.52)	0.6527	0.781	(0.209-2.38)	0.6786
肥満	1.37	(0.434-3.70)	0.5657	3.16	(0.801-10.6)	0.0963
CKD	0.838	(0.193-2.58)	0.7772	0.762	(0.130-3.96)	0.7485
動脈血栓症の既往	1.44	(0.510-5.13)	0.5082	1.18	(0.296-5.60)	0.8243
静脈血栓症の既往	0.492	(0.178-1.28)	0.1458	0.191	(0.0340-0.953)	0.0432*
aPL-Score > 30	0.711	(0.266-1.86)	0.4833	0.817	(0.277-2.31)	0.7044
ステロイド使用	0.519	(0.196-1.51)	0.2157	0.485	(0.167-1.517)	0.2039
第 Xa 因子阻害薬	4.62	(1.54-13.6)	0.0075*	11.9	(2.93-56.0)	0.0005*

* P-values <0.05. P-values were estimated using Cox proportional hazard model. HR, hazard ratio; CKD, chronic kidney disease; aPL, antiphospholipid antibodies.

4.4.3 結論

検証①では同一患者における第 Xa 因子阻害薬とワルファリンのそれぞれの治療期間の比較を行い，検証②ではコホートから第 Xa 因子阻害薬群とワルファリン群をそれぞれ抽出して比較を行ったが，そのいずれにおいても，イベント発生率は第 Xa 因子阻害薬治療の方が高かった。

4.5 考察

本研究では、コホート研究により APS 患者に対する第 Xa 因子阻害薬の臨床的有効性をリアルワールドで初めて評価し、第 Xa 因子阻害薬におけるイベントフリー生存期間がワルファリン治療のそれよりも有意に短いことを示した。本研究の新規性として、5 年後までの長期的な有効性と安全性、heterogenous な aPL profile を有する APS 患者のデータ、リバーロキサバンのみならずエドキサバン、アピキサバンの症例も含まれていること、が挙げられる。

APS における Xa 因子阻害薬の有効性については、これまでいくつかの検証がされてきた。先述の RAPS 試験や TRAPS 試験のみならず、症例報告や症例集積研究においても、対象に triple positive のようなハイリスク症例を多く含む場合は Xa 因子阻害薬の有効性は乏しく、ハイリスク症例が除かれた場合はワルファリンと比して遜色ない結果を示すという傾向を認める。

一方、当院での検証でも認めるように、第 Xa 因子阻害薬内服下においてリスクが高くないと考えられる症例での血栓再発も一定数ある。実際、検証②においてワルファリン投与群では、第 Xa 因子阻害薬投与群に比べて動脈血栓症の既往歴のある患者の割合が有意に多かった。また統計学的有意差はないものの、aPL の triple positive の割合や aPL-Score が 30 以上の高値を示した症例はワルファリン投与群の方で多い傾向であり、ワルファリンを投与された患者は血栓リスクが高い可能性が示唆された。言い換えれば、第 Xa 因子阻害薬投与群には血栓リスクがより低い症例が多かったにも関わらず、イベントフリー生存率は低い結果であった。また triple positive とされる三種の古典的 aPL には含まれないものの、強力な向血栓作用がある aPS/PT がどの程度血栓リスクに寄与しているかなど、血栓リスク層別化についてはさらなる検証が望まれる。

第 Xa 因子阻害薬よりもワルファリンで有意にイベントフリー生存期間が長かった理由として、単一の凝固因子を阻害する Xa 因子阻害薬よりも、複数の凝固因子を阻害し効果を発揮するワルファリンが、より強固に凝固カスケードを抑制し、血栓形成を抑える可能性がある。また興味深いことに、TRAPS 試験における血栓症再発例では動脈血栓症が多い (Pengo et al., 2018)。筆者の施設の検証でも、Xa 因子阻害薬群における血栓症再発は、半数が動脈血栓症であった。TRAPS 試験、当院での検証いずれにおいても、抗血小板薬併用の割合は両群でほぼ同等であり、単に抗血小板薬の有無が動脈血栓症再発を規定しているわけではない。マウスモデルにおいて直接トロンビン阻害薬であるダビガトランとワルファリンの血小板に対する動態を比較した報告

では、ダビガトランが血小板凝集を介して動脈血栓症形成を促進させるとされており (Petzold et al., 2016), DOAC とワルファリンでは 血小板活性化に対する効果に違いがあり, それが動脈血栓症の生じやすさに違いをもたらしているのかもしれない。

さらにワルファリンはその作用機序から, 単なる抗凝固薬としてではなく APS における主要抗原であるプロトロンビンの抗原量を低下させている可能性がある。ワルファリンはビタミン K のアンタゴニストとして働くことで, ビタミン K 依存性凝固因子におけるグルタミン酸残基の γ -カルボキシグルタミン酸 (Gla) 残基への置換を阻害し, 結果としてビタミン K 依存性凝固因子が Gla 残基を持たない不完全な凝固因子のままとなることで抗凝固作用を発揮する。ビタミン K 依存性凝固因子の 1 つであるプロトロンビンは aPL の主要抗原とされているが, ワルファリンを使うことでこのプロトロンビンの Gla 残基の形成が不十分となり, 結果としてプロトロンビンの抗原量が減少し APS の血栓形成抑制に寄与している可能性がある。

本研究は, 第 Xa 因子阻害薬による治療を受けた患者の数が少なかったこと, 日本人のみの単施設の検討であること, 患者は定期的にフォローアップされていたもののレトロスペクティブな研究であることなどが, 結果に影響した可能性がある。

今後は APS に対する第 Xa 因子阻害薬の有効性のさらなるエビデンスの確立と, 第 Xa 因子阻害薬とワルファリンでの APS における作用の違いについてのさらなる検証が望まれる。それらを明確にすることが, ひいては APS における血栓形成の病態解明に寄与する可能性がある。

4.6 結語

APS 患者に対して、第 Xa 因子阻害薬の使用は推奨されない可能性が示唆された。実臨床に即して heterogenous な aPL profile を有する APS 患者における、長期的な有効性と安全性のデータを示すことができた。

5. 第二章

IgM 型抗リン脂質抗体の 長期持続陽性と血栓リスクについて

5.1 背景

APS の分類基準 (Table 1) では血栓症や妊娠合併症という臨床症状に加えて、aPL の存在が必要である。このうち aCL, a β_2 GPI では IgG 型のみならず IgM 型の aPL も含まれている (Miyakis et al., 2006)。しかしながら IgM 型の aPL が臨床的にどの程度意義をもつのか、という点については未だ議論の余地が多い。血栓性 APS 患者 106 人の検証 (Del Ross et al., 2015) で 12% に IgM 型の aPL が単独で検出されたという報告や、産科合併症を呈する APS において 3% に IgM 型の a β_2 GPI が独立して検出されたという報告 (Boffa et al., 2009) のように、いくつかの既報では一部の APS において IgM 型の aPL が独立して検出されていることから、IgM 型の aPL は少なからず臨床症状に寄与していると考えられている。

しかし、多くの研究で検討されている aPL はある一点の測定でのみ評価されており、IgM 型の aPL の抗体価は変動が多く、長期的には陰転化する場合もあることから、IgM 型の aPL が長期に持続的陽性であることが臨床症状にどう関わっているか、という点については未だ検証が不十分である。

5.2 目的

本研究の目的は, IgM 型の aPL が長期的に持続陽性であることが, どのように血栓リスクと関わっているかを明らかにすることとした.

5.3 方法

5.3.1 研究デザイン

本研究は北海道大学病院第二内科で実施した単施設の後ろ向きコホート研究である。臨床検査値、画像所見、臨床経過などの患者データは医療記録を用いて収集した。この研究はヘルシンキ宣言と臨床試験の基本理念に従って施行し、北海道大学大学院医学研究科倫理委員会の承認を得て行った (承認番号: 012-0338)。

5.3.2 対象および主要評価項目

当院で2003年から2018年の間に、様々な理由でaPLを測定された6334検体の中から、IgM型のaPLが一度でも陽性であった患者326名を抽出した。そのうち、検体が12週以上の間隔をあけて3回以上測定されている患者を抽出し、最終的に143名の患者を解析した (Figure 6)。

検証①として、この143名をpersistent IgM aPL群 (いずれかのIgMが12週以上の間隔をあけて2回以上陽性) とtransient群 (いずれかのIgMが一回だけ陽性) の2群に分類し比較した (Figure 7)。

検証②ではAPS症例に限定して、血栓の再発が多いかどうかを検証した。APSの診断には札幌クライテリア・シドニー改変 (Miyakis et al., 2006)を用いた。当初の143例から、観察開始時にすでに血栓性APSと診断されている53例を抽出した。そのうち、先程と同様に、persistent IgM aPL群 (いずれかのIgMが12週以上の間隔をあけて2回以上陽性) とtransient群 (いずれかのIgMが一回だけ陽性) の2群に分類し解析した (Figure 8)。

検証③として我々はさらに、血栓性APSのうちのpersistent IgM aPL群の患者40例について、IgMがより長期的に持続陽性であることが血栓のリスクとなるかについてサブ解析を行った。40例をLong term persistent IgM群 (いずれかのIgMが2年以上にわたってそれぞれ6ヶ月以上の間隔を開けて3回以上陽性であるもの) とshort term persistent群 (いずれかのIgMが陽性であったのが2年以上の期間で2回以下であった群) に分類し比較した (Figure 9)。Long term persistent IgM群は長期間にわたってIgM型のaPLが陽性であることを意味する。

主要評価項目はイベントフリー生存率とし、イベントは観察期間内での血栓症再発と定義した。観察期間について、Figure 10 に示す。観察期間の開始はIgM型のaPLが初めて陽性になったときとし、観察期間の終了は転院などによる打ち切り、血栓イベントが生じたとき、あるいは2018年末まで、と定義した。もし患者が血栓を発症し、その際の検査でIgM型のaPL陽性が初めて判明した場合、その血栓イベントは観察期間内のイベントとはカウントしないものとした。

動脈血栓症の診断は magnetic resonance imaging (MRI)、血管造影、computed tomography scan (CT)を用いた。心筋梗塞や狭心症を含む虚血性心疾患は、心電図変化や筋原性酵素の上昇や心血管造影検査を用いた。静脈血栓症の診断は、ラジオアイソトープ (RI)を用いた静脈造影、肺血管シンチグラフィーや超音波検査、網膜血管造影を用いた。

また、本研究はIgM型のaPLが陽性の患者を抽出していることから、血栓のリスク因子と認識されている triple positive の定義を、LA と IgG 型 aCL, IgG 型 a β ₂GPI のすべてが陽性である場合と定義した。

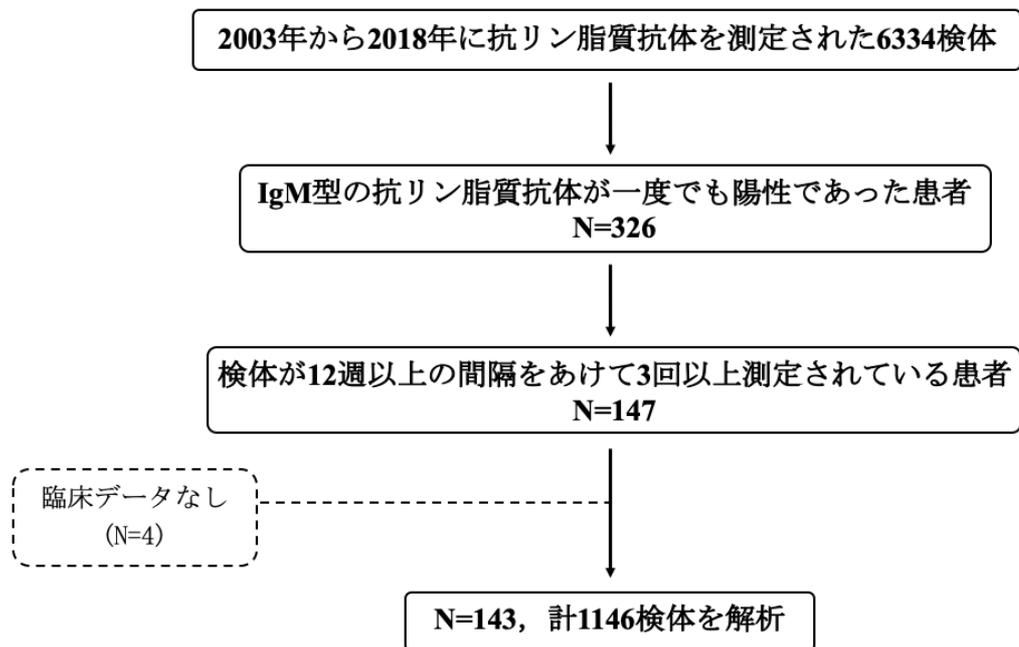


Figure 6 解析方法

当院で2003年から2018年の間にaPLを測定された6334検体の中から最終的に143名の患者、計1146検体を抽出し解析した。

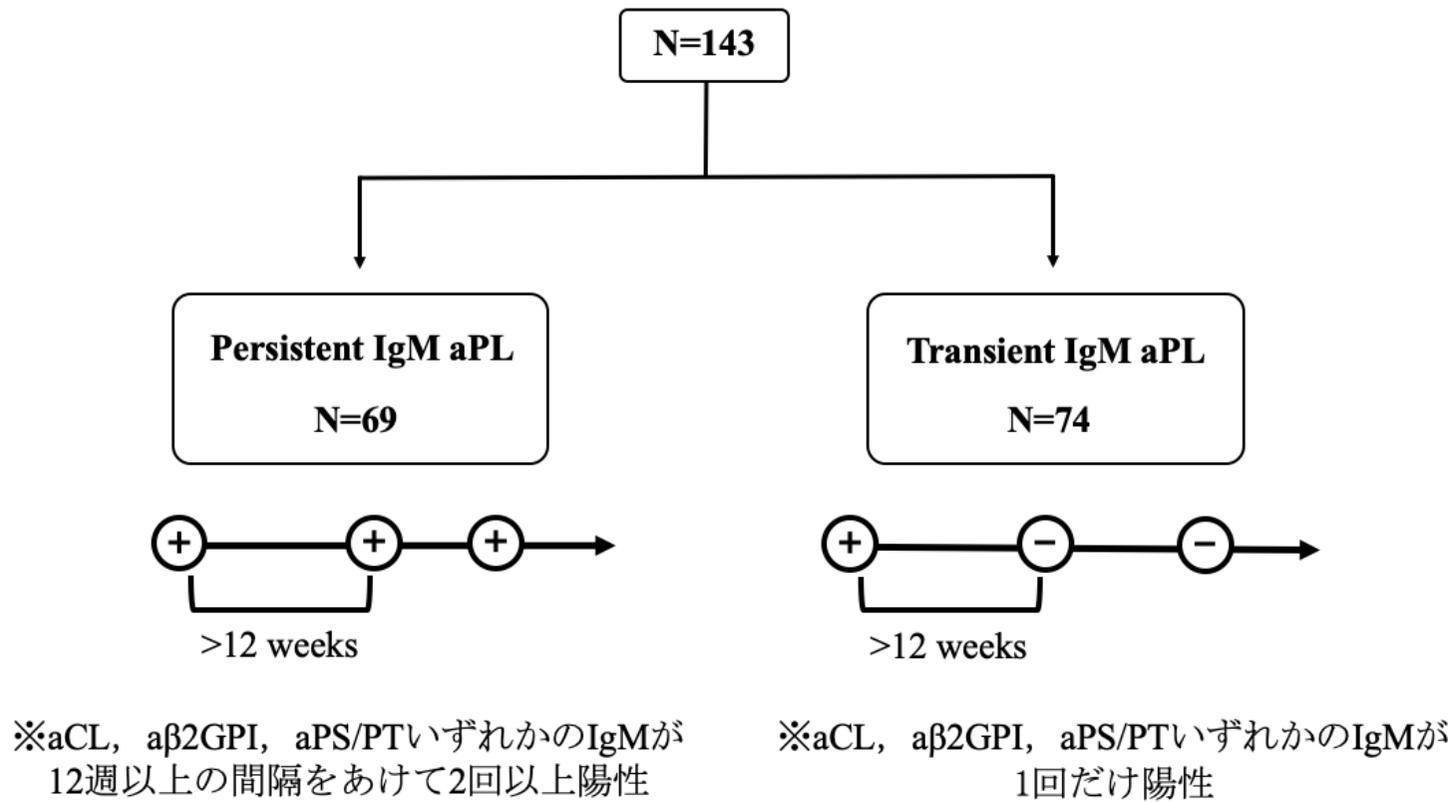
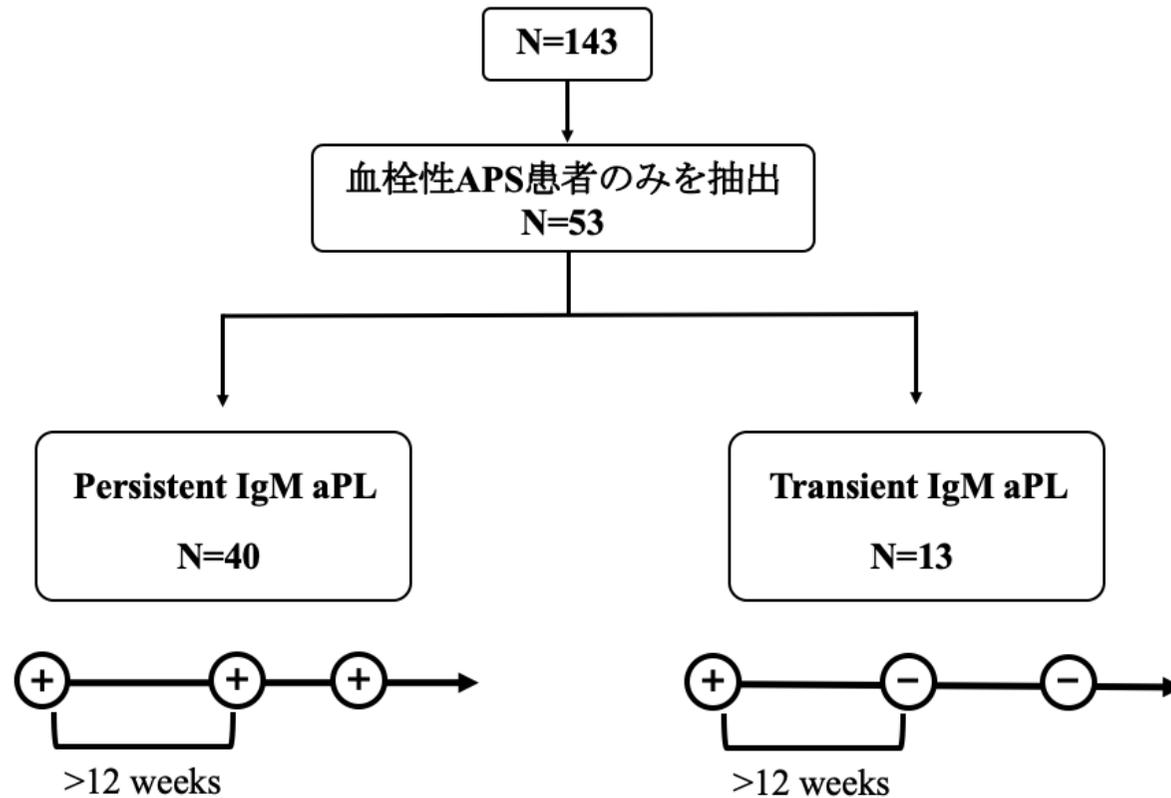


Figure 7 検証①

143名を persistent IgM aPL 群 (いずれかの IgM が 12 週以上の間隔をあけて 2 回以上陽性) と transient 群 (いずれかの IgM が一回だけ陽性) の 2 群に分類し比較した.



※aCL, aβ2GPI, aPS/PTいずれかのIgMが
12週以上の間隔をあけて2回以上陽性

※aCL, aβ2GPI, aPS/PTいずれかのIgMが
1回だけ陽性

Figure 8 検証②

血栓性 APS 53 例を persistent IgM aPL 群 (いずれかの IgM が 12 週以上の間隔をあけて 2 回以上陽性) と transient 群 (いずれかの IgM が一回だけ陽性) の 2 群に分類し解析した.

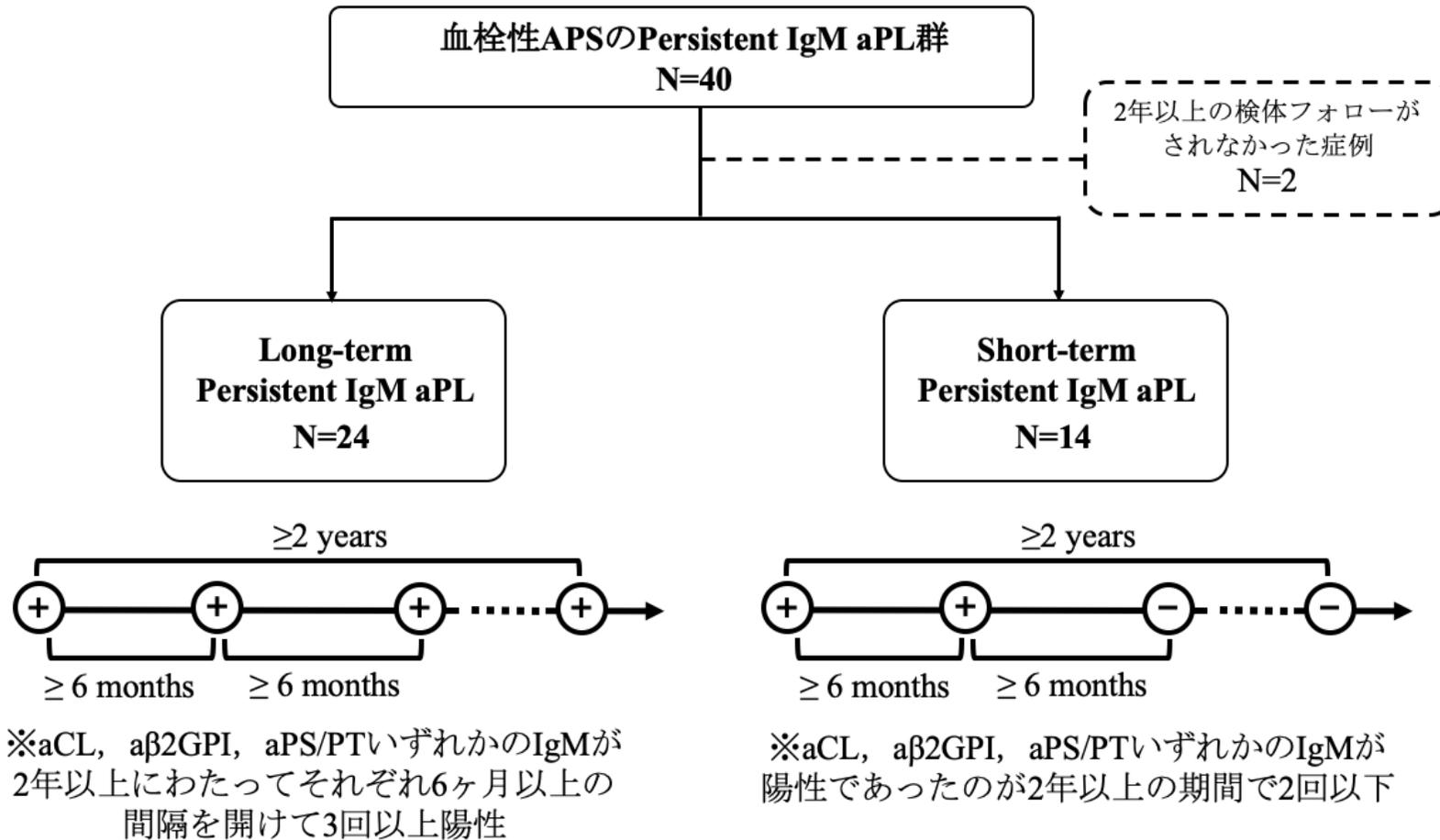


Figure 9 検証③

血栓性 APS のうちの persistent IgM aPL 群 40 例を Long term persistent IgM 群 (いずれかの IgM が 2 年以上にわたってそれぞれ 6 ヶ月以上の間隔を開けて 3 回以上陽性であるもの) と short term persistent 群 (いずれかの IgM が陽性であったのが 2 年以上の期間で 2 回以下であった群) に分類し比較した。

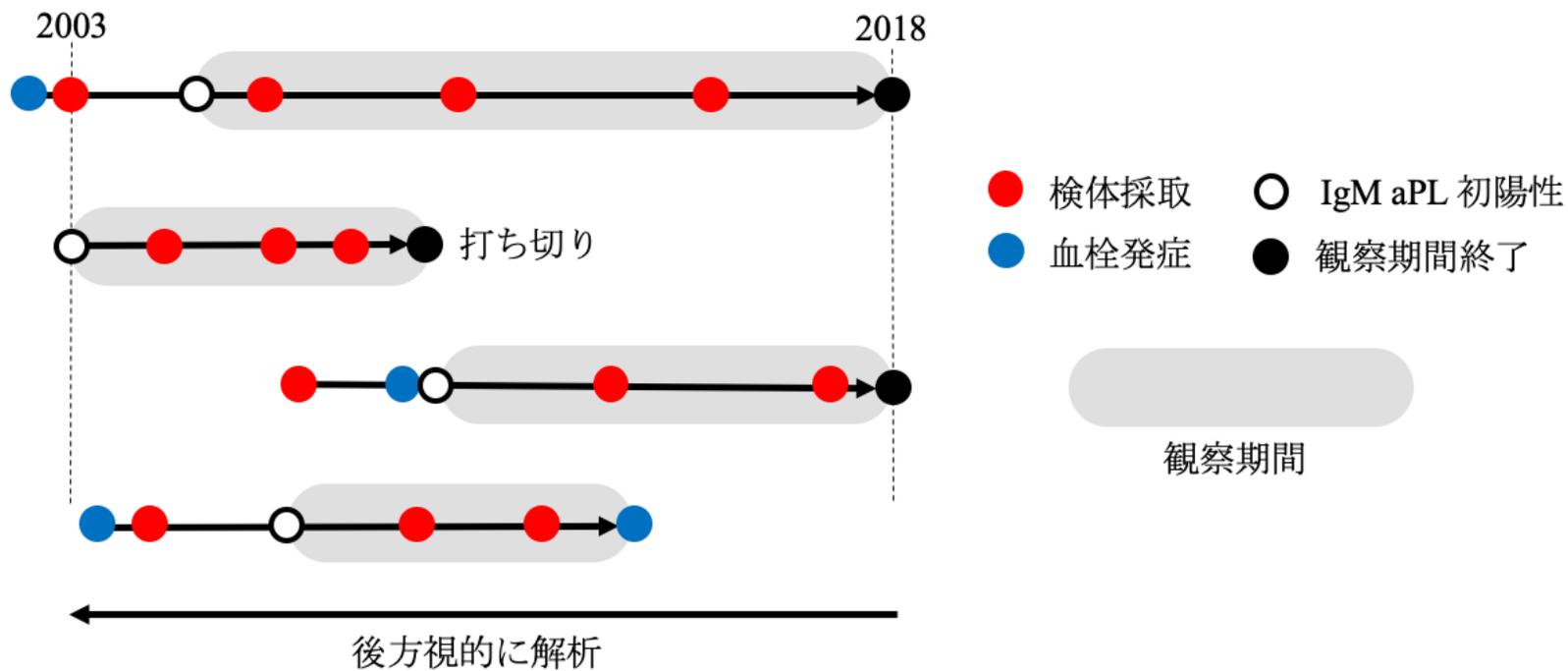


Figure 10 観察期間

観察期間の開始は IgM 型の aPL が初めて陽性になったときとし、観察期間の終了は転院などによる打ち切り、血栓イベントが生じたとき、あるいは 2018 年末まで、と定義した。

5.3.3 臨床検査

0.105M クエン酸を含む試験管に末梢血を採取した。得られた末梢血は4°Cにおいて3000rpm, 15 min 遠心分離後, 上清を回収した。血漿サンプルは血小板除去目的に0.22 μ m フィルターで濾過し, -80°Cで保存した。

5.3.4 抗カルジオリピン抗体 (aCL) の測定

IgG/M 抗カルジオリピン抗体 (aCL) は標準 aCL ELISA 測定法を用いた (Harris et al., 1987)。132 名の健常人 aCL ELISA を施行し, 結果の 99 パーセンタイルを aCL の正常範囲 (IgG > 18.5 GPL および IgM > 7.0 MPL) と設定した。

5.3.5 ループスアンチコアグラント (LA)の測定

LA は semiautomated hemostasis analyzer (STart 4; Diagnostica Stago, Asniéressur sur Seine, France) を用い, 国際血栓止血学会 (the Scientific and Standardisation Committee of the International Society of Thrombosis and Haemostasis: SSC-ISTH) 旧ガイドライン (Brandt et al., 1995) に基づき, 活性化トロンボプラスチン時間: aPTT, 希釈ラッセル蛇毒時間: Dilute Russell Viper venom Time (dRVVT), カオリン凝固時間: kaolin clotting time (KCT) で判定した。aPTT 測定のスクリーニングとミキシングテストに PTT-LA (Diagnostica Stago, Asniéressur sur Seine, France) を用い, Staclot LA kit (Diagnostica Stago, Asniéressur sur Seine, France) で確認試験をおこなった。dRVVT はスクリーニングと確認試験に Gradipore LA test (Sydney New South Wales, Australia) を用いた。KCT は kaolin solution (Dade Behring, Liederbach, Germany) 標準プロトコールを用いて測定した。40 人の健常者の 99 パーセンタイルを LA テストのカットオフと設定した。

5.3.6 抗 β_2 GPI 抗体の測定

IgG および IgM 抗 β_2 GPI 抗体は既報の ELISA 法により測定した (Amengual et al., 1996)。精製ヒト β_2 GPI はヤマサ製 (Tokyo, Japan) を使用し, 照射マイクロタイターブ

プレートは、MAXI SORP (NUNC, Denmark) を使用した。4 μ g/ml 精製 β_2 GPI・PBS 溶液をプレートに撒き 4 $^{\circ}$ C で固相化、PBS で 2 回洗浄した。非特異的結合を避けるため 150 μ l 3%ゼラチン (BDH Chemicals, Poole) でブロッキング処理した。0.05%ツイーン 20 (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO,USA) を含む PBS (PBS-Tween) で 3 回洗浄後、1%ウシ血清アルブミン (BSA ; Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO,USA) を含む PBS (PBS-1%BSA) で 50 倍希釈した患者血清 50 μ l を 2well ずつアプライした。プレートを室温で 1 時間インキュベートし、PBS-Tween で 3 回洗浄した。PBS-1%BSA でアルカリホスファターゼ (ALP) 標識ヤギ抗ヒト IgG および IgM 抗体 (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO,USA) を希釈し、50 μ l/well を追加、室温で 1 時間インキュベートし、PBS-Tween での 4 回洗浄した。1 M ジェタノールアミン緩衝液 (pH 9.8) に 1mg/ml p-ニトロフェニルリン酸二ナトリウム (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO,USA) を加え溶液を 100 μ L ずつ各ウェルに添加した。405nm 吸光度 (OD) は Multiskan ascent plate reader (Thermo Electron Co., Waltham, USA) で測定した。IgG 抗体 (>2.2 U/ml) および IgM 抗体 (>6.0 U/ml) の正常範囲は、健常非妊娠 132 名の 99 パーセントイルによって設定した。

5.3.7 ホスファチジルセリン依存性抗プロトロンビン抗体の測定

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) は既報の ELISA 法で測定した (Atsumi et al., 2000)。まずホスファチジルセリンの固相化のため、非照射マイクロタイタープレート (スミロンタイプ S, 住友ベークライト, Tokyo, Japan) を使用し、50 μ g/ml ホスファチジルセリン (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO,USA) を各ウェル 40 μ l ずつ撒き 4 $^{\circ}$ C で一晩静置した。タンパク質の非特異的結合を避けるため、1%脂肪酸フリーの BSA (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO,USA) および 5mM 塩化カルシウム (BSA-Ca) を含むトリス緩衝生理食塩水 (TBS) 150 μ l でブロッキング処理を行った。0.05%ツイーン 20 (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO,USA) および 5mM 塩化カルシウムを含む TBS (TBS-Tween-Ca) で 3 回洗浄した後、10 μ g/ml の精製ヒト PT (Diagnostica Stago, Asnières sur Seine, France) を含む BSA-Ca を 50 μ l ずつ半分のウェルに、BSA-Ca のみ (検体ブランク) を残りの半分のウェルにアプライし、37 $^{\circ}$ C 1 時間でインキュベーションした。その後プレートを洗浄し、BSA-Ca で 100 倍に希釈した血清 50 μ l を各ウェルに加えた。ALP 結合ヤギ抗ヒト IgG/IgM 抗体と基質を加え、室温で 1 時間インキュベート後、吸光度を測定した。各サンプルの aPS/PT 力価は、陽性コントロールの希釈倍率に応じた標準曲線から導出した。aPS/PT の正常範囲

(IgG> 2.0 U/ml および IgM> 9.2 U/ml) は、非妊娠 132 健常対照群の 99 パーセントイルで設定した。

5.3.9 統計解析

連続変数は平均±標準偏差で表し、t 検定を用いて評価した。カテゴリー変数は実数値もしくはパーセンテージで示し、群間比較は Fisher's exact test にて統計学的解析を行った。イベントフリー生存率は Kaplan-Meier 法で評価した。すべての統計解析において、 $p < 0.05$ は統計的有意性を示すものとした。すべての統計解析は、JMP® Pro 12.2.0 (SAS Institute Inc., Cary, North Carolina, USA) を用いて行った。

5.4 結果

5.4.1 検証① persistent IgM aPL 群と transient IgM aPL 群の比較

5.4.1.1 患者背景

各群の観察開始時の患者背景を Table 6, Figure11 にまとめた. persistent IgM aPL 群には APS と診断された症例がより多く含まれ, 抗血栓療法を受けている割合が多かった. aPL の内訳は, persistent IgM aPL 群では, LA や IgG 型といった他の aPL が陽性の割合も多かった. また, triple positive 症例, すなわち血栓ハイリスクであると考えられる症例は persistent IgM aPL 群で有意に多い結果だった.

5.4.1.2 イベント発生率

血栓のイベントフリー生存率については, persistent IgM aPL 群で有意に低い結果だった (Figure12).

Table 6 患者背景 (各群の観察開始時)

	Persistent IgM aPL (n = 69)	Transient IgM aPL (n = 74)	P value
女性 : 男性 (人)	57:12	66:8	0.2569
年齢, 平均±SD	42.8±15.6	43.7±19.2	0.7600
APS	44 (64%)	15 (20%)	<0.0001
血栓症の既往	40 (58%)	15 (20%)	0.0003
動脈血栓症	32/40	9/13	0.0631
静脈血栓症	14/40	6/13	0.7796
産科合併症	9/57 (16%)	4/66 (6%)	0.0782
抗血栓療法	40 (58%)	15 (20%)	0.0003
抗血小板薬	24 (35%)	6 (8%)	0.0010
ワルファリン	6 (9%)	6 (8%)	0.7295
抗血小板薬 + ワルファリン	8 (12%)	1 (1%)	0.0032
DOAC	1 (1%)	1 (1%)	0.9434
抗血小板薬 + DOAC	1 (1%)	1 (1%)	0.9434
aPL の種類			
LA	52 (75%)	21 (28%)	<0.0001
aCL IgG	42 (61%)	11 (15%)	<0.0001
aβ ₂ GPI IgG	26 (38%)	6 (8%)	<0.0001
aPS/PT IgG	31 (45%)	15 (20%)	0.0016
aCL IgM	30 (43%)	42 (57%)	0.1125
aβ ₂ GPI IgM	27 (39%)	24 (32%)	0.4034
aPS/PT IgM	44 (64%)	24 (32%)	0.0002

SLEDAI, SLE disease activity index; aPL, antiphospholipid antibodies; aCL, anticardiolipin antibodies; aβ₂GPI, anti-beta2 glycoprotein I antibodies; aPS/PT, phosphatidylserine-dependent anti-prothrombin antibody; CKD, chronic kidney disease

¶, tacrolimus; §, 2 tacrolimus, 2 azathioprine, 2 cyclophosphamide, 1 mizoribine

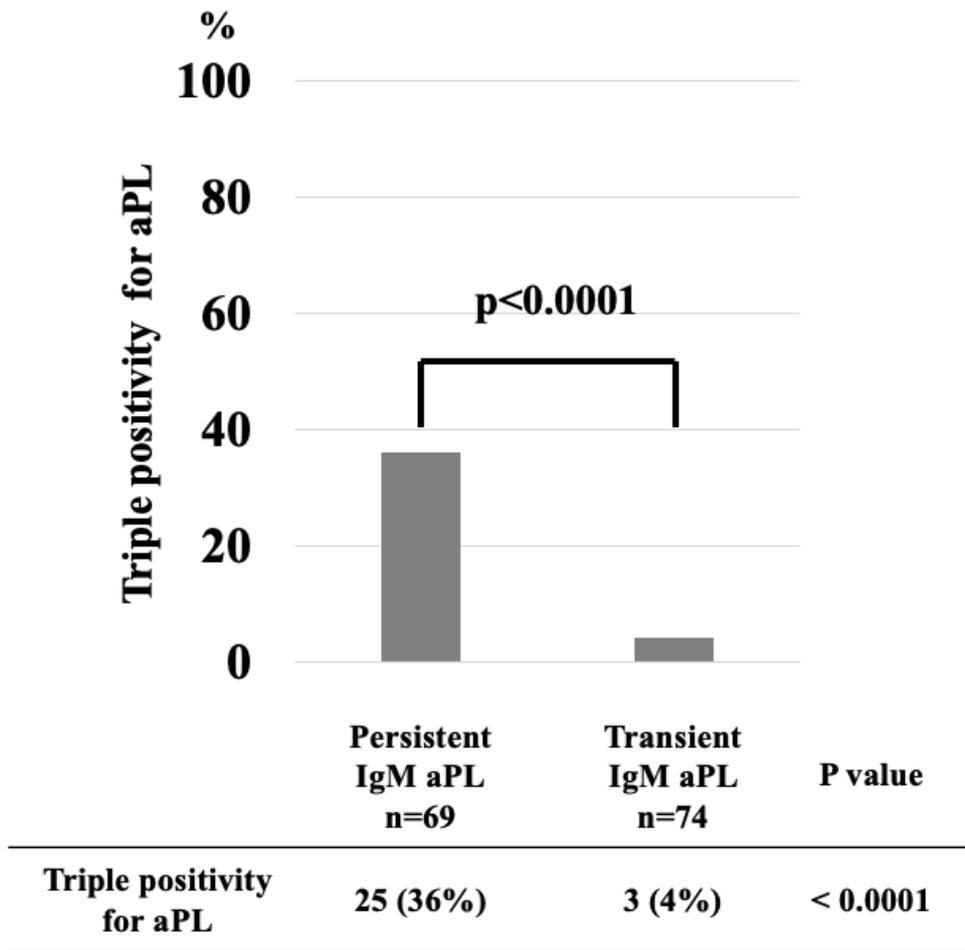


Figure 11 各群における triple positivity の割合

血栓ハイリスクと考えられる triple positive 症例の割合は persistent IgM aPL 群で有意に多かった。

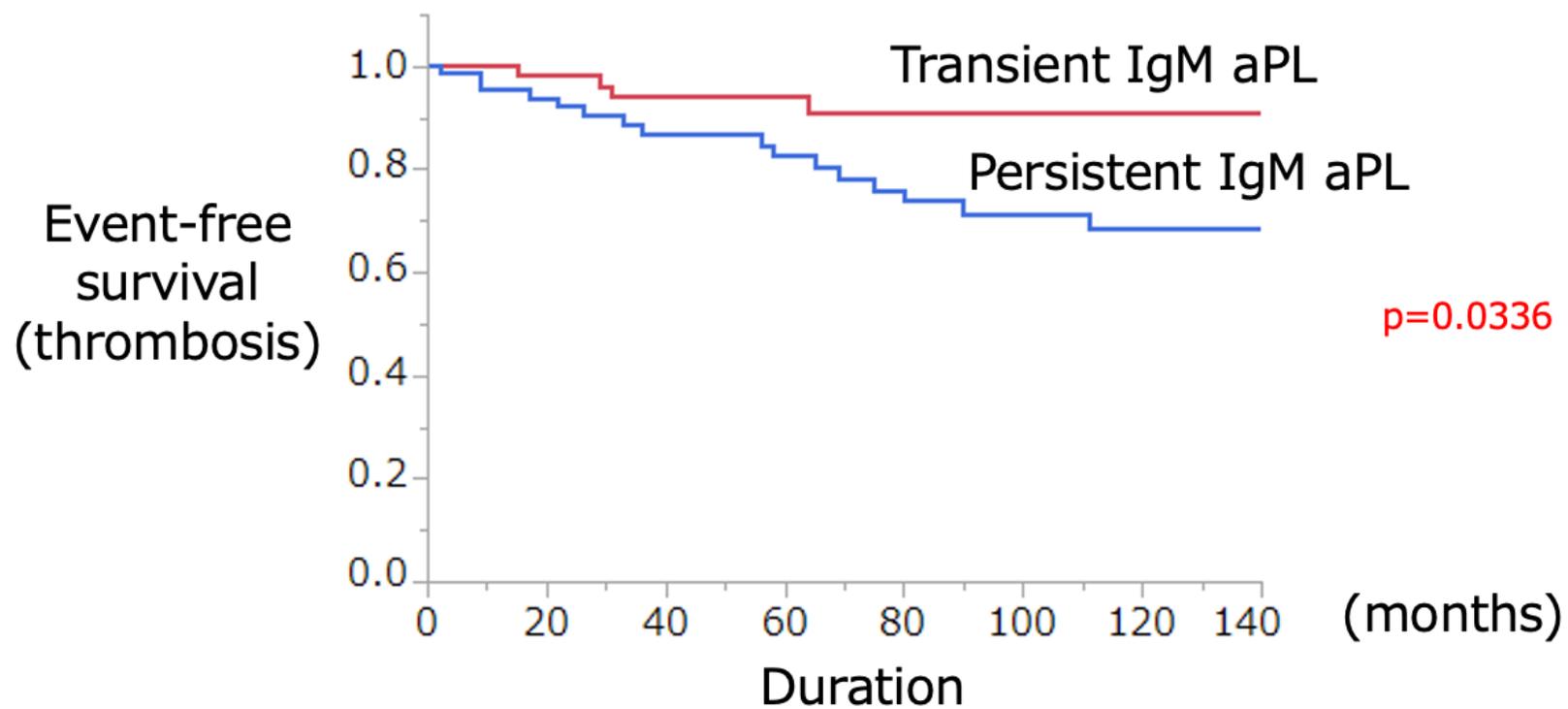


Figure 12 血栓のイベントフリー生存曲線

血栓のイベントフリー生存率については、persistent IgM aPL 群で有意に低い結果だった。

5.4.2 検証② APS 症例における persistent IgM aPL 群と

transient IgM aPL 群の比較

5.4.2.1 患者背景

各群の観察開始時の患者背景を Table 7, Figure 13 に示す. 2 群間の患者背景で動脈血栓や静脈血栓の既往に差はなく, 二次血栓予防は全例行われていた. persistent IgM aPL 群は, 他の IgG 型の aPL や LA が陽性である割合が多く, triple positive 症例の割合も多かった.

5.4.2.2 イベント発生率

transient 群では血栓イベントを認めず, 血栓イベントフリー生存率は persistent IgM aPL 群で低い傾向だった (Figure 14).

Table 7 患者背景 (各群の観察開始時)

	Persistent IgM aPL (n = 40)	Transient IgM aPL (n = 13)	P value
女性 : 男性 (人)	32:8	12:1	0.3045
年齢, 平均±SD	41.8±14.9	37.9±17.7	0.4825
血栓症の既往	40 (100%)	13 (100%)	1.0000
動脈血栓症	30/40	8/13	0.0631
静脈血栓症	13/40	5/13	0.7796
抗血栓療法	40 (100%)	13 (100%)	1.0000
抗血小板薬	21 (53%)	8 (62%)	0.8736
ワルファリン	8 (20%)	4 (31%)	0.2037
抗血小板薬 + ワルファリン	9 (23%)	0 (0%)	0.0626
DOAC	2 (5%)	1 (8%)	0.6962
抗血小板薬 + DOAC	0 (0%)	0 (0%)	-
aPL の種類			
LA	37 (93%)	8 (62%)	0.0067
aCL IgG	31 (78%)	4 (31%)	0.0020
aβ ₂ GPI IgG	20 (50%)	2 (15%)	0.0278
aPS/PT IgG	28 (70%)	6 (46%)	0.1193
aCL IgM	15 (38%)	6 (46%)	0.5794
aβ ₂ GPI IgM	12 (30%)	2 (15%)	0.2991
aPS/PT IgM	32 (80%)	8 (62%)	0.1789

SLEDAI, SLE disease activity index; aPL, antiphospholipid antibodies; aCL, anticardiolipin antibodies; aβ₂GPI, anti-beta2 glycoprotein I antibodies; aPS/PT, phosphatidylserine-dependent anti-prothrombin antibody; CKD, chronic kidney disease

¶, tacrolimus; §, 2 tacrolimus, 2 azathioprine, 2 cyclophosphamide, 1 mizoribine

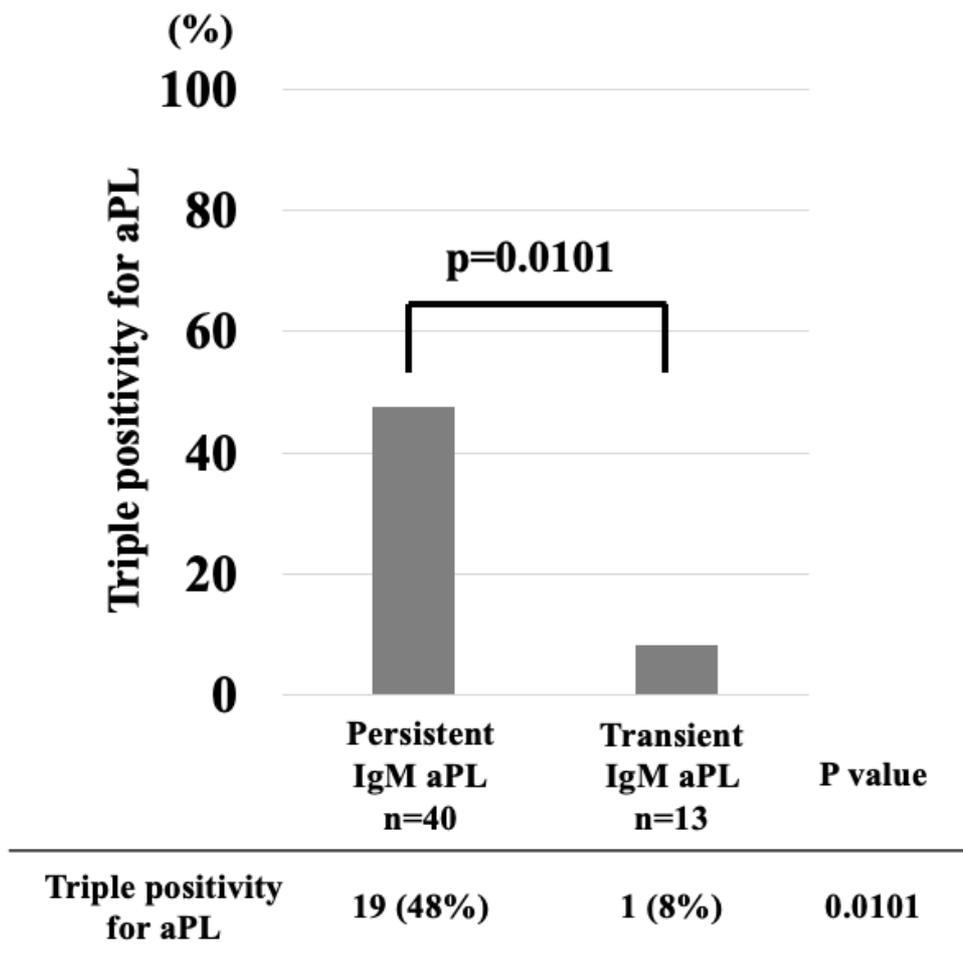


Figure 13 各群における triple positivity の割合

血栓ハイリスクと考えられる triple positive 症例の割合は persistent IgM aPL 群で有意に多かった。

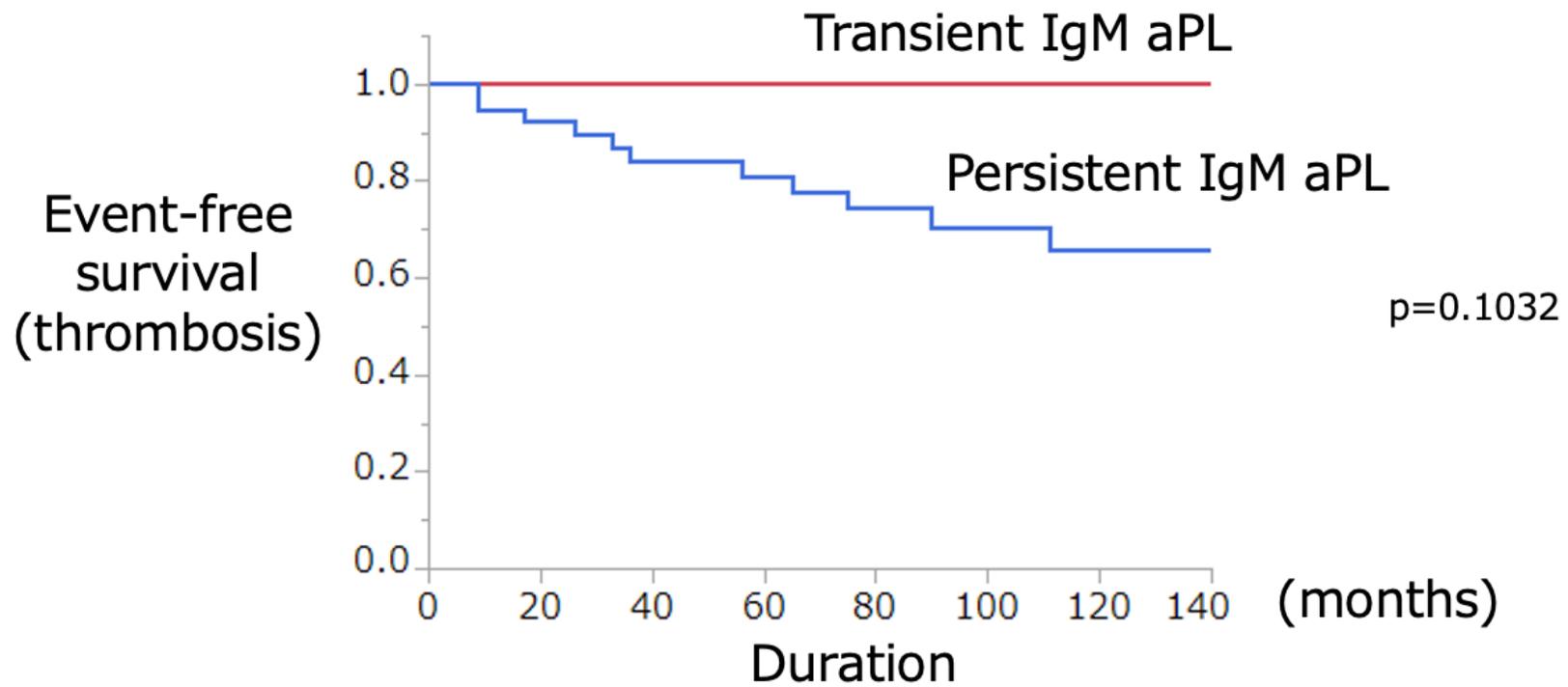


Figure 14 血栓のイベントフリー生存曲線

血栓のイベントフリー生存率については, persistent IgM aPL 群で低い傾向を認めた.

5.4.3 検証③ Long term persistent IgM 群と short term persistent 群の比較

5.4.3.1 患者背景

各群の観察開始時の患者背景を Table 8, Figure 15 に示す。2 群間で患者背景に有意差はなかった。LA や IgG 型の aPL が陽性の割合は 2 群間で差を認めず、triple positive の割合も 2 群間でほぼ同等であった。

5.4.3.2 イベント発生率

Triple positive の割合が同等にも関わらず、Long term persistent IgM 群では血栓イベントフリー生存率が低い傾向がみられた (Figure 16)。

Table 8 患者背景 (各群の観察開始時)

	Long-term persistent IgM aPL (n = 24)	Short-term transient IgM aPL (n = 14)	P value
女性 : 男性 (人)	20:4	12:2	0.8460
年齢, 平均±SD	42.5±15.3	40.6±14.7	0.6972
血栓症の既往	24 (100%)	14 (100%)	1.0000
動脈血栓症	20/24	10/14	0.3852
静脈血栓症	7/24	6/14	0.3908
抗血栓療法	24 (100%)	14 (100%)	1.0000
抗血小板薬	12 (50%)	7 (50%)	1.0000
ワルファリン	3 (13%)	3 (21%)	0.5641
抗血小板薬 + ワルファリン	8 (33%)	2 (14%)	0.1984
DOAC	1 (4%)	1 (7%)	0.6919
抗血小板薬 + DOAC	0 (0%)	0 (0%)	-
aPL の種類			
LA	22 (92%)	13 (93%)	0.8956
aCL IgG	21 (88%)	9 (64%)	0.0904
aβ ₂ GPI IgG	12 (50%)	7 (50%)	1.0000
aPS/PT IgG	18 (75%)	9 (64%)	0.4824
aCL IgM	10 (42%)	4 (29%)	0.4195
aβ ₂ GPI IgM	11 (46%)	1 (7%)	0.0133
aPS/PT IgM	22 (92%)	9 (64%)	0.0357

SLEDAI, SLE disease activity index; aPL, antiphospholipid antibodies; aCL, anticardiolipin antibodies; aβ₂GPI, anti-beta2 glycoprotein I antibodies; aPS/PT, phosphatidylserine-dependent anti-prothrombin antibody; CKD, chronic kidney disease

¶, tacrolimus; §, 2 tacrolimus, 2 azathioprine, 2 cyclophosphamide, 1 mizoribine

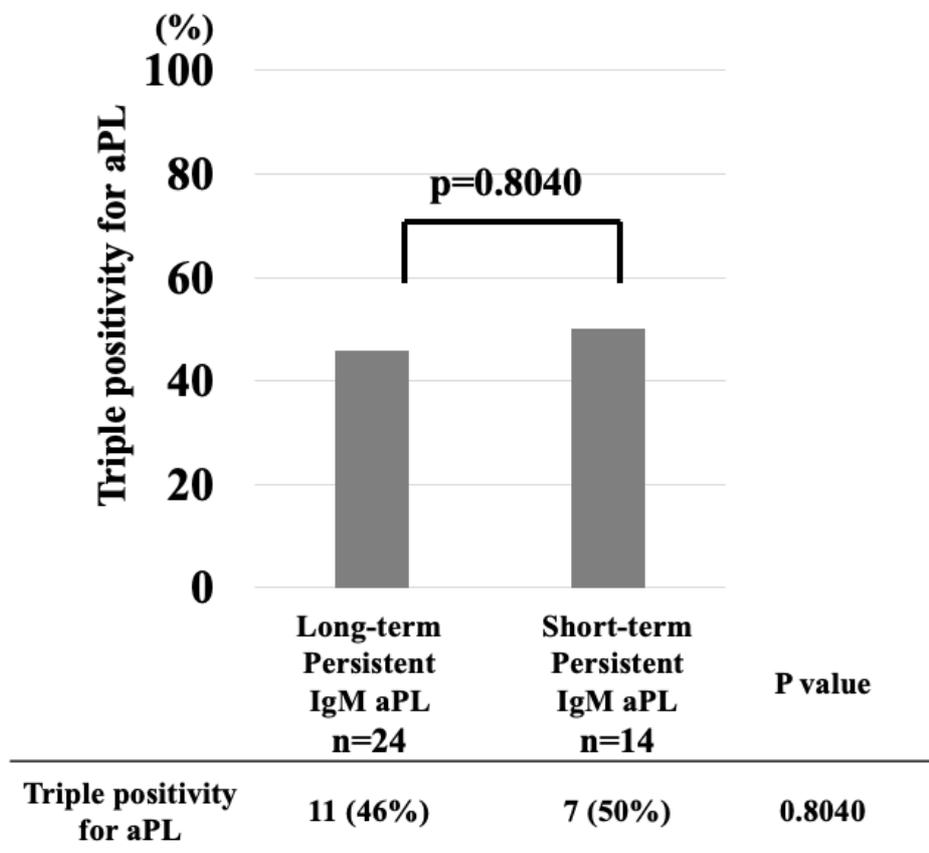


Figure 15 各群における triple positivity の割合

triple positive の割合は2群間でほぼ同等であり、血栓リスクは2群間で同等であることが示唆された。

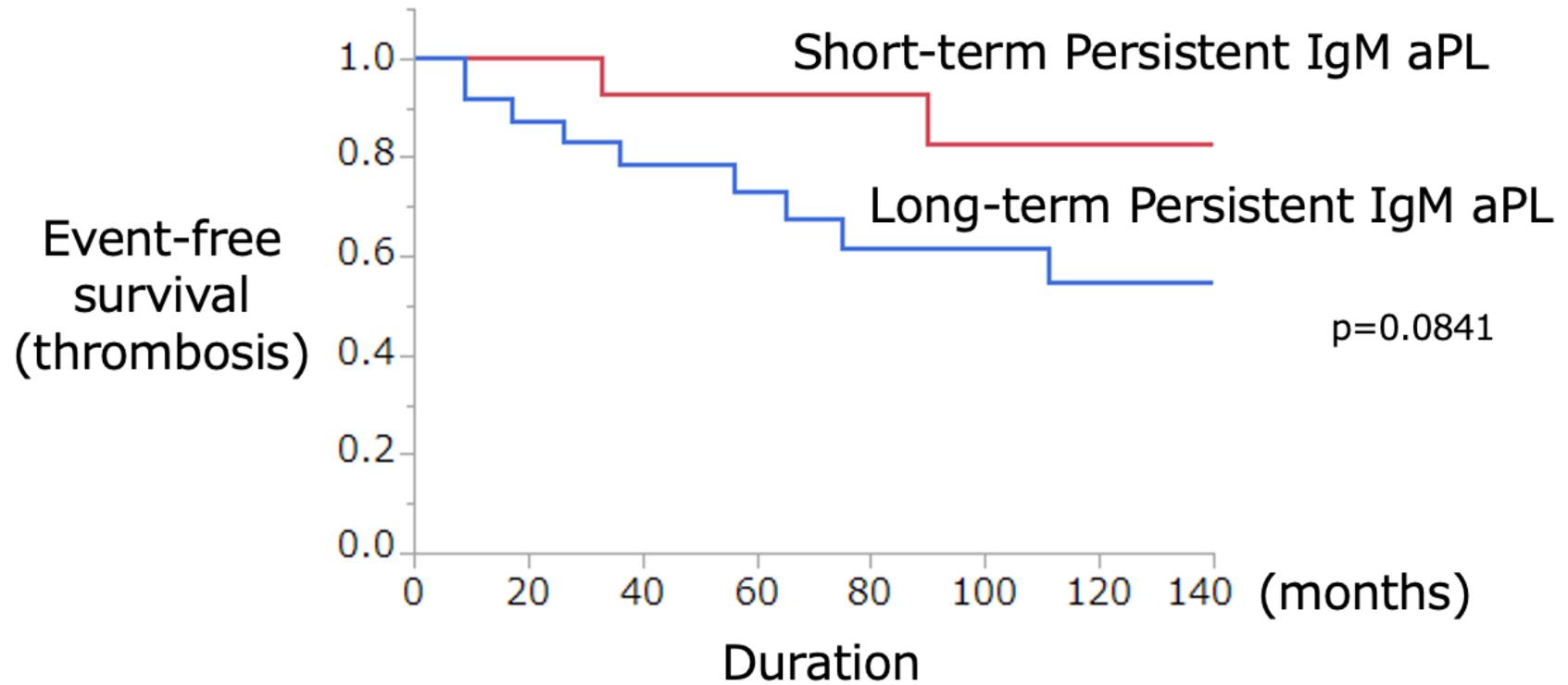


Figure 16 血栓のイベントフリー生存曲線

Triple positive の割合が同等にも関わらず, Long term persistent IgM 群では血栓イベントフリー生存率が低い傾向であった.

5.4.4 結論

APS 患者で IgM 型の aPL が持続的に陽性であるような症例は、IgG 型を含めた他の aPL や triple positive 症例の割合が多く、結果として血栓再発の割合が多かった。IgM 型の aPL を測定することにより、triple positive のようなハイリスク症例を推定できる可能性がある。

また IgM 型の aPL が長期に持続的陽性の場合、そうでない患者群と比べて triple positive の割合が同等、すなわち 2 群間の血栓リスクが同程度と考えられるにも関わらず、血栓再発の割合が多い傾向を認めた。よって IgM 型の aPL が長期に持続的陽性であることは、独立した血栓リスク因子である可能性があり、IgM 型の aPL がより長期的に陽性かどうかで、血栓ハイリスク症例を層別化できる可能性がある。

5.5 考察

APSにおけるIgM型aPLの意義に関しては、これまでいくつかの文献で検証されてきた。KelchtermansらはIgG型とIgM型のaPLの血栓リスクに関する文献レビューを行い、IgMアイソタイプよりもIgGアイソタイプの方が血栓合併症とより有意な相関を認めた (Kelchtermans et al., 2016)。しかしながら各患者においてIgG型とIgM型のaPLが両方測定されていない報告も多かったため、IgMアイソタイプの独立した血栓リスクの評価は困難であったと結論づけている。またaPLの検査には様々なアッセイが用いられていることから、検査基準の妥当性の比較が困難であったとも述べられている。それを踏まえ、2020年にChayouaらが報告した多施設研究では、APS患者と健常コントロールの検体を用いて、異なる検査アッセイごとにLA、IgG型aPL、IgM型aPLの血栓リスクを解析した (Chayoua et al., 2020)。その結果、IgMアイソタイプは妊娠合併症に関して独立したリスク因子であったものの、血栓症とは関連が示されなかった。しかしながらLAやIgG型aPL陽性に加えてIgM型aPL陽性の場合、血栓リスクのオッズ比が上昇することから、IgM型aPLは血栓リスクのより詳細な層別化に有益であると考察している。本研究においては、IgM型aPLの陽性はLAおよびIgG型aPL陽性との相関を示したことから、IgM型のaPLを測定することにより、複数のaPL陽性であるようなハイリスク症例を推定できる可能性がある。

上述の既報を含めて、これまで報告されたIgM型aPLに関する検証では、aPLに関してある一点または一定期間での測定値のみしか用いていないため、同一のアッセイを用いて、検体を長期間にわたって繰り返し測定することの意義についての検証は十分になされておらず、本研究はその点で新規性を持つ。我々の研究では、IgM型のaPLが2年以上にわたり持続的に陽性であるような症例では、IgM型aPLが血栓再発の独立したリスク因子である可能性が示唆された。

我々は以前に、APS患者におけるaPLの産生において、重要な役割を担っている細胞サブセットの同定を試みた (Hisada et al., 2019)。aPLを検出するために抗 β_2 GPI/HLAクラスII複合抗体アッセイで検討を行ったところ、IgM型の $\alpha\beta_2$ GPI/HLAクラスII複合抗体は、PBMCおよびCD20陽性B細胞を除去したPBMCの培養上清で検出されたが、CD20陰性B細胞を除去したPBMCの培養上清では検出されなかった。CD20陰性B細胞の中ではPlasmablastがその大多数を占めていることから、IgM型のaPL産生においてPlasmablastの関与が強く示唆された。よって、APS患者においてIgM型のaPLが長期に持続陽性であるような患者は、Plasmablastを主体と

した CD20 陰性 B 細胞が活性化され、IgM 型の aPL が長期に産生されていることが考えられる。本研究により IgM 型 aPL の長期持続陽性の意義が示唆されたとともに、B 細胞を標的とする新しい APS の治療戦略について、今後の更なる研究が望まれる。

本研究は複数の aPL の存在 (de Groot et al., 2005) や、LA, aCL, a β ₂GPI の全てが陽性の triple positive の患者 (Pengo et al., 2005) で血栓症発症リスクが著しく上昇することなどを根拠として、各群の血栓リスク因子の推定に IgM 型以外の aPL 陽性の割合や triple positive の割合を用いた。しかしながら血栓症に関するその他の潜在的な交絡因子（高血圧，糖尿病，脂質異常症）に関しては解析されておらず，結果に影響した可能性がある。

5.6 結語

IgM 型 aPL の持続陽性を確認することで血栓のリスク因子を認識することができる可能性が示唆された。また IgM 型 aPL を長期に複数回測定することで、より正確な血栓のリスク層別化を行うことができる可能性がある。

6. 結論

本研究では、第一章、第二章ともに APS に関する臨床研究を行った。第一章では、他疾患ではワルファリンにかわる抗凝固薬として汎用される第 Xa 因子阻害薬の APS における血栓再発予防に対する有効性と安全性について検証した。第二章では IgM 型の aPL に注目し、長期に持続陽性となることが血栓リスクとなりうるのか、そしてそれがどのような病態的意義を持つのかについて研究した。

本研究から得られた新知見は以下の通りである。

第一章

- ・第 Xa 因子阻害薬の APS における有効性と安全性について、5 年間の長期的なデータを得られた。
- ・triple positive のようなハイリスク症例に限らず、heterogenous な aPL profile を有する APS 患者で検証した。
- ・リバーロキサバンのみならずエドキサバン、アピキサバンの症例も含まれた患者群で検証した。
- ・ハイリスク症例以外においても第 Xa 因子阻害薬は推奨されない可能性がある。

第二章

- ・APS において IgM 型の aPL を長期間にわたって繰り返し測定することの意義について検証した。
- ・IgM 型の aPL を測定することにより、複数の aPL 陽性であるようなハイリスク症例を推定できる可能性がある。
- ・IgM 型の aPL が 2 年以上にわたり持続的に陽性であるような症例では、IgM 型 aPL が血栓再発の独立したリスク因子である可能性がある。

第一章では、APS におけるワルファリン以外の薬剤について検証することで、個々の患者背景に合わせた治療選択肢が増える可能性があるという点で、有意義な研究であったと考える。既報の知見を踏まえた上で、より長期の観察期間や heterogenous な aPL profile を有する APS 患者における検証を行うことができた。今後は血栓リスクを踏まえた上で、各患者に応じた抗血栓療法の種類、治療強度の適正化についてより詳細な検証が望まれる。

第二章では、持続的な IgM 型抗体が産生されているような患者では IgG 型を含めた他の aPL 陽性の割合が多く、血栓ハイリスクとなりうることを示した。また持続的な IgM 型の抗体産生がより長期にわたることで、それ自体が独立した血栓リスク因子となりうることが示唆された。今後、長期的な aPL の持続産生が血栓リスクや血栓形成の病態にどのように関わっているかがより明確に解明されていけば、APS に対する抗血栓療法のみならず免疫抑制療法などの新しい側面からの治療が検討される可能性がある。

本研究で得られた結果が、APS 治療の適正化、病態解明の一助となることを願う。

7. 謝辞

本論文は筆者が北海道大学大学院医学院 免疫・代謝内科学教室博士課程に在籍中の研究成果をまとめたものです。同教室教授 渥美達也先生には指導教官として本研究の実施の機会を与えていただき、その遂行にあたって終始、御指導をいただきました。ここに深謝の意を表します。

本教室膠原病グループ助教 藤枝雄一郎先生には本研究の遂行にあたり、終始、温かい御指導、適切な御助言を頂きました。ここに心より深く感謝の意を表します。

本研究を行うにあたり、第一章、第二章の臨床研究に御理解いただき、参加して頂いた APS 患者の方々のご協力により、APS における第 Xa 因子阻害薬の有効性や IgM 型の aPL の意義について報告することができました。本研究に御参加頂いた APS 患者の皆様は、ここに深謝の意を表します。

本教室膠原病グループ Olga Amengual 講師、加藤将講師、河野通仁助教には研究遂行にあたり日頃より有益な御討論、御助言を頂き、心より深く感謝を申し上げます。

大西直樹先生、中村浩之先生には臨床研究や論文作成にあたって多方面にわたり多大なるご支援やご指導を頂き、大変感謝しております。

工藤友喜大学院生は私が実験を始めた当初から実験の先輩としてサポートして頂き、大変感謝しております。

同期の大学院生の蜷川慶太先生、麻生邦之先生は臨床・研究のどちらにおいても深い知識と高い意欲を持っておられ、常に切磋琢磨しあえる大事な仲間でした。

また、ご卒業された嶋村早苗先生、河野通大先生、谷村瞬先生、柴田悠平先生、Lee Wenshi 先生、尾形裕介先生、阿部靖矢先生、狩野皓平先生、下山修平先生、大学院生の菅原正成先生、吉村大先生、竹山脩平先生、垂水政人先生、小住由衣先生、Jiang Wei 先生、多田真里亜先生、崎山広大先生、土田真央先生、安田充孝先生、守谷悠先生、西野慶先生はともに学び励ましあい大学院生活の支えとなってくださいました。心より感謝申し上げます。

また、本教室実験助手の金子由美子さん、石倉唯さんの御協力なしに実験を遂行することは不可能でした。心より感謝を申し上げます。この他にも、この論文作成にあたり、御協力、御助言、御支援をいただきました多くの諸先輩方、同僚、後輩、スタッフの皆様に対しまして、心より感謝を申し上げます。また、いつも暖かく見守り励ましてくれた家族に、心から感謝致します。

8. 利益相反

本研究に際し、開示すべき利益相反状態はない。

9. 引用文献

Agnelli, G., Buller, H.R., Cohen, A., Curto, M., Gallus, A.S., Johnson, M., Masiukiewicz, U., Pak, R., Thompson, J., Raskob, G.E., *et al.* (2013). Oral apixaban for the treatment of acute venous thromboembolism. *N. Engl. J. Med.* 369, 799-808.

Ambrozic, A., Avicin, T., Ichikawa, K., Kveder, T., Matsuura, E., Hojnik, M., Atsumi, T., Rozman, B., and Koike, T. (2002). Anti-beta(2)-glycoprotein I antibodies in children with atopic dermatitis. *Int. Immunol.* 14, 823-830.

Amengual, O., and Atsumi, T. (2018). Antiphospholipid syndrome, "the best prophet of the future". *Mod. Rheumatol.* 28, 409-416.

Amengual, O., Atsumi, T., Khamashta, M.A., Koike, T., and Hughes, G.R. (1996). Specificity of ELISA for antibody to beta 2-glycoprotein I in patients with antiphospholipid syndrome. *Br. J. Rheumatol.* 35, 1239-1243.

Amengual, O., Atsumi, T., and Koike, T. (2003). Specificities, properties, and clinical significance of antiprothrombin antibodies. *Arthritis Rheum.* 48, 886-895.

Amengual, O., Forastiero, R., Sugiura-Ogasawara, M., Otomo, K., Oku, K., Favas, C., Delgado Alves, J., Zigon, P., Ambrozic, A., Tomsic, M., *et al.* (2017). Evaluation of phosphatidylserine-dependent antiprothrombin antibody testing for the diagnosis of antiphospholipid syndrome: results of an international multicentre study. *Lupus* 26, 266-276.

Andreoli, L., and Tincani, A. (2012). Beyond the "syndrome": antiphospholipid antibodies as risk factors. *Arthritis Rheum.* 64, 342-345.

Arachchillage, D.R., Efthymiou, M., Mackie, I.J., Lawrie, A.S., Machin, S.J., and Cohen, H. (2015). Rivaroxaban and warfarin achieve effective anticoagulation, as assessed by inhibition of TG and in-vivo markers of coagulation activation, in patients with venous thromboembolism. *Thromb. Res.* 135, 388-393.

Arad, A., Proulle, V., Furie, R.A., Furie, B.C., and Furie, B. (2011). beta(2)-Glycoprotein-1 autoantibodies from patients with antiphospholipid syndrome are sufficient to potentiate arterial thrombus formation in a mouse model. *Blood* *117*, 3453-3459.

Atsumi, T., Amengual, O., Yasuda, S., and Koike, T. (2004). Antiprothrombin antibodies--are they worth assaying? *Thromb. Res.* *114*, 533-538.

Atsumi, T., Ieko, M., Bertolaccini, M.L., Ichikawa, K., Tsutsumi, A., Matsuura, E., and Koike, T. (2000). Association of autoantibodies against the phosphatidylserine-prothrombin complex with manifestations of the antiphospholipid syndrome and with the presence of lupus anticoagulant. *Arthritis Rheum.* *43*, 1982-1993.

Becarevic, M., Stojanovic, L., Ignjatovic, S., and Dopsaj, V. (2016). The IgM isotype of anti-annexin A5 antibodies and multiple positivity of conventional antiphospholipid antibodies: increasing the number of clinical manifestations of primary antiphospholipid syndrome. *Clin. Rheumatol.* *35*, 1361-1365.

Boffa, M.C., Boinot, C., De Carolis, S., Rovere-Querini, P., Aurousseau, M.H., Allegri, F., Nicaise-Roland, P., Barra, A., Botta, A., Ambrozic, A., *et al.* (2009). Laboratory criteria of the obstetrical antiphospholipid syndrome. Data from a multicentric prospective European women cohort. *Thromb. Haemost.* *102*, 25-28.

Brandt, J.T., Triplett, D.A., Alving, B., and Scharer, I. (1995). Criteria for the diagnosis of lupus anticoagulants: an update. On behalf of the Subcommittee on Lupus Anticoagulant/Antiphospholipid Antibody of the Scientific and Standardisation Committee of the ISTH. *Thromb. Haemost.* *74*, 1185-1190.

Chayoua, W., Kelchtermans, H., Gris, J.C., Moore, G.W., Musial, J., Wahl, D., de Groot, P.G., de Laat, B., and Devreese, K.M.J. (2020). The (non-)sense of detecting anti-cardiolipin and anti-beta2glycoprotein I IgM antibodies in the antiphospholipid syndrome. *J. Thromb. Haemost.* *18*, 169-179.

Cohen, H., Hunt, B.J., Efthymiou, M., Arachchilage, D.R., Mackie, I.J., Clawson, S., Sylvestre, Y., Machin, S.J., Bertolaccini, M.L., Ruiz-Castellano, M., *et al.* (2016). Rivaroxaban versus warfarin to treat patients with thrombotic antiphospholipid syndrome, with or without systemic

lupus erythematosus (RAPS): a randomised, controlled, open-label, phase 2/3, non-inferiority trial. *Lancet Haematol.* 3, e426-436.

de Groot, P.G., Lutters, B., Derksen, R.H., Lisman, T., Meijers, J.C., and Rosendaal, F.R. (2005). Lupus anticoagulants and the risk of a first episode of deep venous thrombosis. *J. Thromb. Haemost.* 3, 1993-1997.

De Laat, B., Derksen, R.H., Reber, G., Musial, J., Swadzba, J., Bozic, B., Cucnik, S., Regnault, V., Forastiero, R., Woodhams, B.J., *et al.* (2011). An international multicentre-laboratory evaluation of a new assay to detect specifically lupus anticoagulants dependent on the presence of anti-beta2-glycoprotein autoantibodies. *J. Thromb. Haemost.* 9, 149-153.

Del Ross, T., Ruffatti, A., Cuffaro, S., Tonello, M., Calligaro, A., Favaro, M., Facchinetti, M., Hoxha, A., and Punzi, L. (2015). The clinical relevance of the IgM isotype of antiphospholipid antibodies in the vascular antiphospholipid syndrome. *Thromb. Res.* 136, 883-886.

Edwards, J.C., and Cambridge, G. (2006). B-cell targeting in rheumatoid arthritis and other autoimmune diseases. *Nat. Rev. Immunol.* 6, 394-403.

Erkan, D., Vega, J., Ramon, G., Kozora, E., and Lockshin, M.D. (2013). A pilot open-label phase II trial of rituximab for non-criteria manifestations of antiphospholipid syndrome. *Arthritis Rheum.* 65, 464-471.

Finazzi, G., Brancaccio, V., Moia, M., Ciaverella, N., Mazzucconi, M.G., Schinco, P.C., Ruggeri, M., Pogliani, E.M., Gamba, G., Rossi, E., *et al.* (1996). Natural history and risk factors for thrombosis in 360 patients with antiphospholipid antibodies: a four-year prospective study from the Italian Registry. *Am. J. Med.* 100, 530-536.

Fujieda, Y., Atsumi, T., Amengual, O., Odani, T., Otomo, K., Kato, M., Oku, K., Kon, Y., Horita, T., Yasuda, S., *et al.* (2012). Predominant prevalence of arterial thrombosis in Japanese patients with antiphospholipid syndrome. *Lupus* 21, 1506-1514.

Galli, M., Luciani, D., Bertolini, G., and Barbui, T. (2003). Lupus anticoagulants are stronger risk factors for thrombosis than anticardiolipin antibodies in the antiphospholipid syndrome: a systematic review of the literature. *Blood* 101, 1827-1832.

Giron-Gonzalez, J.A., Garcia del Rio, E., Rodriguez, C., Rodriguez-Martorell, J., and Serrano, A. (2004). Antiphospholipid syndrome and asymptomatic carriers of antiphospholipid antibody: prospective analysis of 404 individuals. *J. Rheumatol.* *31*, 1560-1567.

Harris, E.N., Gharavi, A.E., Patel, B.M., and Hughes, G.R.V. (1987). Evaluation of the anti-cardiolipin antibody test: report of an international workshop held 4 April 1986. *Clin. Exp. Immunol.* *68*, 215-222.

Hisada, R., Kato, M., Sugawara, E., Kanda, M., Fujieda, Y., Oku, K., Bohgaki, T., Amengual, O., Horita, T., Yasuda, S., *et al.* (2019). Circulating plasmablasts contribute to antiphospholipid antibody production, associated with type I interferon upregulation. *J. Thromb. Haemost.* *17*, 1134-1143.

Hochberg, M.C. (1997). Updating the American College of Rheumatology revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* *40*, 1725.

Hokusai, V.T.E.I., Buller, H.R., Decousus, H., Grosso, M.A., Mercuri, M., Middeldorp, S., Prins, M.H., Raskob, G.E., Schellong, S.M., Schwocho, L., *et al.* (2013). Edoxaban versus warfarin for the treatment of symptomatic venous thromboembolism. *N. Engl. J. Med.* *369*, 1406-1415.

Investigators, E.-P., Buller, H.R., Prins, M.H., Lensin, A.W., Decousus, H., Jacobson, B.F., Minar, E., Chlumsky, J., Verhamme, P., Wells, P., *et al.* (2012). Oral rivaroxaban for the treatment of symptomatic pulmonary embolism. *N. Engl. J. Med.* *366*, 1287-1297.

Investigators, E., Bauersachs, R., Berkowitz, S.D., Brenner, B., Buller, H.R., Decousus, H., Gallus, A.S., Lensing, A.W., Misselwitz, F., Prins, M.H., *et al.* (2010). Oral rivaroxaban for symptomatic venous thromboembolism. *N. Engl. J. Med.* *363*, 2499-2510.

Jacobi, A.M., Mei, H., Hoyer, B.F., Mumtaz, I.M., Thiele, K., Radbruch, A., Burmester, G.R., Hiepe, F., and Dorner, T. (2010). HLA-DRhigh/CD27high plasmablasts indicate active disease in patients with systemic lupus erythematosus. *Ann. Rheum. Dis.* *69*, 305-308.

Jones, R.B., Tervaert, J.W., Hauser, T., Luqmani, R., Morgan, M.D., Peh, C.A., Savage, C.O.,

Segelmark, M., Tesar, V., van Paassen, P., *et al.* (2010). Rituximab versus cyclophosphamide in ANCA-associated renal vasculitis. *N. Engl. J. Med.* 363, 211-220.

Keeling, D., Mackie, I., Moore, G.W., Greer, I.A., Greaves, M., and British Committee for Standards in, H. (2012). Guidelines on the investigation and management of antiphospholipid syndrome. *Br. J. Haematol.* 157, 47-58.

Kelchtermans, H., Pelkmans, L., de Laat, B., and Devreese, K.M. (2016). IgG/IgM antiphospholipid antibodies present in the classification criteria for the antiphospholipid syndrome: a critical review of their association with thrombosis. *J. Thromb. Haemost.* 14, 1530-1548.

Khamashta, M.A., Cuadrado, M.J., Mujic, F., Taub, N.A., Hunt, B.J., and Hughes, G.R. (1995). The management of thrombosis in the antiphospholipid-antibody syndrome. *N. Engl. J. Med.* 332, 993-997.

Lim, W., Crowther, M.A., and Eikelboom, J.W. (2006). Management of antiphospholipid antibody syndrome: a systematic review. *JAMA.* 295, 1050-1057.

Miyakis, S., Lockshin, M.D., Atsumi, T., Branch, D.W., Brey, R.L., Cervera, R., Derksen, R.H., PG, D.E.G., Koike, T., Meroni, P.L., *et al.* (2006). International consensus statement on an update of the classification criteria for definite antiphospholipid syndrome (APS). *J. Thromb. Haemost.* 4, 295-306.

Nakamura, M., Nishikawa, M., Komuro, I., Kitajima, I., Uetsuka, Y., Yamagami, T., Minamiguchi, H., Yoshimatsu, R., Tanabe, K., Matsuoka, N., *et al.* (2015a). Apixaban for the Treatment of Japanese Subjects With Acute Venous Thromboembolism (AMPLIFY-J Study). *Circ. J.* 79, 1230-1236.

Nakamura, M., Wang, Y.Q., Wang, C., Oh, D., Yin, W.H., Kimura, T., Miyazaki, K., Abe, K., Mercuri, M., Lee, L.H., *et al.* (2015b). Efficacy and safety of edoxaban for treatment of venous thromboembolism: a subanalysis of East Asian patients in the Hokusai-VTE trial. *J. Thromb. Haemost.* 13, 1606-1614.

Ohl, K., and Tenbrock, K. (2015). Regulatory T cells in systemic lupus erythematosus. *Eur. J.*

Immunol. 45, 344-355.

Ohnishi, N., Fujieda, Y., Hisada, R., Nakamura, H., Kato, M., Oku, K., Bohgaki, T., Amengual, O., Yasuda, S., and Atsumi, T. (2019). Efficacy of dual antiplatelet therapy for preventing recurrence of arterial thrombosis in patients with antiphospholipid syndrome. *Rheumatology (Oxford)* 58, 969-974.

Otomo, K., Atsumi, T., Amengual, O., Fujieda, Y., Kato, M., Oku, K., Horita, T., Yasuda, S., and Koike, T. (2012). Efficacy of the antiphospholipid score for the diagnosis of antiphospholipid syndrome and its predictive value for thrombotic events. *Arthritis Rheum.* 64, 504-512.

Pengo, V., Biasiolo, A., Gresele, P., Marongiu, F., Erba, N., Veschi, F., Ghirarduzzi, A., de Candia, E., Montaruli, B., Testa, S., *et al.* (2007). Survey of lupus anticoagulant diagnosis by central evaluation of positive plasma samples. *J. Thromb. Haemost.* 5, 925-930.

Pengo, V., Biasiolo, A., Pegoraro, C., Cucchini, U., Noventa, F., and Iliceto, S. (2005). Antibody profiles for the diagnosis of antiphospholipid syndrome. *Thromb. Haemost.* 93, 1147-1152

Pengo, V., Denas, G., Zoppellaro, G., Jose, S.P., Hoxha, A., Ruffatti, A., Andreoli, L., Tincani, A., Cenci, C., Prisco, D., *et al.* (2018). Rivaroxaban vs warfarin in high-risk patients with antiphospholipid syndrome. *Blood* 132, 1365-1371.

Petzold, T., Thienel, M., Konrad, I., Schubert, I., Regenauer, R., Hoppe, B., Lorenz, M., Eckart, A., Chandraratne, S., Lennerz, C., *et al.* (2016). Oral thrombin inhibitor aggravates platelet adhesion and aggregation during arterial thrombosis. *Sci. Transl. Med.* 8, 367ra168.

Pierangeli, S.S., and Erkan, D. (2010). Antiphospholipid syndrome treatment beyond anticoagulation: are we there yet? *Lupus* 19, 475-485.

Radin, M., Cecchi, I., and Perez-Sanchez, C. (2017). Antiphospholipid antibodies negativization: time for testing for non-criteria aPL? *Lupus* 26, 1457-1458.

Rodriguez-Bayona, B., Ramos-Amaya, A., Perez-Venegas, J.J., Rodriguez, C., and Brieva, J.A. (2010). Decreased frequency and activated phenotype of blood CD27 IgD IgM B lymphocytes is a permanent abnormality in systemic lupus erythematosus patients. *Arthritis Res. Ther.* 12,

R108.

Ruffatti, A., Del Ross, T., Ciprian, M., Nuzzo, M., Rampudda, M., Bertero, M.T., Bergia, R., Caramaschi, P., Biasi, D., Capsoni, F., *et al.* (2009). Risk factors for a first thrombotic event in antiphospholipid antibody carriers. A multicentre, retrospective follow-up study. *Ann. Rheum. Dis.* 68, 397-399.

Ruiz-Irastorza, G., Egurbide, M.V., Ugalde, J., and Aguirre, C. (2004). High impact of antiphospholipid syndrome on irreversible organ damage and survival of patients with systemic lupus erythematosus. *Arch. Intern. Med.* 164, 77-82.

Sciascia, S., Murru, V., Sanna, G., Roccatello, D., Khamashta, M.A., and Bertolaccini, M.L. (2012). Clinical accuracy for diagnosis of antiphospholipid syndrome in systemic lupus erythematosus: evaluation of 23 possible combinations of antiphospholipid antibody specificities. *J. Thromb. Haemost.* 10, 2512-2518.

Talaat, R.M., Mohamed, S.F., Bassyouni, I.H., and Raouf, A.A. (2015). Th1/Th2/Th17/Treg cytokine imbalance in systemic lupus erythematosus (SLE) patients: Correlation with disease activity. *Cytokine* 72, 146-153.

Tektonidou, M.G., Andreoli, L., Limper, M., Amoura, Z., Cervera, R., Costedoat-Chalumeau, N., Cuadrado, M.J., Dorner, T., Ferrer-Oliveras, R., Hambly, K., *et al.* (2019). EULAR recommendations for the management of antiphospholipid syndrome in adults. *Ann. Rheum. Dis.* 78, 1296-1304.

Tektonidou, M.G., Laskari, K., Panagiotakos, D.B., and Moutsopoulos, H.M. (2009). Risk factors for thrombosis and primary thrombosis prevention in patients with systemic lupus erythematosus with or without antiphospholipid antibodies. *Arthritis Rheum.* 61, 29-36.

Yamada, N., Hirayama, A., Maeda, H., Sakagami, S., Shikata, H., Prins, M.H., Lensing, A.W., Kato, M., Onuma, J., Miyamoto, Y., *et al.* (2015). Oral rivaroxaban for Japanese patients with symptomatic venous thromboembolism - the J-EINSTEIN DVT and PE program. *Thromb. J.* 13, 2.

Zuily, S., de Laat, B., Mohamed, S., Kelchtermans, H., Shums, Z., Albesa, R., Norman, G.L.,

Lamboux-Matthieu, C., Rat, A.C., Ninet, J., *et al.* (2015). Validity of the global anti-phospholipid syndrome score to predict thrombosis: a prospective multicentre cohort study. *Rheumatology (Oxford)* 54, 2071-2075.

家子正裕, 高橋伸彦. (2013). 新規経口抗凝固療法における出血と虚血のリスク評価は可能か? *心電図* 33, 49-58.