OUKA
The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	悪性腫瘍患者における抗カルジオライピン抗体の産生-悪性腫瘍補助診断としての価値-
Author(s)	槇殿, 玲子; 神宮, 賢一
Citation	日本医学放射線学会雑誌. 1991, 51(1), p. 44-50
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/20059
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

日本医放会誌：51（1），44—50，1991（平3）

悪性腫瘍患者における抗カルジオライピン抗体の産生

—悪性腫瘍補助診断としての価値—

久留米大学医学部免疫学教室
槇　殿　玲　子
九州大学医学部放射線科学教室
神　宮　賢　一

（平成2年1月29日受付）
（平成2年5月28日最終原稿受付）

The Predictive Value of the Anti-Cardiolipin Antibody Test for Malignant Tumor

Reiko Makidono
Department of Immunology, Kurume University School of Medicine
Kenichi Jingu
Department of Radiology, Faculty of Medicine, Kyushu University

Research Code No. : 699

Key Words : Anti-cardiolipin antibody, Diagnosis of malignant tumor, ELISA

To determine the predictive value of the IgG anti-cardiolipin antibody test for malignant tumor, two groups of the patients of Kurume and Kyushu University Hospitals were examined by quantitative enzyme linked immunoadsorbent assay (ELISA) for their serum anti-cardiolipin antibodies. With the first group of the patients consisting of a mixture of benign diseases and malignant tumors, the antibody was positive at 57% (39/72). With the second, malignant tumor group, 38% (19/50) was positive for the antibody. When examined for the specificity of the antibodies by a binding inhibition assay, it was shown that the antibodies in the tumor patients were less specific to cardiolipin: antibodies to cardiolipin in tumor patients were blocked by the specific antigen, cardiolipin, in a lesser degree than those in the control shyphilis patients, and highly cross-reacted with 2 related phospholipids, i.e., phosphatidyl glycerol and phosphatidic acid. These findings obtained in this study suggest that ELISA for cardiolipin has the value for the tumor diagnosis, supplementing already established assays.

I. はじめに

リン脂質抗原は哺乳類の脳・肝・心などの臓器に多く，血漿中にも存在し，また，植物・細菌にも広く分布している．細胞レベルでのリン脂質はミトコンドリア表面に存在し水素の授受を行っている[1)2)]．

外来の，或いは自己のリン脂質が生体の免疫系により認識され，免疫反応が誘導されると，それに対する抗体が産生される．

リン脂質のうち，カルジオライピン（CL）やレシチン（Lec）に対する微量の抗体は，健常人の血清中にも検出される．抗カルジオライピン抗体が

上昇する疾患として，よく知られているのは梅毒である．梅毒の場合は，病原体であるTreponema pallidum（TP）の感染によりTPの成分（糖蛋白）に対する抗体とリン脂質に対する抗体が産生される[3]．梅毒に特異的な抗体は前者であるが，後者もTP中のCL，Lecの抗原刺激によって上昇するため，梅毒血清反応に役立てられている．

担癌状態では，腫瘍増殖に伴い組織破壊が起こり，更には放射線治療および制癌剤療法によってそれが促進される．したがって，増加した細胞質リン脂質抗原の免疫系組織への広範囲な分布と，担癌に伴う免疫機能の変化によって，自己成分であるCL抗原に対する免疫反応が発現し，抗カルジオライピン抗体が産生される可能性が考えられた．本研究では，治療の影響を除くために放射線治療開始前の悪性腫瘍患者について，抗カルジオライピン抗体の産生頻度を調べ，この抗体の腫瘍補助診断としての価値を検討することを目的とした．

II. 材料ならびに方法

症例：本研究のための症例は，久留米大学医学部および九州大学医学部付属病院外来および入院患者の中より選ばれた．

対象症例第1群は，悪性腫瘍（14）と良性疾患（58）を合せて72症例（男性40，女性32）からなる．良性疾患には既知の生物学的偽陽性反応を呈する疾患が含まれている．第2群は，悪性腫瘍のみ50症例（男性24，女性26）で，臓器別では多いものより肺癌（11）乳癌（8）消化器腫瘍（7）の順であった．その他に各種臓器の腫瘍が含まれている．対象症例第1群および第2群の健常コントロールは，それぞれの年齢分布と等しい献血者群の中より42人と50人を選んだ．

抗カルジオライピン抗体価の測定：ELISA法によった．方法を要約すると，固相化したリン脂質抗原に，被検血清を加えて室温で2時間培養し抗体を結合させる．その後，抗体をペルオキシダーゼ標識抗ヒト抗体と基質（O-phenylenediamine）により検出する[4)~6)]．Fig. 1 A，Bに，われわれの設定したアッセイ各ステップでの条件を示した．ELISAプレートはE.I.A. Microtitration plate

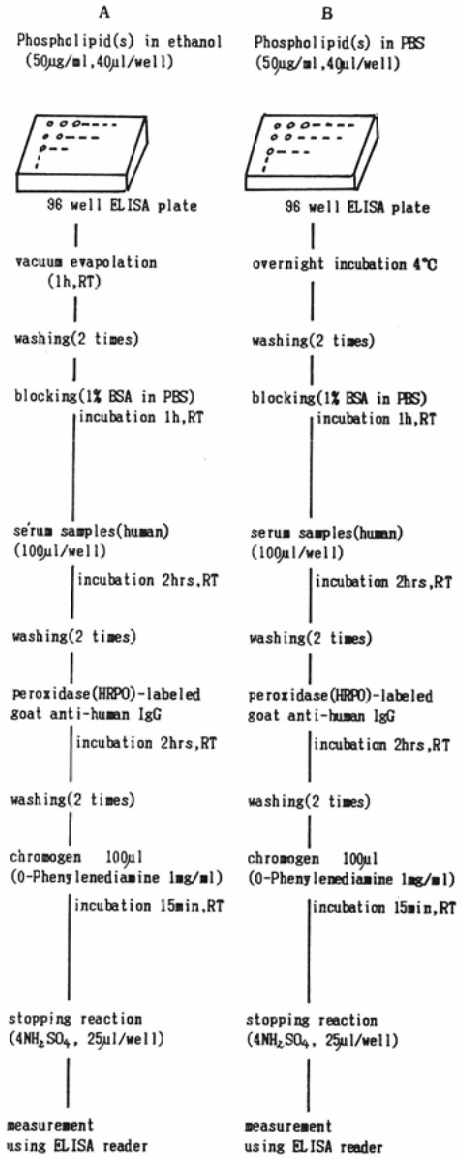

Fig. 1　ELISA methods for phospholipids

(Flow Laboratories, McLean, Virginia, U.S.A.)を使用した．方法AでもBでも，再現性のある同じ値が得られる．予備実験により抗体陽性の全ての血清においてIgM抗カルジオライピン抗体は陰性であったためIgG抗体のみを測定した．リン脂質抗原としては，Cardiolipin（Sigma社，No. C-1640），L-α-phosphatidyl-DL-Glycerol（Sigma社，No. P-6412），L-α-phosphatidic acid（Sigma社，No. P-4899）およびL-α-phosphatidylcholine

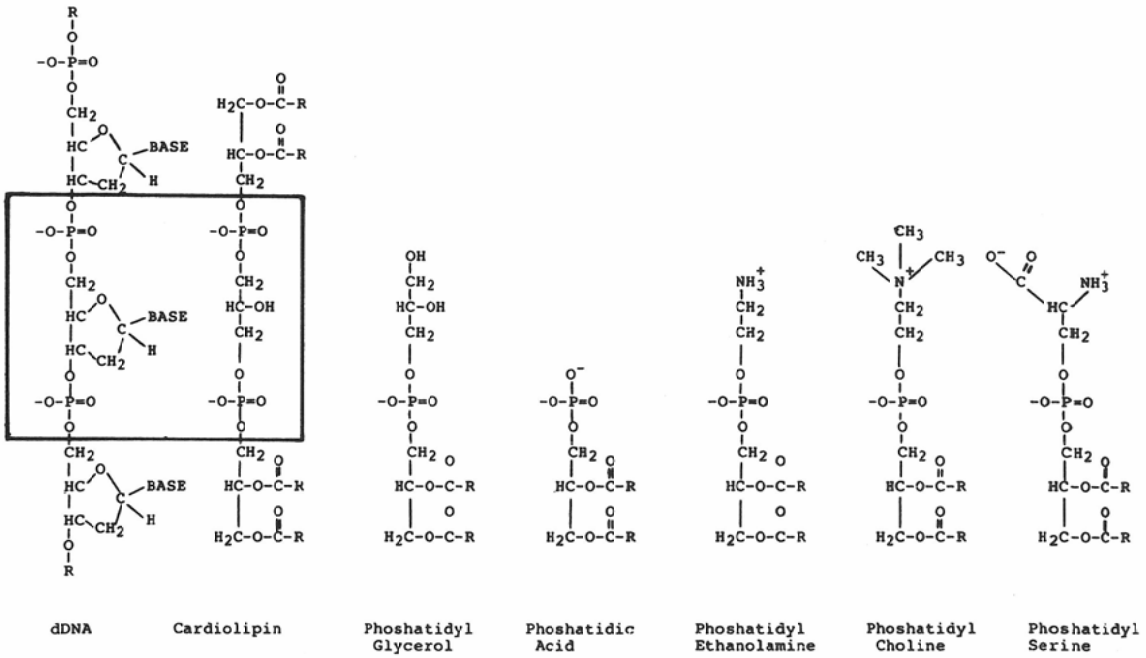

Fig. 2 Comparison of chemical structures of DNA and phospholipids

(L-α-Lecithin)(Sigma 社 No. P-5388)を使用した(Fig. 2). また抗体としては, Horseradish Peroxidase標識抗ヒトIgG抗体(Goat Anti-Human IgG-HRPO, Tago, Buringame, CA, USA)を使用した. 血清(検体)の2回以上の凍結融解は, リン脂質に対する抗体力価を著しく低下させるため, 1回のみとした. また, 悪性腫瘍の血清は, 未治療あるいは治療開始10日以内に採取したものについて測定した.

ヒト抗カルジオライピン抗体の cardiolipin, phosphatidyl glycerol あるいは phosphatidic acid による吸収とその効果判定: リン脂質による吸収は抗体を含むヒト血清50μlを, 当該リン脂質を結合(10μg/tube)させたガラス試験管に加え, 室温2時間培養することにより行った. 吸収効果の判定は各血清の吸収前と後の抗体価を用いて, 下記の数式により%inhibition(そのリン脂質が存在することによる抗カルジオライピン抗体活性の抑制)で表した.

$$\%\text{inhibition} = 1-\left(\frac{\text{吸収後抗カルジオライピン抗体価}}{\text{吸収前抗カルジオライピン抗体価}}\right)\times 100$$

統計学的有意差検定: t-分布検定によった.

III. 結 果

1. 悪性腫瘍患者における抗カルジオライピン抗体の産生: 悪性腫瘍を含む72症例(対象症例第1群)の抗カルジオライピン抗体価を測定し結果を Fig. 3 に示した. 抗体価(吸光度により表示)の平均値と標準誤差は0.44±0.20(男性0.42±0.18, 女性0.47±0.22)となり, 健常コントロール群の抗体価0.12±0.13(男性0.09±0.04, 女性0.15±0.17)に比し有意に上昇していた(いずれの組合せにおいても $p<0.001$). しかし, コントロールである梅毒患者群の抗体価0.39±0.58との間には有意差がなかった. なお, 男性患者と女性患者の平均値間には有意差がなかった. 次に, 悪性腫瘍のみの症例群(対象症例第2群)について抗カルジオライピン抗体価を測定した. この場合の抗体価平均値と標準誤差は0.41±0.24となり, 健常コントロール群の抗体価0.11±0.09に比し有意な上昇があった($p<0.001$). この患者群においても, 別々に集計した男性患者と女性患者の平均値間には有意差がなかった(データーは省略). 吸光度0.3以上(cut off 値)の ELISA 測定値を抗カ

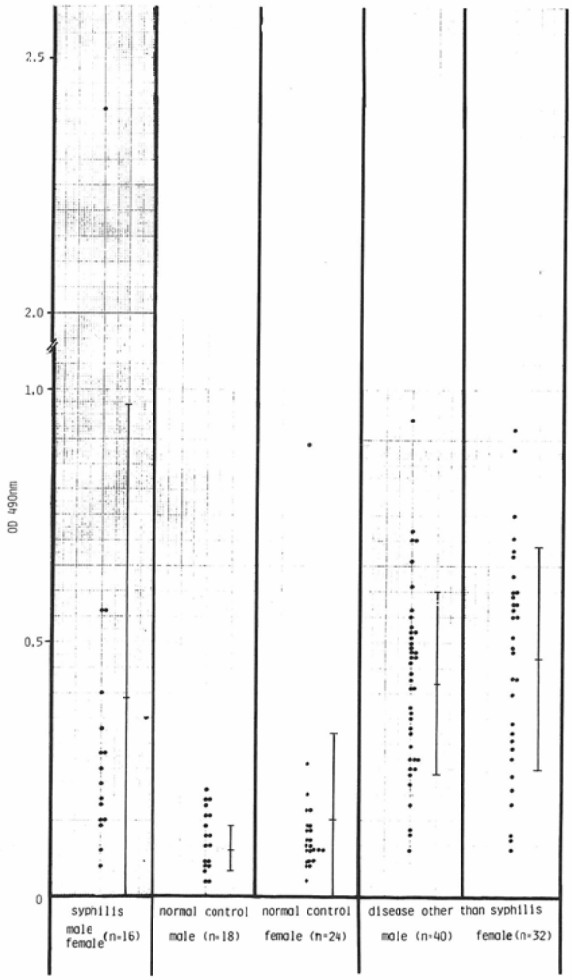

Fig. 3　Serum anti-cardiolipin levels in syphilis, normal individuals and group I patients with benign diseases or malignant tumor

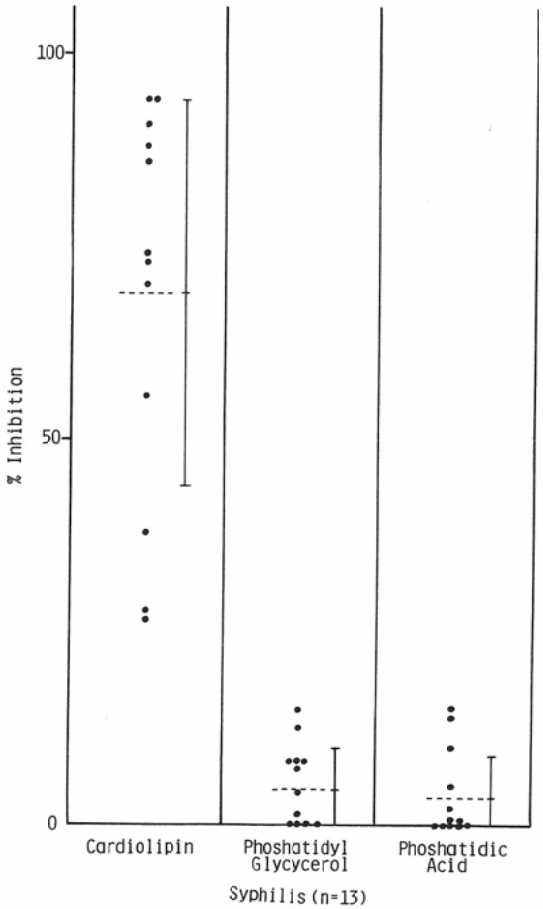

Fig. 4　Specificity of the anti-cardiolipin antibody of syphilis patients

ルジオライピン抗体陽性として抗体陽性率を求めると，対象症例第1群では57%（39/72），対象症例第2群では38%（19/50）であった．

2．悪性腫瘍患者で産生される抗カルジオライピン抗体の抗原特異性：対象症例第1群の中でとくに抗体価が高い（吸光度0.5以上）症例について抗カルジンオライピン抗体の他のリン脂質抗原すなわちphosphatidyl glycerolとphosphatidic acidとの交叉反応性を解析した．結果の判定は（材料および方法の項で記述したごとく）検体をCLあるいは上記のリン脂質抗原で吸収した後，抗CL抗体価を測定し吸収操作の抗CL抗体活性抑制の程度（%inhibition）により行った．コントロールである梅毒の抗カルジオライピン抗体はCLによる%inhibitionが高く，CL以外のリン脂質のそれは低い．すなわち抗原特異性が高いことが示された（Fig. 4）．これに比べて，梅毒以外の疾患（そのうち悪性腫瘍14/24）では，抗CL抗体のCLによる%inhibitionは低く，他の脂質によるそれは高い．すなわち交叉反応性が高く，抗原特異性の低下が認められた（Fig. 5）．対象症例第2群（悪性腫瘍のみの症例群）での同様の検索においても，著明な交叉反応性が認められた（Fig. 6）．したがって，悪性腫瘍で産生される抗カルジオライピン抗体は，他のリン脂質抗原とも広く反応するIgG抗体であることが示された．

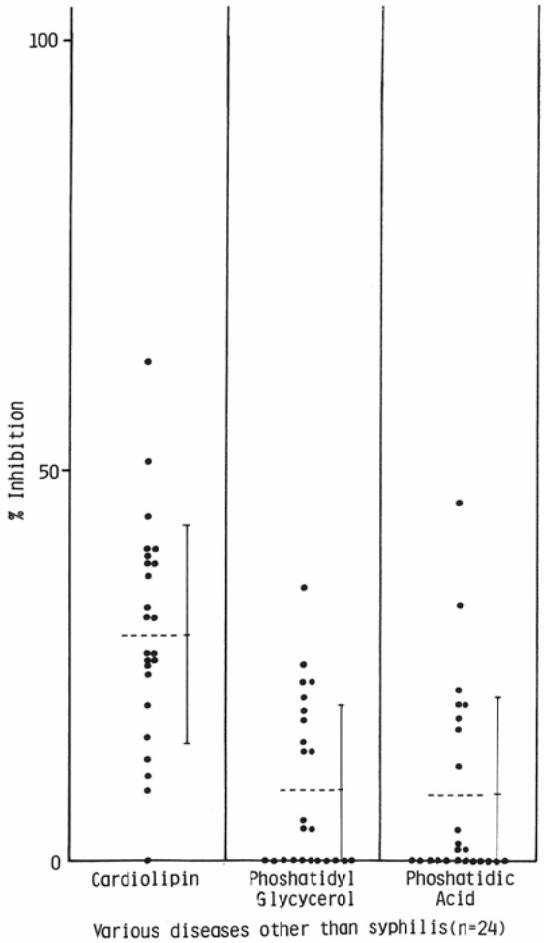

Fig. 5 Specificity of the anti-cardiolipin antibody of group I patients with benign diseases or malignant tumor

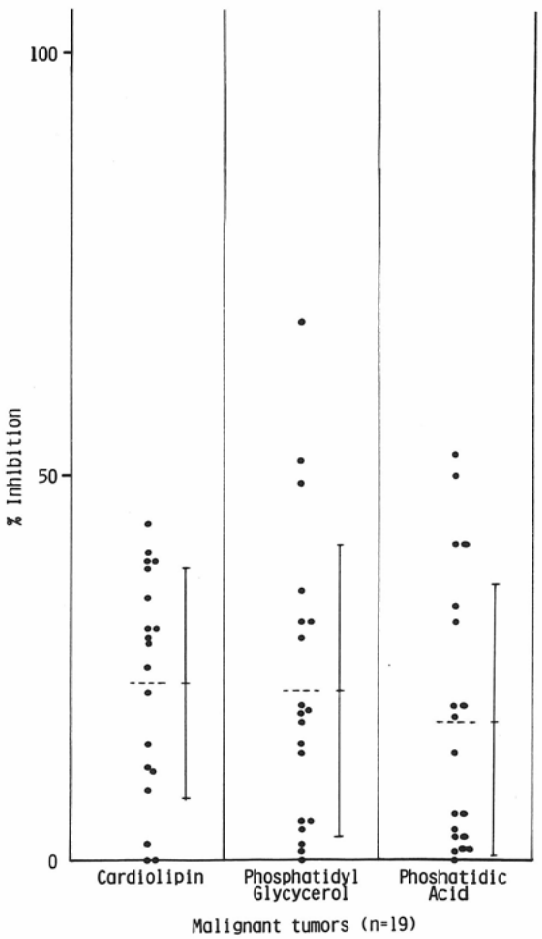

Fig. 6 Specificity of the anti-cardiolipin antibody of tumor patients

IV. 考　察

リン脂質の中で特にカルジオライピンに対する抗体価の高いものを臨床的に抗カルジオライピン症候群（anti-cardiolipin antibody symdrome）としてまとめている[7]．そして，梅毒以外の疾患で非特異的にCL陽性反応を呈するものを生物学的偽陽性反応(Biologic false positive reaction, BFPR)と呼んでいる．この偽陽性率は平均1.6%で，20～30歳のとくに女性に多い．BFPRを呈する疾患として全身性エリテマトーデス(SLE)や慢性関節リウマチなどの自己免疫疾患，肝疾患および伝染性肝炎，伝染性単核症，異型肺炎，ワイル病，発疹チフス，麻疹，水痘などの感染症が挙げられる．また，予防接種(種痘，日本脳炎，インフルエンザなど組織培養によって作られたワクチンを用いたとき)の後にもBFPRが出ることがある．感染症および予防接種後のBFPRは，細菌あるいはワクチン中に不純物として微量に含まれる細胞中のミトコンドリアのリン脂質が抗原となるものと考えられている．全身性エリテマトーデスなどの自己免疫疾患では，抗リン脂質抗体価が上昇すると同時に，動静脈血栓，血小板減少，lupus anticoagulant陽性などが認められる[4)5)8)]．これらの，すでに知られている生物学的偽陽性反応を呈する疾患を合併した症例は勿論本研究の対象症例第2群より除外した．それにもかかわらず，未治療悪性腫瘍症例の38%（19/50）に抗カルジオライピン

抗体が検出された．したがってこの抗体の測定は，悪性腫瘍の補助的診断として充分に役立つことが考えられる．

近年，抗カルジオライピン抗体の鋭敏な測定法としてラジオイムノアッセイ（RIA）や酵素免疫測定法（ELISA）が開発された[4)~6)]．そして，同一のリン脂質あるいは化学構造の異なるリン脂質（Fig. 2 参照）に対する抗体のそれぞれが認識するepitopeの違いや交叉反応性も解析できるようになった[9)10)]．その結果，例えばlupus anticoagulant（個々の凝固因子の活性は抑制しないが，リン脂質依存性の凝固検査を種々の程度に阻害する免疫グロブリン）が認識するepitopeは，リン脂質の中のphosphatidyl serineであることが示唆されている．今回の目的以外にもELISA法あるいはRIA法による抗カルジオライピン抗体の測定は，放射線診断の対象となるいくつかの疾患，例えば血栓症や脳血管傷害などの補助的検査としてその有用性が示唆されている[4)11)]．

悪性腫瘍患者で産生された抗カルジオライピン抗体は，他の複数のリン脂質とも交叉反応することが示された．この特性は全身性エリテマトーデスなどの自己免疫疾患で産生される同抗体の特性と共通している[9)10)]．しかし悪性腫瘍患者の抗体は，自己免疫疾患で産生される抗体と異なりDNAとは交叉反応しなかった（データーは示していない）．

悪性腫瘍で抗カルジオライピン抗体が産生されるメカニズムは推定の域を出ない．直接，遊離した自己の抗原が抗体産生を誘導する可能性は否定出来ない（一次免疫反応）．また，前以って感染症の病原体などのもつ外来リン脂質抗原に感作されていると，自己CLによる抗体産生が容易になることが考えられる（二次免疫反応）．一般に二次免疫反応ではIgG抗体がIgM抗体よりも優位であることを特徴とするが，今回の検索では抗カルジオライピン抗体は主にIgG抗体であった．これはこの可能性を示唆する．

抗カルジオライピン抗体の産生は，担癌にもとずく免疫機能の変化と，腫瘍による組織破壊―リン脂質抗原の露出―その広範囲な免疫組織への分布などが相俟って発現した，自己免疫反応として把えることが出来る．自己抗体の陽性率は，いくつかの条件により左右される．まず，自己成分（CL）に対する免疫反応性は存在しているはずであるが，通常は抑制されているものと考えられる．それが発現する1つのメカニズムとしては，抑制性T細胞の機能低下があり[12)]，免疫反応（抗体産生）を促進する結果となる（抗体陽性率の上昇）．また他の多くの抗原と同様に，この抗原に対する免疫応答も免疫応答遺伝子の調節を受けていることが考えられる．低応答性あるいは無反応性の個体では事実上抗体産生はない（抗体陽性率の低下）．さらに，放射線治療，制癌剤投与あるいは腫瘍特異（関連）抗原に対する認識を増強する目的で使用される各種BRM（biological response modifiers）は，いずれも自己抗体の陽性率を変動させる要因となりうる．この場合に，抗体価の変動は個体免疫機能の変化を反映するため，それを探知する1つの指標としても有用であろう．

抗カルジオライピン抗体が病因となる疾患の中で，その合併により腫瘍治療効果を著しく低下させるものとして，血栓症と血小板減少症を挙げることが出来る．抗カルジオライピン抗体（特にIgGクラス）が存在すると，脳血栓症，網膜血栓症，肺梗塞，腎静脈血栓症，深部静脈血栓症などが起こりやすくなることが報告されている[13)14)]．そのメカニズムはこの抗体が血管内皮細胞に反応したあと，局所のプロスタサイクリン産生が低下し，血小板凝集と血栓形成が促進される結果であると説明されている．血小板減少症に関しては，抗カルジオライピン抗体が血小板膜上のリン脂質に結合すると，血小板が網内系に取り込まれやすくなり，そこで破壊が亢進するためであると考えられている[8)]．抗カルジオライピン抗体陽性悪性腫瘍症例の26%（5/19）には，担癌末期にDICが合併したがその相互関係についてはさらに検討を要する．

V. まとめ

1. 放射線治療前の悪性腫瘍患者について，抗カルジオライピン抗体の産生頻度を調べた．その結果，38%（19/50）の患者において他のリン脂質抗

原とも広く反応するIgG抗カルジオライピン抗体が検出された.

2. 現在, 腫瘍の血清学的診断は, 複数の腫瘍マーカーに対する検査を組合わせて行い, その総合判定による場合が多い. 腫瘍治療開始前の抗カルジオライピン抗体の測定は, 悪性腫瘍の総合的な診断能を亢める1つ検査として, 有用であるものと考えられる.

3. 放射線治療開始後の抗カルジオライピン抗体価の変動は, 個体免疫機能の変化を反映するため1つの指標として役立つことが考えられる.

本研究の一部は, 日立化成工業株式会社の研究助成によったことを附記する. また, 教室の兼行貴子, 岩丸哲子, 古賀公子諸氏の研究補助に対し謝意を表します.

文 献

1) Alberts B, Bray D, Lewis J, et al.: eds, 中村桂子, 松原謙一 監訳: 細胞の分子生物学. p351, p486 および p540, 1985, 教育社
2) Meroni PL, Harris EN, Brucato A, et al.: Anti-mitochondrial type M5 and anticardiolipin antibodies in autoimmune disorders: Studies on their association and crossreactivity. Clin Exp Immunol 67: 484—491, 1987
3) Joklik WK, Willett HP, Amos DB, eds: Microbiology, 7th ed, p872, 1980, Appleton-Century-Crofts—New York
4) Harris EN, Gharavy AE, Boey ML, et al.: Anticardiolipin antibodies: Detection by radioimmunoassay and association with thrombosis in systemic lupus erythematosus. Lancet 2: 1211—1214, 1983
5) Harris EN, Gharavi AE, Patel SP, et al.: Evaluation of the anticardiolipin antibody test: Report of an International workshop held 4 April 1986. Clin Exp Immunol 68: 215—222, 1987
6) Gharavi AE, Harris EN, Asherson RA, et al.: Anticardiolipin antibodies: Isotype distribution and phospholipid specificity. Ann Rheum Dis 46: 1—6, 1987
7) Hughes GR, Harris EN, Gharavi AE.: The anticardiolipin syndrome. J Rhematol 13: 486—489, 1986
8) Harris EN, Gharavi AE, Hegde U, et al.: Anticardiolipin antibodies in autoimmune thrombocytopenic purpura. Br J Haematol 59: 231—234, 1985
9) Lafer EM, Rauch J, Andrzejewski C, et al.: Polyspecific monoclonal lupus autoantibodies reactive with both polynucleotides and phospholipids. J Exp Med 153: 897—909, 1981
10) Meyer O, Cyna L, Bourgeois P, et al.: Profile and cross-reactivities of antiphospholipid antibodies in systemic lupus erythematosus and syphilis. Clin Rhematol 6: 369—377, 1987
11) Levine SR, Kim S, Deegan MJ, et al.: Ischemic stroke associated with anticardiolipin antibodies. Stroke 18: 1101—1106, 1987
12) Morimoto C, Steinberg AD, Letvin NL, et al.: A defect of immunoregulatory T-cell subsets in systemic lupus erythematosus patient demonstrated with anti-2H4 antibody. J Clin Invest 79: 762—768, 1987
13) Carreras LO, Defreyn G, Machin SJ, et al.: Arterial thrombosis intrauterine death and 'lupus' anticoagulant: Detection of immunoglobulin interfering with prostacyclin formation. Lancet 1: 244—246, 1981
14) Vermylen J, Blockmans D, Spitz B, et al.: Thrombosis and immune disorders. Clin Haematol 15: 393—412, 1986