

# Studies on Binding Capacity of Anticardiolipin Antibodies to Human Umbilical Vein Endothelial Cells

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	<a href="http://hdl.handle.net/2297/8420">http://hdl.handle.net/2297/8420</a>

## 抗カルジオリピン抗体の血管内皮細胞に 対する結合能に関する検討

金沢大学医学部内科学第二講座 (主任: 竹田亮祐教授)

川 野 充 弘

(平成5年1月18日受付)

抗カルジオリピン抗体 (anticardiolipin antibody, aCLA) は, 抗リン脂質抗体症候群の発症に直接関与していると考えられている抗体であるが, その血栓発症の機序はまだ十分に解明されていない. そこで, aCLA が血管内皮細胞に直接結合するか否か, また酵素免疫測定法を用いた aCLA の測定に補助因子として重要と考えられている  $\beta$  2 糖蛋白 I ( $\beta$ 2-glycoprotein I,  $\beta$ 2GPI) が, aCLA と内皮細胞との結合においても重要な役割を果たすか否かを検討するため, 全身性紅斑性狼瘡 (systemic lupus erythematosus, SLE) 患者, 抗リン脂質抗体症候群 (antiphospholipid syndrome, APS) 患者を対象に, 免疫グロブリン G クラス (immunoglobulin G, IgG) の aCLA と抗血管内皮細胞抗体 (antiendothelial cell antibody, AECA) を測定し比較検討した. 更に, 両抗体が高値である血清より精製した aCLA およびカルジオリピン固相化カラムにより aCLA を吸収した血清を用いて両抗体の異同を検討し, 精製 aCLA について  $\beta$ 2GPI の有無による血管内皮細胞への結合能を検討した. また, aCLA が高値でも血栓症を認めない患者も存在することから, 血栓症を起こした患者と起こさなかった患者の血清より精製した IgG aCLA を用いて, 血栓症の有無により IgG aCLA の荷電状態に相違があるかどうかを等電点電気泳動 (isoelectric focusing, IEF) により検討した. AECA は, ヒト臍帯静脈内皮細胞を96穴のプレートに固相化した酵素免疫測定法 (cellular enzyme linked immunosorbent assay, 細胞 ELISA 法) により測定し, 抗体価は本抗体を多量に含む血清を標準血清とし, これに対する%で示した. APS および APS を伴わない SLE において, IgG aCLA および IgG AECA の両抗体価は相関せず, また両抗体価が強陽性の4症例においても IgG aCLA と IgG AECA は分離可能であり, 検討した症例の中で IgG aCLA と IgG AECA が同一抗体の交差反応性の可能性を示唆するものは1例も認められなかった. 次に, APS 3例, APS を伴わない SLE 1例より IgG aCLA をアフィニティー法により分離精製し, IEF にて荷電状態を検討したところ, いずれも pH 6-8 に分布し, 血栓症の有無で差は認められなかった. また,  $\beta$ 2GPI を精製し, ウサギ抗ヒト  $\beta$ 2GPI 抗体を作成し,  $\beta$ 2GPI の血管内皮細胞への結合能を細胞 ELISA 法にて検討したところ,  $\beta$ 2GPI は, 濃度依存性に血管内皮細胞に結合した. 更に, 両抗体が強陽性である一次性 APS の1例において, IgG aCLA をカルジオリピンを用いたアフィニティー法により精製し,  $\beta$ 2GPI の存在下での内皮細胞への結合能を検討したところ, 精製した IgG aCLA は,  $\beta$ 2GPI 非存在下では, 内皮細胞に結合しなかったが,  $\beta$ 2GPI 存在下に内皮細胞に結合する傾向を示した. 従って, 多くの症例において IgG aCLA と IgG AECA は別の抗体であり, IgG aCLA は,  $\beta$ 2GPI を介して血管内皮細胞に結合することが示された. 以上の結果より, aCLA は  $\beta$ 2GPI を介して内皮細胞に結合し, これが, 内皮細胞の機能に何らかの影響を与えることにより, 血栓症の発症に関与している可能性が示唆された.

**Key words** anticardiolipin antibody, endothelial cell, antiendothelial cell antibody, antiphospholipid syndrome,  $\beta$ 2-glycoprotein I

抗リン脂質抗体症候群 (antiphospholipid syndrome, APS) とは, 血清中にカルジオリピンをはじめとする陰性荷電を帯びたリン脂質に対する抗体もしくは, 循環性抗凝血素 (lupus anticoagulant, LAC) を認め, 動脈血栓症, 静脈血栓症, 習慣性流産, 血小板減少症等の血栓症を中心とした多彩な臨床症状をもつ疾患に対する総称である<sup>1)2)</sup>. 高力価の抗リン脂質抗体をもつ症例ほど血栓症を起こす頻度が高いことや, 実験的に APS 患者より精製した免疫グロブリン G クラス (immunoglobulin

G, IgG) やモノクローナル抗カルジオリピン抗体等をマウスに注射すると流産を引き起こすことから, 今日までに抗リン脂質抗体, 特に, 抗カルジオリピン抗体 (anticardiolipin antibody, aCLA) 自体が, 直接血栓症に関与している可能性を示唆する報告が, 数多くなされてきた<sup>3)4)</sup>. 近年, aCLA の多くは, カルジオリピン等の陰性荷電を帯びたリン脂質のみを認識するのではなく, 血清中の糖蛋白である  $\beta$  2 糖蛋白 I ( $\beta$ 2-glycoprotein I,  $\beta$ 2GPI) とカルジオリピンの複合体を認識することが明らか

Abbreviations: aCLA, anticardiolipin antibody; AECA, antiendothelial cell antibody; APS, antiphospholipid syndrome; BFP, biologic false positive;  $\beta$ 2GPI,  $\beta$ 2-glycoprotein I; ELISA, enzyme linked immunosolvent assay; IEF, isoelectric focusing; IgG, immunoglobulin G; LAC, lupus anticoagulant; OPD, o-phenylenediamine; PBS, phosphate-buffered saline; SLE, systemic lupus erythematosus; TBS, tris-buffered saline

となり、血栓症の発症に対する  $\beta 2$ GPI の関与が注目されるようになった<sup>79)</sup>。また、全身性紅斑性狼瘡 (systemic lupus erythematosus, SLE) 患者では、高頻度で血清中に血管内皮細胞の細胞膜成分と反応する抗血管内皮細胞抗体を持つこと<sup>80)</sup>、実験的に作成したモノクローナル抗カルジオリピン抗体の一部は、血管内皮細胞に結合するものがあること<sup>11)</sup>などの成績から、抗カルジオリピン抗体自体が直接血管内皮細胞に結合して血栓形成を来す可能性が示唆されている。しかしながら、患者血中の抗カルジオリピン抗体が血管内皮細胞に結合し得るか否かを実際に検討した成績はなく、補助因子としての  $\beta 2$ GPI の生体内での役割も明らかにされてはいない。

そこで、本研究はこの点に着目し、抗カルジオリピン抗体と抗血管内皮細胞抗体との異同を精製した抗カルジオリピン抗体およびカルジオリピン固相化カラムで抗カルジオリピン抗体を吸収した患者血清を用いて検討し、抗カルジオリピン抗体が  $\beta 2$ GPI を介して血管内皮細胞に結合し得ることを示唆する成績を得たので報告する。

### 対象および方法

#### I. 対 象

血栓症を認めない SLE 患者 24 例 (年齢は 16 才から 69 才で、男性 3 例、女性 21 例；入院中の活動性 SLE 12 例、外来にてステロイドの維持療法を行っている SLE 12 例)、APS 患者 3 例 (うち SLE に合併した二次性 APS 1 例、原発性 APS 2 例；年齢は 15 才から 65 才で、男性 1 例、女性 2 例) を対象に抗カルジオリピン抗体、抗血管内皮細胞抗体の測定を行った。また、抗カルジオリピン抗体については、各種膠原病においても測定し、比較検討した。

#### II. 抗カルジオリピン抗体、抗フォスファチジルセリン抗体の測定

カルジオリピン (SIGMA, St. Louis, USA)、フォスファチジルセリン (SIGMA) をそれぞれエタノール (和光、大阪) で 50  $\mu$ g/ml の濃度に希釈し、96 穴マイクロプレート (CORNING, New York, USA) に 50  $\mu$ l/well ずつ入れ、風乾した。次に、1% ウン血清アルブミン含有リン酸緩衝生理食塩水 (phosphate-buffered saline with 1% bovine serum albumin, 1% PBS-A) を 50  $\mu$ l ずつ各 well に入れ、37°C、一時間ブロッキングを行った。続いて、血清を 5% ウン胎児血清 (fetal bovine serum, FBS) (GIBCO, New York, USA) を含む PBS で 50 倍に希釈し、Harris より購入した標準血清を用いて、酵素免疫測定法 (enzyme linked immunosorbent assay, ELISA 法) にて抗カルジオリピン抗体価を測定した。抗フォスファチジルセリン抗体は、標準血清がないため、基質である *o*-フェニレンジアミン (*o*-phenylenediamine, OPD) (和光) を発色させた際の OD 492nm の吸光度で抗体価の代用とした。

#### III. 血管内皮細胞の培養

ヒト臍帯静脈より内皮細胞を以下のように分離し培養した。臍帯静脈をヘパリン加生理食塩水にて灌流後、0.25% トリプシン (和光)、0.02% エチレンジアミン四酢酸二ナトリウム (ethylenediamine-tetraacetic acid, disodium salt, EDTA $\cdot$ 2Na) (和光) を含むハンクス液 (Hanks balanced salt solution) (SIGMA) にて内皮細胞を分離し、血管内皮細胞増殖培地 BSL-E300 (極東製薬、東京) にて初代培養を開始した (図 1)。

#### IV. 抗血管内皮細胞抗体価の測定

抗血管内皮細胞抗体の測定は、以下のようにヒト臍帯静脈内皮細胞を 96 穴のプレートに固相化した酵素免疫測定法 (cellular enzyme linked immunosorbent assay, 細胞 ELISA 法) にて行った。まず、96 穴マイクロプレート (CORNING) に 3 から 5 継代目の血管内皮細胞をコンフルエントになるまで培養した後風乾し、3% パラフォルムアルデヒド (和光)、8% 蔗糖 (和光) にて固定を行った後、3% PBS-A を 100  $\mu$ l ずつ各 well に入れ、37°C にて、一時間ブロッキングを行った。続いて 1% PBS-A で 1000 倍に希釈した患者血清を 50  $\mu$ l ずつ各 well に入れ、37°C、一時間インキュベートした後、0.05% Tween 20 (和光) を含む PBS (PBS-Tween) にて 3 回洗浄を行い、更に、1000 倍希釈したペルオキシダーゼ標識ヤギ抗ヒト IgG (CAPPEL, West Chester, USA) を 50  $\mu$ l ずつ各 well に入れ、37°C、一時間インキュベートを行った。次に、PBS-Tween にて 5 回洗浄し、OPD を基質として発色させ、OD 492nm の吸光度を測定した。

#### V. カルジオリピン固相化カラムにおける吸着試験

抗カルジオリピン抗体および抗血管内皮細胞の両方が高値であった原発性抗リン脂質抗体症候群 1 例、二次性抗リン脂質抗体症候群 1 例、血栓症を伴わない SLE 患者 2 例の計 4 例 (図 2 の  $\odot$  の 4 例) を対象にした。両抗体が同一抗体の交差反応性である可能性を検討するため、これらの患者血清をポリスチレンのビーズにカルジオリピンを固相化したカラムにかけ、抗カルジオリピン抗体と共に抗血管内皮細胞抗体が吸収されるかどうかを吸着後の血清の両抗体価を測定することにより検討した。

#### VI. aCLA の分離精製と等電点電気泳動

原発性抗リン脂質抗体症候群 2 例、SLE に合併した二次性抗リン脂質抗体症候群 1 例、抗リン脂質抗体症候群を合併しない SLE 患者 1 例 (IgG aCLA 70 GPL 単位) の血清を用いて aCLA の分離精製を行った。すなわち、カルジオリピン (SIGMA)、フォスファチジルコリン (SIGMA)、コレステロール (和光) を 2.5:10:4 のモル比で混合し乾燥させ、これに、カルジオリピンの濃度が 3mg/ml となるように患者血清を加えて一時間、37°C でインキュベートした。その後、トリスバッファー (tris-buffered saline, TBS; 0.05mol/l tris, 0.1mol/l NaCl, pH 7.4) (SIGMA) にて 5 倍に希釈し、10°C、20000 g で 15 分間遠心した。沈渣を TBS にて 3 回洗浄後、2% の *n*-octyl- $\beta$ -D-glucopyranoside (SIGMA) を含む TBS (2% octylg-

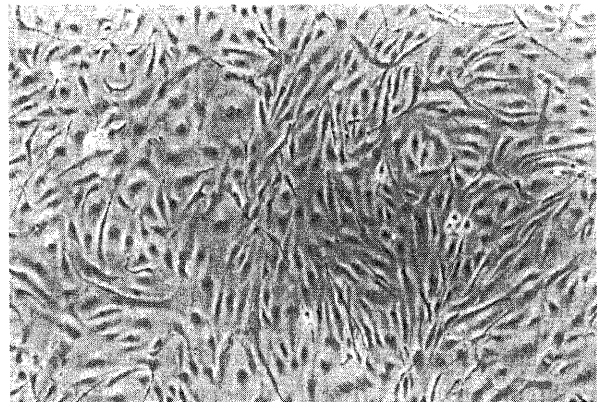


Fig. 1. Phase contrast microscopy of human umbilical endothelial cells confluent fixed in culture flask.  $\times 100$ .

lucoside TBS) に溶かし、カルジオリピンの最終濃度が 3mg/ml となるようにした。これをプロテイン A (protein A sepharose CL 4B) (PHARMACIA, Uppsala, Sweden) アフィニティークラムにかけ 2% octylglucoside TBS にて洗浄し脂質を除去した後、1mol/l の酢酸 (和光) にて溶出中和し、透析した後 IgG aCLA を回収した。これらの IgG aCLA を対象に、pH 3.5-9.5 のアンフォライト (Ampholine PAG Plate) (PHARMACIA) を用いて等電点電気泳動を行った。

Ⅶ.  $\beta$ 2GPI の分離精製と抗  $\beta$ 2GPI 抗体の作製

$\beta$ 2GPI は、Polz らの方法<sup>13)</sup>により分離精製した。ヒトプール血清にリバノール (diamino-ethoxyacridine lactate) (和光) を 0.84g/100ml の濃度で加え、10% 無水炭酸ナトリウム ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) (和光) にて pH を 8.0 に調整した後 10 分間攪拌し遠心して上清を回収した。この上清に塩化ナトリウム (NaCl) (和光) を 5g/100ml の濃度で加え、1 M 塩酸 (和光) にて pH を 7.0 に調整した後、10 分間攪拌し遠心して上清を回収した。この上清に過塩素酸 (70%  $\text{HClO}_4$ ) (和光) を 100ml につき 3ml ずつ加え -2℃ にて 10 分間攪拌後、冷却遠心して上清を回収した。これを 10%  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  で pH 7.0 に中和しトリス塩酸バッファー (0.01M, pH 8.0) (SIGMA) で透析した後、ヘパリンセファロースカラム (PHARMACIA) にてアフィニティークロマトグラフィーを行い、0.2M NaCl トリス塩酸バッファー (0.01 M, pH 8.0) で洗浄した後、0.3M NaCl トリス塩酸バッファー (0.01M, pH 8.0) にて溶出してくる分画を回収し、抗  $\beta$ 2GPI 抗体を用いたオクタロニー法により  $\beta$ 2GPI が含まれていることを確認した。更に、ドデシル硫酸ナトリウムポリアクリルアミドゲル電気泳動 (sodium dodecylsulfate polyacrylamide gelelectrophoresis, SDS-PAGE) にて 50kD の一本のバンドを確認した。上記のように精製したヒト  $\beta$ 2GPI をフロント完全アジュバント (SIGMA) とともにウサギに免疫し、ウサギ抗ヒト  $\beta$ 2GPI ポリクローナル抗体を得た。

Ⅷ.  $\beta$ 2GPI の血管内皮細胞に対する結合能の検討と抗カルジオリピン抗体の  $\beta$ 2GPI を介した血管内皮細胞に対する反応性の検討

細胞 ELISA 法に準じて、臍帯静脈内皮細胞を 96 穴マイクロプレートにコンフルエントになるまで培養後、固定、ブロッキングを行った。続いて、上記のように精製した  $\beta$ 2GPI を濃度をかけて 37℃、一時間反応させた。更に、ウサギ抗ヒト  $\beta$ 2GPI

ポリクローナル抗体を 37℃、一時間反応させ、PBS-Tween にて 3 回洗浄した後、二次抗体にペルオキシダーゼ標識ヤギ抗ウサギ IgG 抗体 (CAPPEL) を用いて 37℃、一時間反応させ、OPD にて発色後 OD 492nm を測定した。

また、同様に、 $\beta$ 2GPI を濃度をかけて血管内皮細胞に結合させた後、IgG aCLA が高値 (IgG aCLA 86 GPL 単位) であり重篤な血栓症を頻発した原発性 APS 患者 1 例より精製した IgG aCLA (46 GPL 単位) を 50 倍希釈して加え、 $\beta$ 2GPI の濃度の差による IgG aCLA の血管内皮細胞への結合能に対する影響を検討した。

Ⅸ. 統計学的検討

得られた値はすべて平均値±標準偏差で示した。2 変量間の相関分析は、ピアソンの積率相関分析法によった。p < 0.05 を有意とした。

成 績

I. 各種膠原病における抗カルジオリピン抗体の陽性率

15GPL 単位以上を陽性とする、SLE では、35 例中 16 例、45.7% に陽性で、抗体価は 24.4±32.8GPL 単位 (平均値±標準偏差) であった。慢性関節リウマチでは、19 例中 5 例、26.3% に陽性で、抗体価は 13.3±12.3GPL 単位であった。強皮症では、6 例中 4 例、66.7% に陽性で、抗体価は 26.5±21.3GPL 単位であった。シェーグレン症候群では、12 例中 7 例、58.3% に陽性で抗体価は、23.8±18.5GPL 単位であった (図 2)。

Ⅱ. 患者血清中の抗カルジオリピン抗体価と抗フォスファチジルセリン抗体価の比較

陰性荷電のリン脂質に対する抗カルジオリピン抗体の交差反応性を検討するため、抗フォスファチジルセリン抗体を測定し、同一症例における抗カルジオリピン抗体と抗フォスファチジルセリン抗体の相関を検討した。その結果、今回検討した 27 例では、R=0.28 で両抗体間に有意な相関は認めなかった (図 3)。LAC の本体は、抗フォスファチジルセリン抗体ではないかとの報告<sup>14)</sup>もあり、この結果は、LAC と aCLA が必ずしも同一の抗体の交差反応性ではないというこれまでの報告と一致するものと考えられた。

Ⅲ. 患者血清中の抗カルジオリピン抗体価と抗血管内皮細胞抗体価の比較

図 4 に抗血管内皮細胞抗体の標準曲線を示す。同一症例における IgG aCLA と IgG AECA の間には、有意な相関は認めな

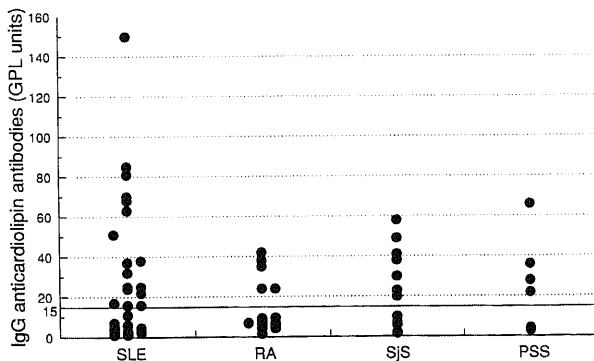


Fig. 2. Titers of IgG anticardiolipin antibodies in a variety of collagen diseases. Horizontal line shows cut-off level of IgG anticardiolipin antibodies. SLE, systemic lupus erythematosus; RA, rheumatoid arthritis; SJS, Sjogren's syndrome; PSS, progressive systemic sclerosis.

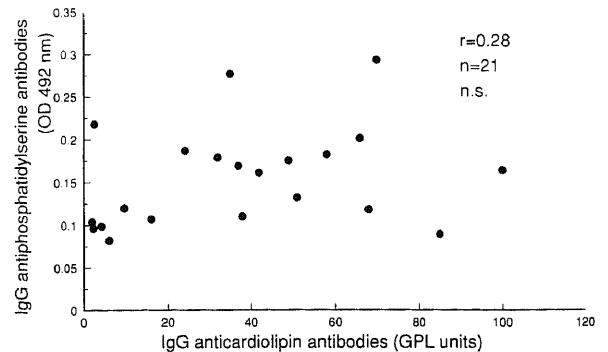


Fig. 3. Correlation between serum levels of IgG anticardiolipin antibodies and IgG antiphosphatidylserine antibodies in patients with systemic lupus erythematosus and antiphospholipid syndrome.

かった(図5)。従って、多くの症例において、IgG aCLA と IgG AECA は別々の抗体を測定しており、同一抗体の交差反応性を見ている可能性は非常に低いものと考えられ、大半の IgG aCLA は、直接内皮細胞に結合することはないものと考えられた。

IV. 抗カルジオリピン抗体と抗血管内皮細胞抗体の交差反応性の検討

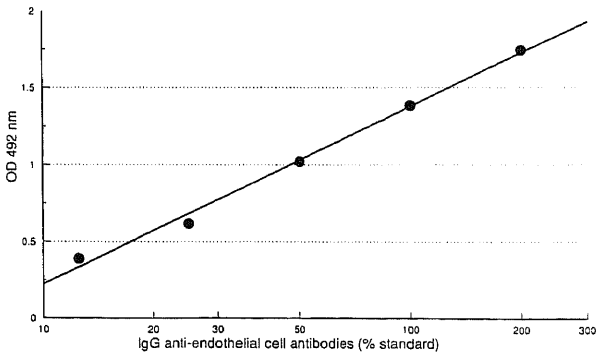


Fig. 4. A typical standard curve of antiendothelial cell antibodies in cellular enzyme linked immunosorbent assay.

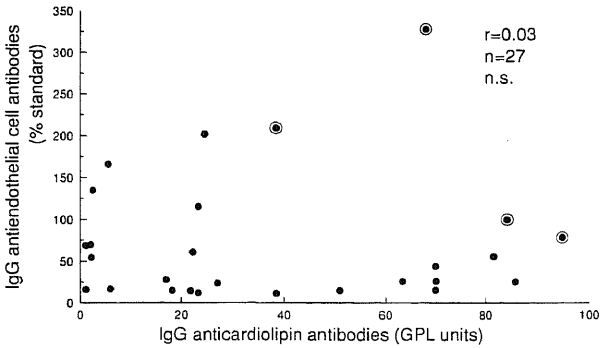


Fig. 5. Correlation between serum levels of IgG anticardiolipin antibodies and IgG antiendothelial cell antibodies in patients with systemic lupus erythematosus and antiphospholipid syndrome. ⊙, patients with high titers of both IgG aCLA and IgG AECA whose sera were used for the following absorptive assay using cardiolipin fixed columns.

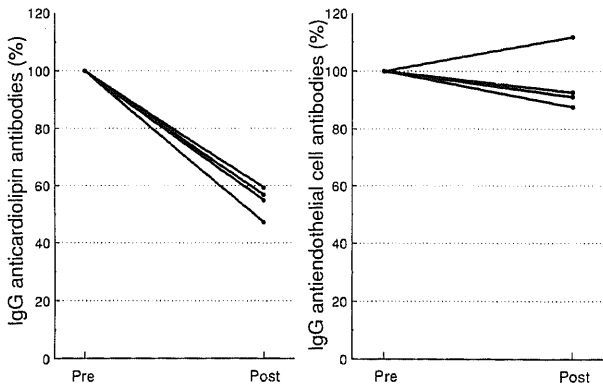


Fig. 6. Changes in levels of IgG anticardiolipin antibodies and IgG antiendothelial cell antibodies after absorptive procedure using cardiolipin fixed polystyrene columns. Data after absorption were shown as percentage of the levels of intact serum.

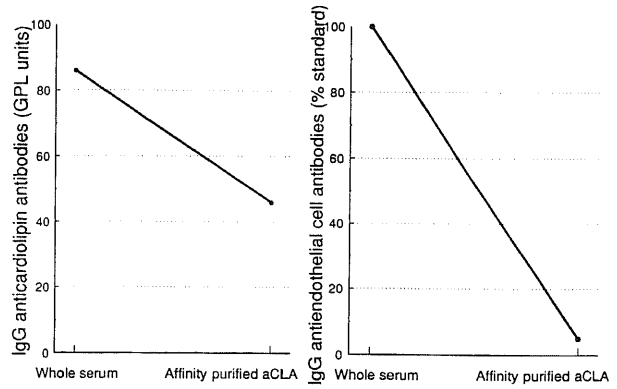


Fig. 7. Comparison of levels of IgG anticardiolipin antibody and IgG antiendothelial cell antibody between whole serum and affinity purified IgG anticardiolipin antibody in a patient with primary antiphospholipid syndrome.

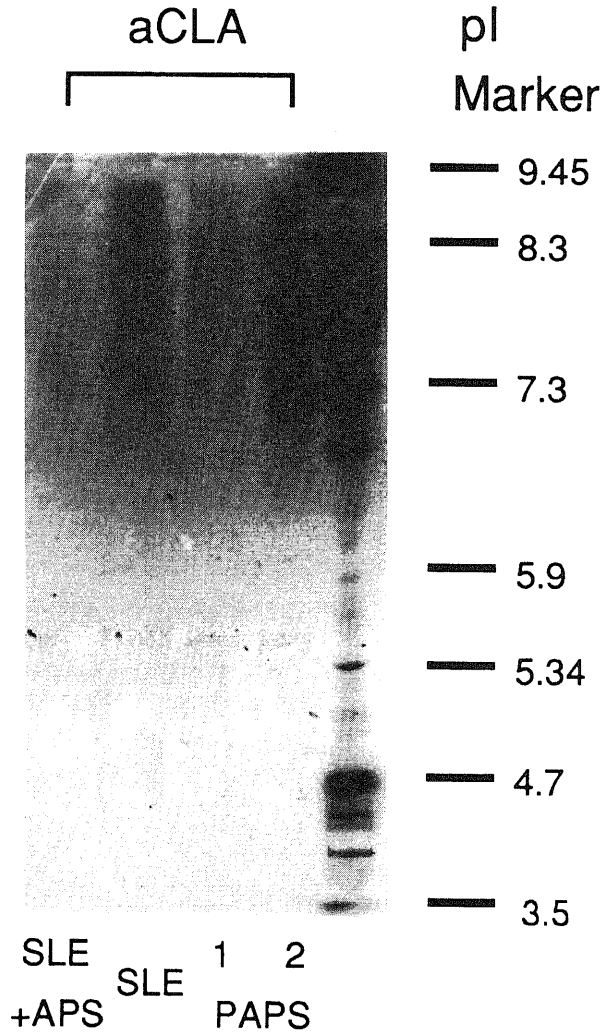


Fig. 8. Isoelectric focusing patterns of affinity purified anticardiolipin antibodies from the sera of two patients with primary APS, one with secondary APS and one with systemic lupus erythematosus with high titers of aCLA without APS. aCLA, anticardiolipin antibody; APS, antiphospholipid syndrome; PAPS, primary antiphospholipid syndrome; SLE, systemic lupus erythematosus

カルジオリピン固相化カラムにおける吸収試験の結果、抗カルジオリピン抗体は、吸着後では、前値の54.0±6.7%と減少したが抗血管内皮細胞抗体は、前値の95.8±12.6%とほとんど減少は認められなかった(図6)。更に、これらの中の1例より、上記の方法によりIgG aCLAを精製し、抗血管内皮細胞抗体価を検討した。その結果、精製IgG aCLAは、精製前の抗体価86GPL単位に比して、精製後は46GPL単位と53.5%の回収率を認めたが、精製IgG aCLAの抗血管内皮細胞抗体価は、5%と精製前の100%に比してほとんど消失していた(図7)。従って、両方の抗体が高値であるAPSにおいても両抗体は別々の抗体として分離されることが示された。以上より、血栓症の発症にaCLAの血管内皮細胞への直接の接合が重要との仮説は否定的であった。

V. 等電点電気泳動による抗カルジオリピン抗体の荷電状態の検討

APS 3例とAPSを伴わないIgG aCLA高値のSLE 1例よりアフィニティー法にて精製した抗カルジオリピン抗体をpH 3.5-9.5のAmpholine PAG Plateを用いた等電点電気泳動により検討したところ、いずれもpH 6-8に分布しており、APSの有無により荷電状態に差は認められなかった(図8)。

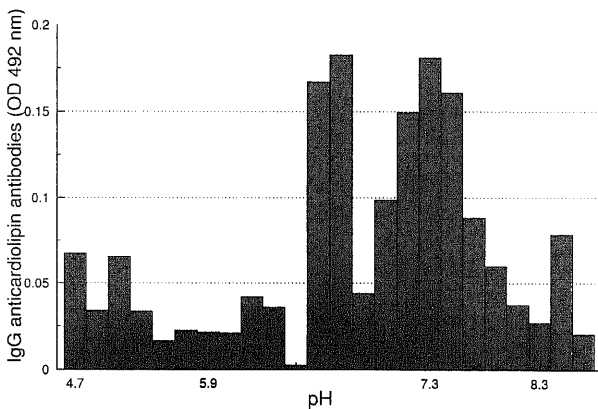


Fig. 9. Elution study of affinity purified aCLA in a patient with primary antiphospholipid syndrome from isoelectric focusing gel slices. Eluted aCLA from each slice were measured by enzyme linked immunosorbent assay. aCLA, anticardiolipin antibodies

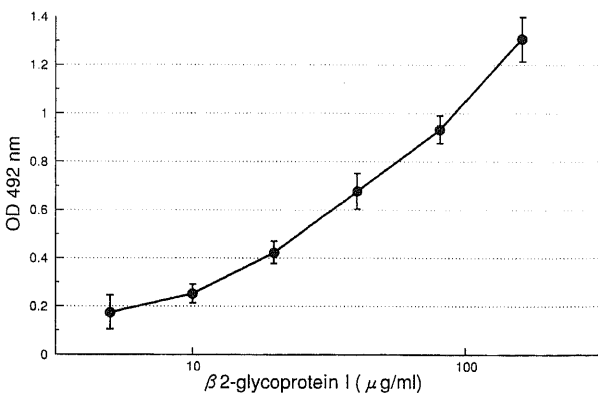


Fig. 10. Binding of purified human β2-glycoprotein I to human umbilical vein endothelial cells. The binding was evaluated by cellular enzyme linked immunosorbent assay. Each point represents mean±SD.

更に、ゲルを3mm幅に細切して抗体を溶出し、それぞれのバンドの抗体価を測定したところ、pH 6-8にピークが分布することが確認された(図9)。

VI. β2GPIの血管内皮細胞に対する結合能の検討と抗カルジオリピン抗体のβ2GPIを介した血管内皮細胞に対する反応性の検討

β2GPIは、濃度依存性に、血管内皮細胞に結合した(図10)。β2GPIの健常人における血中濃度は約200µg/mlであり、本検討により認められたβ2GPIの内皮細胞への生体外での結合は、濃度からみれば血中でも起こり得る現象と考えられた。更に、この結果をもとに、同時に加えるβ2GPIの濃度を変化させて、46GPL単位の精製したIgG aCLAの血管内皮細胞に対する結合性を細胞ELISA法にて検討したところ、IgG aCLAもβ2GPIの濃度に依存的に内皮細胞に結合する傾向が認められた(図11)。

考 察

自己免疫疾患患者の血清中には、抗DNA抗体、抗RNP抗体、抗SSA抗体等様々な自己抗体が出現することが知られている<sup>10</sup>。しかし、特定の病態の発症のメカニズムに直接関連している可能性が証明されている自己抗体は、抗TSHレセプター抗体<sup>19</sup>、抗アセチルコリン受容体抗体<sup>19</sup>等の一部の抗体を除きそれほど多くはない。これらの特定の病態を引き起こしていると考えられている自己抗体のうち、近年注目されているものの一つに抗リン脂質抗体がある<sup>117</sup>。抗リン脂質抗体は、当初、SLE患者血清中に高頻度で見いだされ、臨床的に脳梗塞、心筋梗塞等の動脈血栓症、肺梗塞、深部静脈血栓症、習慣流産等の血栓症を中心とした病態と深い関連があることが示唆されている抗体である<sup>117</sup>。

抗リン脂質抗体の測定法としては、梅毒血清反応の生物学的疑陽性(biologic false positive, BFP)の証明<sup>18</sup>、循環性抗凝血素(lupus anticoagulant, LAC)の証明<sup>19,20</sup>、ELISA法を利用した抗カルジオリピン抗体<sup>21</sup>、抗フォスファチジルセリン抗体<sup>22</sup>の測定等が知られている。これらのうち、BFPは、SLEにおいて最初に発見された抗リン脂質抗体であり、その本体はフォスファチジルコリン、コレステロール、カルジオリピンの混合物からなるVenereal Disease Research Laboratory (VRDL) 試薬中のカルジオリピンに結合する抗体と考えられている<sup>18</sup>。これは、SLE患者の10-30%に陽性であると報告されているが、

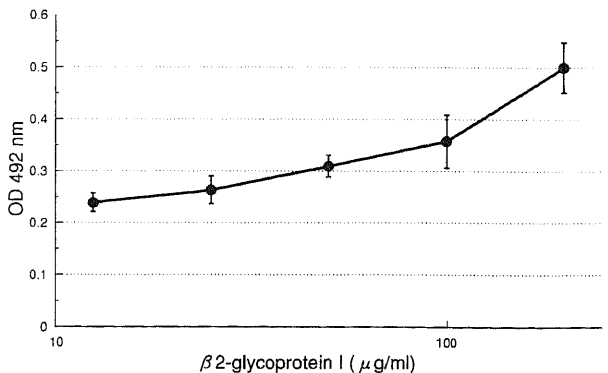


Fig. 11. β2GPI dependency of affinity purified IgG anticardiolipin antibody in binding to human umbilical vein endothelial cells. Each point represents mean±SD.

感度が低く、定量化できないという欠点があった<sup>18)</sup>。1983年、Harrisらは、カルジオリピンを固相化したELISA法を用いることにより、SLE患者血清中のaCLAを測定し、aCLA抗体価と血栓症、習慣流産、血小板減少症等の臨床症状とが深い関連があることを証明した<sup>23)</sup>。一方、LACは、最初にSLE患者血漿中に見いだされた、リン脂質依存性の凝固検査を阻害する免疫グロブリンであり、活性化部分トロンボプラスチン時間、カオリン凝固試験<sup>20)</sup>、ラッセルヘビ毒凝固時間<sup>24)</sup>等の延長として認められる。これらは、いずれも血栓症、習慣流産、血小板減少症等の臨床症状と深い関連があり、以前よりこれらの抗体の異同が問題にされてきた。近年になりLACおよびaCLAは、その両方の活性を同時に認める患者血漿より、イオン交換クロマトグラフィーやカルジオリピンをポリスチレンのカラムに固相化したアフィニティークロマトグラフィーにより別々の分画として抽出できることが報告され、これらの抗体が必ずしも同一の抗体でないことが証明された<sup>25,26)</sup>。しかし、一方でカルジオリピンに対する親和性を利用して精製した抗カルジオリピン抗体の一部が、LAC活性を持つとの報告<sup>27,28)</sup>もあり、臨床的に同じような病態と関連するという点も考慮すると、これらの抗体は、同じような病態で出現する一連の抗体群と考えられる。以上のような見地より、本研究では、抗体として対応抗原に対する曖昧さの少ない抗カルジオリピン抗体を対象をしぼって抗カルジオリピン抗体が血栓症を引き起こす機序に着目し、抗カルジオリピン抗体が血管内皮細胞に直接結合するかどうか、また、これらの相互作用に $\beta$ 2GPIがどのように関与しているかという点を中心に検討を行った。

血管内皮細胞は、血管内での血液の凝固を防ぐため、いくつかの重要な働きをしていることが知られている。それらのうち重要なものは、1) 細胞表面にあるヘパラン硫酸 (heparin-like substance) にアンチトロンビンⅢ (antithrombin Ⅲ, ATⅢ) が結合することにより、ATⅢとトロンビンの反応を促進し、トロンビンを不活化する作用、2) 細胞表面にトロンボモジュリンを表出することにより、トロンビンを介してプロテインCを活性化し、これがプロテインSと共同して活性化された凝固因子のうち、Va, VIIaを不活化する作用、3) 組織プラスミノゲンアクチベーター (tissue-type plasminogen activator, t-PA) を産生することにより、線溶系を進行させる作用、4) プロスタサイクリン (prostacyclin, PGI<sub>2</sub>) を産生することにより血小板の凝集を抑制する作用の4つである<sup>29)</sup>。これまで、aCLAは、これらの作用のいずれかを阻害することにより血栓症を引き起こすという報告が数多くなされてきたが、否定的な見解も多くはつきりと証明された機序はない<sup>30-34)</sup>。一方、SLE患者の血中には高頻度に抗血管内皮細胞抗体 (antiendothelial cell antibody, AECA) が出現することが知られており<sup>31,32)</sup>、AECAの存在と血栓症の関係が注目されていた<sup>33,34)</sup>。しかし、現在までの検討では、AECAの存在と血栓症との間には特別なつながりは認められていなかった。小池ら<sup>11)</sup>は、SLEモデルマウスであるMRL/lprマウスよりモノクローナルaCLAを作成し、aCLAの一部に内皮細胞との結合性が認められることから、内皮細胞に結合し得るaCLAが血栓症を引き起こす可能性について考察している。今回の検討ではこの点に着目しIgG aCLAとIgG AECAの関係について検討した。しかしながら、本研究では、血管内皮細胞に直接結合し得るIgG aCLAは認められず、内皮細胞への直接の結合性の有無がIgG aCLAの血栓症の誘発に

重要であるとの仮説は否定的であった。しかし、本研究の対象の中で、最も重篤で血栓症を頻回に繰り返した1例においては、IgG aCLAとIgG AECAが共に高値であり、血栓症の発症にIgG AECAが補助的な役割を果たしている可能性は否定できなかった。SLEでは、IgG aCLAが高値である他の膠原病に比して高頻度に血栓症を合併するという事実と、IgG AECAを高頻度に認めるという事実を考慮すると、今後、IgG aCLAとIgG AECAの血管内皮細胞に対する相互作用の検討も重要な課題の一つと考えられる。

本研究において、注目すべきもう一つの点は、IgG aCLAが $\beta$ 2GPIを介して血管内皮細胞に結合する可能性が示唆された点である。 $\beta$ 2GPIは、分子量約5万の血中に存在する糖蛋白であり<sup>35)</sup>、別名をアポリ蛋白Ⅱといい、正常者の血中濃度は約200 $\mu$ g/mlで、約30%がリポ蛋白分画に存在しリポ蛋白リパーゼ活性を高めることが知られているが<sup>36)</sup>、生体内での機能は不明な点が多い。現在までに解明されている機能の一つとして、血小板表面にあるVa, Xa因子、リン脂質からなるプロトロンビナーゼ複合体に結合し、この機能を阻害することにより抗凝固的に働くという作用がある<sup>37)</sup>。1990年にいくつかの施設よりほぼ同時にaCLAとカルジオリピンの結合には、 $\beta$ 2GPIが必要であるとの報告がなされ<sup>38)</sup>、以後、 $\beta$ 2GPIはAPSを解明するための鍵になる蛋白としてにわかに注目を集めてきた。これらの報告の中には、aCLAの中には $\beta$ 2GPI依存性のものと非依存性のものがあるとの報告<sup>40)</sup>もみられ、aCLAの多様性を解析する上で $\beta$ 2GPIは、一つの重要な指標になるものと思われる。最近、LACの測定において、血漿中より $\beta$ 2GPIを除くとLACによる凝固時間延長が消失することが証明され、LACの作用は $\beta$ 2GPI活性の増強にあるという点が明らかになった<sup>41,42)</sup>。また、 $\beta$ 2GPIをウサギやマウスに免疫すると、抗 $\beta$ 2GPI抗体のみならず抗リン脂質抗体も同時に産生されることも証明され、抗リン脂質抗体症候群の発症に $\beta$ 2GPIが、中心的役割を果たしている可能性が示唆されている<sup>43)</sup>。しかしながら、 $\beta$ 2GPIの作用が増強すると試験管内では凝固時間の延長が認められるという点を考慮すると、LACの試験管内での作用は血栓形成の促進とは逆の作用であり、 $\beta$ 2GPIの凝固系に対する他の作用の存在が示唆されてきた。 $\beta$ 2GPIが抗カルジオリピン抗体の血管内皮細胞への結合に関与しているという本研究の結果は、この仮説を支持するものであり、今後、 $\beta$ 2GPIの有無によるIgG aCLAの血管内皮細胞に対する影響を生体外の系で検討することにより、IgG aCLAが血栓症を引き起こすメカニズムが、解明されるものと期待される。

## 結 論

抗カルジオリピン抗体が血管内皮細胞に結合するかどうか、また $\beta$ 2GPIが、aCLAと内皮細胞との結合において重要な役割を果たすかどうかを検討するため、SLE患者、APS患者における血中のIgG aCLAおよびIgG AECAの関係と、 $\beta$ 2GPIの有無による精製IgG aCLAの血管内皮細胞に対する結合能について検討した。また、血栓症の有無が抗カルジオリピン抗体の違いによるものかどうかを検討するため、血栓症のある症例とない症例よりIgG aCLAを精製し、等電点電気泳動にて荷電状態を比較検討し、以下の結論を得た。

1. 血清中のIgG aCLAとIgG AECAの間には相関関係はなく、血管内皮細胞に直接結合するようなIgG aCLAも認めら

れなかった。更に、IgG aCLA と IgG AECA が共に高値であり、頻回に重篤な血栓症を起こした症例においても、IgG aCLA と IgG AECA は別々の抗体として分離された。

2.  $\beta$ 2GPI は、濃度依存性に血管内皮細胞に結合し、精製した IgG aCLA は、 $\beta$ 2GPI の濃度に依存して血管内皮細胞に結合する傾向が認められた。

3. 抗リン脂質抗体症候群 3 例と IgG aCLA 高値であり血栓症を認めない SLE 1 例よりアフィニティー法にて精製した IgG aCLA を等電点電気泳動法にて解析したところ、いずれも pH 6-8 に分布し血栓症の有無による差を認めなかった。

4. 以上の結果は、抗カルジオリピン抗体が  $\beta$ 2GPI を介して血管内皮細胞に結合することを示し、生体内においても抗カルジオリピン抗体が血管内皮細胞の機能に対し何らかの影響を与えている可能性を示唆する。

### 謝 辞

稿を終えるに臨み、御指導、御校閲を賜った恩師金沢大学第 2 内科竹田亮祐教授に深甚の謝意を表します。また、終始、御指導、御教示を戴いた金沢大学第 2 内科紺井一郎助手および金沢大学第 2 内科腎臓・膠原病班の諸先生方に感謝致します。さらに、本研究の遂行に多大な御協力を戴きました金沢大学がん研究所分子免疫部右田俊介教授、並びに等電点電気泳動につき有益な御指導を戴きました金沢大学医療技術短期大学部長井雅子教授、本研究の一部を発表する機会を与えて戴きました金沢大学医学部附属病院中央検査部橋本琢磨教授に深く感謝致します。

本論文の一部は、第 256 回日本臨床化学会東海北陸支部例会 (1992 年、金沢) 及び第 36 回日本リウマチ学会総会 (1992 年、千葉) において発表された。

### 文 献

- 1) Sammaritano, L. R., Gharavi, A. E. & Lockshin, M. D.: Antiphospholipid antibody syndrome: immunologic and clinical aspects. *Semin. Arth. Rheum.*, **20**, 81-96 (1990).
- 2) Khamashta, M. A. & Wallington, T.: Management of the antiphospholipid syndrome. *Ann. Rheum. Dis.*, **50**, 959-962 (1991).
- 3) Harris, E. N., Chan, J. K. H., Asherson, R. A., Aber, V. R., Gharavi, A. E. & Hughes, G. R. V.: Thrombosis, recurrent fetal loss and thrombocytopenia. Predictive value of the anticardiolipin test. *Arch. Intern. Med.*, **146**, 2153-2156 (1986).
- 4) Brauch, D. W., Dudley, D. J., Mitchell, M. D., Creighton, K. A., Abbott, T. M., Hammond, E. H. & Daynes, R. A.: Immunoglobulin G fractions from patients with antiphospholipid antibodies cause fetal death in BALB/c mice: a model for autoimmune fetal loss. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, **163**, 210-216 (1990).
- 5) Blank, M., Cohen, J., Toder, V. & Shoenfeld, Y.: Induction of antiphospholipid syndrome in naive mice with mouse lupus monoclonal and human polyclonal anticardiolipin antibodies. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **88**, 3069-3073 (1991).
- 6) Bakimer, R., Fishman, P., Blank, M., Sredni, B., Djaldetti, M. & Shoenfeld, Y.: Induction of primary antiphospholipid syndrome in mice by immunization with a human monoclonal anticardiolipin antibody (H-3). *J. Clin. Invest.*, **89**, 1558-1563 (1992).
- 7) McNeil, H. P., Simpson, R. J., Chesterman, C. N. & Krilis, S. A.: Anti-phospholipid antibodies are directed against a complex antigen that includes a lipid-binding inhibitor of coagulation:  $\beta$ 2-glycoprotein I (apolipoprotein H). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **87**, 4120-4124 (1990).
- 8) Galli, M., Comfurius, P., Maassen, C., Hemker, H. C., De Baets, M. H., Van Breda-Vriesman, P. J. C., Barbui, T., Zwaal, R. F. A. & Bevers, E. M.: Anticardiolipin antibodies (ACA) directed not to cardiolipin but to a plasma protein cofactor. *Lancet*, **335**, 1544-1547 (1990).
- 9) D'Cruz, D. P., Houssiau, F. A., Ramirez, G., Baguley, E., McCutcheon, J., Vianna, J., Haga, H. J., Swana, T., Khamashta, M. A., Taylor, J. C., Davies, D. R. & Hughes, G. R. V.: Antibodies to endothelial cells in systemic lupus erythematosus: a potential marker for nephritis and vasculitis. *Clin. Exp. Immunol.*, **85**, 254-261 (1991).
- 10) Cines, D. B., Lyss, A. P., Reeber, M., Bina, M. & DeHoratius, R. J.: Presence of complement-fixing anti-endothelial cell antibodies in systemic lupus erythematosus. *J. Clin. Invest.*, **73**, 611-625 (1984).
- 11) 小池隆夫, 市川健司, 鈴木隆弘, 高林克日己, 住田孝之, 富田玖夫, 吉田 尚: 抗カルジオリピン抗体の生物活性—モノクローナル抗体を用いた検討—。厚生省特定疾患自己免疫疾患調査研究班平成元年度研究報告書, 117-119 頁, 1990.
- 12) Polz, E., Wurm, H. & Kostner, G. M.: Studies on the composition of the protein part of triglyceride rich lipoproteins of human serum: isolation of polymorphic forms of  $\beta$ 2-glycoprotein-I. *Artery*, **9**, 305-315 (1981).
- 13) Alving, B. M., Barr, C. F. & Tang, D. B.: Correlation between lupus anticoagulants and anticardiolipin antibodies in patients with prolonged activated partial thromboplastin times. *Am. J. Med.*, **88**, 112-116 (1990).
- 14) 武井正美, 澤田滋正: 自己免疫疾患の発症メカニズム. *Medical technology*, **18**, 540-547 (1990).
- 15) 市川陽一: 甲状腺疾患と thyrotropic hormone 受容体. *日内会誌*, **76**, 1786-1790 (1987).
- 16) 高守正治, 奥村誠一, 駒井清楊, 永田美和子: 重症筋無力症抗原決定基としてのヒト・アセチルコリン受容体合成ペプチドに関する免疫学的研究. *日内会誌*, **76**, 1535-1540 (1987).
- 17) 市川幸延: ループス型抗凝固因子と抗リン脂質抗体. *リウマチ*, **31**, 73-85 (1991).
- 18) Shulman, L. E.: Systemic lupus erythematosus and the chronic biologic false-positive test for syphilis. *In* D. J. Wallace & E. L. Dubois (eds.), *Dubois' Lupus Erythematosus*, 3rd ed., p262-270, Lea & Febiger, Philadelphia, 1987.
- 19) Triplett, D. A., Brandt, J. T., Musgrave, K. A. & Orr, C. A.: The relationship between lupus anticoagulants and antibodies to phospholipid. *JAMA.*, **259**, 550-554 (1988).
- 20) Rosove, M. H., Ismail, M., Koziol, B. J., Runge, A. & Kasper, C. K.: Lupus anticoagulants: Improved diagnosis with a Kaolin clotting time using rabbit brain phospholipid in standard and high concentrations. *Blood*, **68**, 472-478 (1986).
- 21) Harris, E. N.: The second international anti-cardiolipin standardization workshop/the Kingston anti-phospholipid



- antibody study (KAPS) group. *Am. J. Clin. Pathol.*, **94**, 476-484 (1990).
- 22) Harris, E. N., Gharavi, A. E., Tincani, A., Chan, J. K. H., Englert, H., Mantelli, P., Allegro, F., Ballestrieri, G. & Hughes, G. R. V.: Affinity purified anti-cardiolipin and anti-DNA antibodies. *J. Clin. Lab. Immunol.*, **17**, 155-162 (1985).
- 23) Harris, E. N., Gharavi, A. E., Boey, M. L., Patel, B. M., Mackworth-Young, C. G., Loizou, S. & Hughes, G. R. V.: Anticardiolipin antibodies: detection by radioimmunoassay and association with thrombosis in systemic lupus erythematosus. *Lancet*, **2**, 1211-1214 (1983).
- 24) Thiagarajan, P., Pengo, V. & Shapiro, S. S.: The use of the dilute Russell viper venom time for the diagnosis of lupus anticoagulants. *Blood*, **68**, 869-874 (1986).
- 25) Exner, T., Sqahman, N. & Trudinger, B.: Separation of anticardiolipin antibodies from lupus anticoagulant on a phospholipid-coated polystyrene column. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **2**, 1001-1007 (1988).
- 26) McNeil, H. P., Chesterman, C. N. & Krilis, S. A.: Anticardiolipin antibodies and lupus anticoagulants comprise separate antibody subgroups with different phospholipid binding characteristics. *Br. J. Haematol.*, **73**, 506-513 (1989).
- 27) Pengo, V., Thiagarajan, P., Shapiro, S. S. & Heine, M. J.: Immunological specificity and mechanism of action of IgG lupus anticoagulants. *Blood*, **70**, 69-76 (1987).
- 28) Galli, M., Comfurius, P., Barbui, T., Zwaal, R. F. A. & Bevers, E. M.: Anticoagulant activity of  $\beta$ 2-glycoprotein I is potentiated by a distinct subgroup of anticardiolipin antibodies. *Thromb. Haemostasis*, **68**, 297-300 (1992).
- 29) Nawroth, P. P. & Stern, D. M.: Modulation of endothelial cell hemostatic properties by tumor necrosis factor. *J. Exp. Med.*, **163**, 740-745 (1986).
- 30) Carreras, L. O., Defreyn, G., Machin, S. J., Vermeylen, J., Deman, R., Spitz, B. & Van Assche, A.: Arterial thrombosis, intrauterine death and "lupus" anticoagulant: detection of immunoglobulin interfering with prostacyclin formation. *Lancet*, **1**, 244-246 (1981).
- 31) Ruiz-Arguelles, G. J., Ruiz-Arguelles, A., Deleze, M. & Alarcon-Segovia, D.: Acquired protein C deficiency in a patient with primary antiphospholipid syndrome. Relationship to reactivity of anticardiolipin antibody with thrombomodulin. *J. Rheumatol.*, **16**, 381-383 (1989).
- 32) Cariou, R., Tobelem, G., Bellucci, S., Solia, J., Solia, C., Maclouf, J. & Caen, J.: Effect of lupus anticoagulant on antithrombogenic properties of endothelial cells -inhibition of thrombomodulin-dependent protein C activation. *Thromb. Haemostasis*, **60**, 54-58 (1988).
- 33) Oosting, J. D., Derksen, R. H. W. M., Hackeng, T. M., Van Vliet, M., Preissner, K. T., Bouma, B. N. & De Groot, P. G.: In vitro studies of antiphospholipid antibodies and its cofactor,  $\beta$ 2-glycoprotein-I, show negligible effects on endothelial cell mediated protein C activation. *Thromb. Haemostasis*, **66**, 666-671 (1991).
- 34) Dudley, D. J., Mitchell, M. D. & Ware, B. D.: Pathophysiology of antiphospholipid antibodies: absence of prostaglandin-mediated effects on cultured endothelium. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, **162**, 953-959 (1990).
- 35) Vismara, A., Meroni, P. L., Tincani, A., Harris, E. N., Barcellini, W., Brucato, A., Khamashta, M. A., Hughes, G. R. V., Zanussi, C. & Balestrieri, G.: Relationship between anti-cardiolipin and anti-endothelial cell antibodies in systemic lupus erythematosus. *Clin. Exp. Immunol.*, **74**, 247-253 (1988).
- 36) Cervera, R., Khamashta, M. A., Font, J., Ramirez, G., D'cruz, D., Montalban, J., Lopez-soto, A., Asherson, R. A., Ingelmo, M. & Hughes, G. R. V.: Antiendothelial cell antibodies in patients with the antiphospholipid syndrome. *Autoimmunity*, **11**, 1-6 (1991).
- 37) Lozier, J., Takahashi, N. & Putnam, F. W.: Complete amino acid sequence of human plasma  $\beta$ 2-glycoprotein I. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **81**, 3640-3644 (1984).
- 38) Polz, E. & Kostner, G. M.: The binding of  $\beta$ 2-glycoprotein I to human serum lipoproteins. Distribution among density fractions. *FEBS Lett.*, **102**, 183-186 (1979).
- 39) Nimpf, J., Bevers, E. M., Bomans, P. H. H., Till, U., Wurm, H., Kostner, G. M. & Zwaal, F. A.: Prothrombinase activity of human platelets is inhibited by  $\beta$ 2-glycoprotein-I. *Biochim. Biophys. Acta*, **884**, 142-149 (1986).
- 40) Chamley, L. W., McKay, E. J. & Pattison, N. S.: Cofactor dependent and cofactor independent anticardiolipin antibodies. *Thromb. Res.*, **61**, 291-299 (1991).
- 41) Roubey, R. A. S., Pratt, C. W., Buyon, J. P. & Winfield, J. B.: Lupus anticoagulant activity of autoimmune antiphospholipid antibodies is dependent upon  $\beta$ 2-glycoprotein I. *J. Clin. Invest.*, **90**, 1100-1104 (1992).
- 42) Oosting, J. D., Derksen, R. W. M., Entjes, H. T. I., Bouma, B. N. & De Groot, P. G.: Lupus anticoagulant activity is frequently dependent on the presence of  $\beta$ 2-glycoprotein I. *Thromb. Haemostasis*, **67**, 499-502 (1992).
- 43) Gharavi, A. E., Sammaritano, L. R., Wen, J. & Elkou, K. B.: Induction of antiphospholipid autoantibodies by immunization with  $\beta$ 2 glycoprotein I (Apolipoprotein H). *J. Clin. Invest.*, **90**, 1105-1109 (1992).

**Studies on Binding Capacity of Anticardiolipin Antibodies to Human Umbilical Vein Endothelial Cells**  
Mitsuhiro Kawano, Department of Internal Medicine (II), School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920-J.  
Juzen Med Soc., **102**, 61-69 (1993)

**Key words** anticardiolipin antibody, endothelial cell, antiendothelial cell antibody, antiphospholipid syndrome,  $\beta$ 2-glycoprotein I

#### Abstract

Anticardiolipin antibodies (aCLA) are thought to induce antiphospholipid syndrome, but the mechanism by which aCLA induce thrombosis remains to be resolved. To clarify whether aCLA bind directly to endothelial cells, and to evaluate the role of  $\beta$ 2-glycoprotein I ( $\beta$ 2GPI), which is known to be necessary for aCLA binding to cardiolipin, in relation to the binding of aCLA to endothelial cells, IgG aCLA and IgG antiendothelial cell antibodies (AECA) were measured in patients with systemic lupus erythematosus (SLE) and antiphospholipid syndrome (APS). Additionally, to examine the identity of IgG aCLA and IgG AECA, titers of both affinity purified IgG aCLA and serums absorbed by cardiolipin fixed polystyrene columns were measured. Whether affinity purified IgG aCLA can bind to endothelial cells in vitro with or without the presence of  $\beta$ 2GPI was then determined. Furthermore, to examine the difference between IgG aCLA from patients with and without thromboses, the isoelectric focusing (IEF) pattern of pathogenic IgG aCLA were compared with those of non-pathogenic IgG aCLA. AECA were measured by cellular enzyme linked immunosorbent assay (cellular ELISA) using human umbilical vein endothelial cells confluent fixed in 96 well polystyrene plates. One serum including a high titer of IgG AECA were chosen as the standard serum and the levels of IgG AECA were evaluated as a percentage of the titer of this standard serum. No correlation was found between IgG AECA and IgG aCLA in patients with SLE or primary and secondary antiphospholipid syndrome (APS). In four sera with high titers of both IgG AECA and IgG aCLA, absorption with cardiolipin fixed columns did not inhibit endothelial cell binding, and affinity purified anticardiolipin antibodies were not able to bind to endothelial cells. Affinity purified anticardiolipin antibodies ranged from pH 6-8 in IEF analysis and no difference was seen between two patients with primary APS, one with secondary APS and one with SLE with high titers of aCLA without APS.  $\beta$ 2GPI bound to endothelial cells and affinity purified anticardiolipin antibodies tended to bind to endothelial cells in parallel with increasing  $\beta$ 2GPI concentrations. These results suggest that IgG aCLA binding to endothelial cells is  $\beta$ 2GPI mediated, and that this binding may play a significant role in inducing thromboses in the antiphospholipid syndrome.