

5) ELISPOT 法による尋常性天疱瘡自己抗体産生B細胞の検出 ならびに自己抗体産生におけるT細胞の役割についての検討

分担研究者：西川 武 二 (慶応大学皮膚科)

抄 録

尋常性天疱瘡 (PV) は、デスモソームカドヘリンの一つであるデスモグレイン 3 (Dsg3) に対する自己抗体により、表皮や粘膜上皮の細胞間接着が障害され、水疱やびらんを形成する疾患である。本研究の目的は、Enzyme-linked Immunospot (ELISPOT) 法を用いて、PV 患者末梢血中から Dsg3 特異的な抗体産生 B 細胞を検出すると共に、その抗体産生に対する CD4 陽性 T 細胞の役割を明らかにすることにある。3 人の重症 PV 患者末梢血から抗 Dsg3 抗体産生細胞が検出された ($1.3-2.3/10^5$ 末梢血単核球)。Pokeweed mitogen (PWM) と組換え Dsg3 (rDsg3) とで刺激培養した末梢血単核球について ELISPOT 法を行ったところ、病勢の異なる 14 例の PV 患者のうち 9 例から Dsg3 特異的 B 細胞が検出された ($6.3-84.0/10^5$ 末梢血単核球) が、健常人 10 例からこれらの細胞は検出されなかった。さらに抗 Dsg3 自己抗体産生における CD4 陽性 T 細胞の役割について検討したところ、*in vitro* における抗 Dsg3 抗体の産生は CD4 陽性 T 細胞を除去することや、抗 HLA-DR、HLA-DQ モノクロナール抗体を添加することにより阻害された。以上の結果から、PV 患者末梢血中から抗原特異的な自己抗体産生細胞が ELISPOT 法によって検出できると共に、その自己抗体産生に HLA クラス II に拘束された CD4 陽性 T 細胞が関与することが証明された。本法は、様々な自己免疫疾患における自己抗体産生機序の解明に重要なツールとなる。

Detection of Antigen-Specific B cells in Pemphigus Vulgaris by Enzyme-Linked Immunospot Assay: Requirement of T cell Collaboration for Autoantibody Production

Takeji Nishikawa (Keio University School of Medicine, Department of Dermatology)

Patients with pemphigus vulgaris (PV) have circulating IgG autoantibodies against desmoglein (Dsg) 3, which inhibit cell-cell adhesion of keratinocytes and cause blister formation in the skin and mucous membrane. The purpose of this study was to detect and quantitate circulating anti-Dsg3 autoantibody producing B cells in peripheral blood mononuclear cells (PBMC) in patients with PV by Enzyme-Linked Immunospot (ELISPOT) assay, and to examine the roles of T cells in autoantibody production of B cells from patients with PV. Circulating B cells producing anti-Dsg3 antibodies were detected exclusively in three patients with severe disease ($1.3-2.3/10^5$ PBMC). When this ELISPOT assay was combined with *in vitro* stimulation of PBMC with pokeweed mitogen and recombinant Dsg3, we could detect circulating Dsg3-specific memory B cells in nine of 14 patients ($6.3-84.0/10^5$ PBMC), but none of 10 healthy individuals. We further analyzed the role of CD4⁺T cells in promoting anti-Dsg3 antibody production. The *in vitro* anti-Dsg3

antibody production was abolished when CD4⁺ cells were depleted or when anti-HLA-DR or anti-HLA-DQ monoclonal antibody was added to the cultures. Our results demonstrated the quantitative detection of circulating Dsg3-specific B cells and suggested the important part of HLA class II-restricted CD4⁺ T cells in the autoantibody production in PV.

はじめに

尋常性天疱瘡 (PV) は、表皮や粘膜上皮の水疱形成を特徴とする致死性の自己免疫疾患である (1-2)。PV 患者血清中には重層扁平上皮の角化細胞表面に対する自己抗体が存在し、その結果表皮や粘膜上皮の細胞間接着が障害される。PV 自己抗体の標的蛋白について免疫ブロット法や免疫沈降法による解析が行われ、その結果標的蛋白は 130kDa の糖蛋白であることが明らかにされた。また標的蛋白の cDNA がクローニングされ、その結果標的蛋白は、デスモソーム構成蛋白のデスモグレイン 3 (Dsg3) であることが明らかにされた (3)。

我々は、バキュロウイルス発現系を用いて、Dsg3 の細胞外領域を含んだリコンビナント蛋白 (rDsg3) を分泌型の蛋白として発現させることに成功している (4)。PV 患者血清を用いた免疫吸着法により、この rDsg3 は自己抗原の conformational epitope のほとんどを再現していることが明らかとなった (4-5)。またこの rDsg3 を固相化抗原とした ELISA 法が開発され、感度、特異性ともに高い PV の血清学的診断法として利用されるようになった (6-8)。

しかし、抗 Dsg3 自己抗体を産生する B 細胞の実体、ならびに自己抗体産生における T 細胞の役割については未だ不明である。今回、我々は Enzyme-linked Immunospot (ELISPOT) 法により、PV 患者末梢血中に存在する抗 Dsg3 抗体産生 B 細胞を検出するとともに、その末梢血中における頻度を算出した。さらに本法を *in vitro* での刺激培養と併用することにより、抗 Dsg3 自己抗体産生における CD4 陽性 T 細胞の役割および HLA クラス II 拘束性の T-B 細胞の相互作用について検討した。

材料および方法

1. 対象

未治療または治療中の PV 患者 18 例と、対照として健常人 10 例から採取したヘパリン加末梢血を供した。PV の診断は臨床診断、病理組織学的診断、ならびに免疫組織学的診断の結果に基づいて行った。PV 患者 3 例について、MHC クラス II 対立遺伝子 (DRBI, DQBI, DPBI) の解析を PCR-RELP 法により行った。過去の報告に基づき、すべての対象患者について症状の重篤度を主観的に 0~3 までスコア化した (6)。

2. バキュロウイルス発現系による rDsg3 の作製

バキュロウイルス発現系を用いて rDsg3 を、既報告通り作製した (6)。Dsg3 の細胞外領域の C 末端に E-Tag および His-Tag を挿入した組換え蛋白 (rDsg3-His) を、ELISPOT 法の固相化抗原として、また *in vitro* での末梢血単核球 (PBMC) の刺激に用いた。この rDsg3 を TALON affinity metal resin (Clontech, Palo Alto, CA) を用いて精製、濃縮し、0.5mM の CaCl₂ を含む磷酸緩衝生理食塩水 (PBS-Ca) で透析後分注し、使用直前まで -70°C で保存した。

3. ELISA 法

過去の報告に基づき、対象となった PV 患者の血中抗体価を Dsg3/Dsg1 特異的な ELISA 法で測定した (6)。即ち、rDsg3-His または rDsg1-His を固相化した ELISA プレートに、希釈液 (1% BSA, 1mM CaCl₂, 0.05% Tween20 を含むトリス緩衝生理食塩水 (TBS pH7.4)) を用いて 200 倍希釈した血清を、室温 1 時間反応した。二次抗体としてペルオキシダーゼ標識抗ヒト IgG 抗血清 (MBL Nagoya Japan) を 1000 倍に希釈したものをを用い、室温 1 時間反応した後、tetramethylbenzidine (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) で発色して、ELISA reader にて吸光度を測定した。PV と PF の標準血清をそれぞれの ELISA の陽性対照に用いた。Index 値は次のように算出した; (検体の OD 値 - 陰性対照の OD 値) / (陽性対照の OD 値 - 陰性対照の OD 値) x 100。そして (Index 値) ≤ 10 の場合を陰性、10 < (Index 値) ≤ 20 の場合を偽陽性、20 < (Index 値) の場合を陽性とした。それぞれのサンプルについて duplicate を行い、その平均値を結果とした。

4. PV 患者と健常人からの PBMC の採取

PV 患者と健常人のヘパリン加全血から、PBMC を Ficoll-Paque Plus (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden) を用いて分離し、complete medium に浮遊した。この PBMC 浮遊液について ELISPOT 法を行い、循環血中に存在する抗 Dsg3 抗体産生 B 細胞を検出した。分離した PBMC の一部は、使用直前まで液体窒素内で保存した。循環血中に存在する Dsg3 特異的なメモリー B 細胞を検出するため、PBMC を後述の条件下で刺激培養したものについて ELISPOT 法を行った。

5. ELISPOT 法

30 μg/ml の精製 rDsg3-His を固相化抗原とし、PVDF 膜を底面に持つ 96 穴マルチタイタープレート (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden) に 4°C 一晩コーティングした。プレートを PBS-Ca で 3 回洗浄し、1% BSA を含む PBS-Ca でブロックした (室温 2 時間)。プレートの調製は、使用直前に行った。

PV 患者および健常人から採取した PBMC の浮遊液を、上述のプレート上で 37°C 4 時間培養した。その後プレートを 0.05% Tween20 を含む PBS-Ca で洗浄し、膜上に結合した IgG をアルカリフォスファターゼ標識抗ヒト IgG 抗血清 (Zymed Laboratories Inc, San Francisco, CA) と反応させて膜上にスポットを形成した。得られたスポット数を実体顕微鏡下で計数し、それぞれの細胞浮遊液中に存在する Dsg3 特異的な IgG 産生 B 細胞の頻度を 10⁵ PBMC あたりのスポット数として算出した。すべてのサンプルについて duplicate または triplicate を行い、得られたスポット数の平均値を結果とした。

PV 患者血中の Dsg3 特異的なメモリー B 細胞の頻度を算出するため、PBMC を段階希釈し (3.2x10⁵-2.0x10⁴)、96 穴組織培養用プレート (U 底) (Nalge Nunc International, Roskilde, Denmark) で、PWM (1 μg/ml) (Sigma) と rDsg3 (10 μg/ml) とで 4 日間併用刺激した後に上述の ELISPOT 法を行った。Dsg3 特異的なメモリー B 細胞の頻度は、スポットの形成を認めた最小希釈単位の PBMC 数につき 1 細胞とした。

6. In vitroでの抗 Dsg3 抗体産生における T-B 細胞の相互作用についての解析

まず、Dsg3 特異的なメモリーB細胞を抗原特異的に刺激するための PWM と rDsg3 の至適濃度を決定した。3人の PV 患者から採取した PBMC を上述の組織培養用プレートで、各ウェルあたり細胞数が 2×10^3 - 1×10^6 細胞になるように細胞浮遊液を調製し、PWM (0.125 - $1 \mu\text{g}/\text{ml}$) と rDsg3 (0.25 - $10 \mu\text{g}/\text{ml}$) の併用刺激下で1週間培養した。培養4日目に complete medium を追加した。培養7日目に全ての培養液を交換した後、その細胞浮遊液について ELISPOT 法を行った。PWM による単独刺激よりも PWM と rDsg3 による併用刺激下の方が多くのスポットを検出できたとき、その PWM と rDsg3 の濃度をそれぞれの至適濃度とした。

次に *in vitro* での自己抗体産生における CD4 陽性 T 細胞の役割について検討した。PV 患者から採取した PBMC を、抗 CD4 モノクロナール抗体結合マグネティックビーズ (Dynal, Oslo, Norway) と 4°C 1時間反応して CD4 陽性 T 細胞を除去した。この細胞浮遊液について ELISPOT 法を行い、得られたスポット数を CD4 陽性 T 細胞を除去していないものと比較した。さらに *in vitro* での自己抗体産生における特定の MHC クラス II 対立遺伝子の関連を検討するため、それぞれの MHC クラス II 分子に特異的な阻害抗体 (0.05 - $0.1 \mu\text{g}/\text{ml}$) を至適培養条件に添加した。阻害抗体には、以下のモノクロナール抗体を用いた；HLA-DR 抗体 (L243; IgG2a)、抗 HLA-DQ 抗体 (1a3; IgG2a)、抗 HLA-DP 抗体 (B7/21; IgG3) (Leinco, St. Louis, MO)。またマウス IgG2a とマウス IgG3 (Leinco) をアイソタイプコントロールとして用いた。

結 果

1. PV 患者 PBMC からの Dsg3 特異的な IgG 産生 B 細胞の検出ならびにその頻度の算定

ELISPOT 法により、PV 患者循環血中に存在する Dsg3 特異的な IgG 産生 B 細胞の検出ならびにその頻度の算定を行った (図 1 A)。PV 患者 11 例から採取した PBMC13 検体と、健常人 7 例から採取した PBMC 7 検体について ELISPOT 法を行ったところ、3 例の PV 患者 PBMC から Dsg3 特異的な IgG 産生 B 細胞が検出され、その頻度は PBMC 10^5 細胞あたり 1.3-2.3 細胞であった。これらの 3 例は全てスコア 3 の重症度を示す患者であった。一例は未治療の患者で、皮膚および粘膜に広範囲に水疱びらんを認めた。残りの 2 例は、prednisolone と cyclosporine による治療に抵抗性を示した。軽症例や寛解例 (重症度 0-2)、ならびに健常人からはスポットは検出されなかった。

上述の結果から、本法により、PV 患者循環血中に存在する Dsg3 特異的な IgG 産生 B 細胞の検出およびその頻度の算定が可能となった。

2. PV 患者 PBMC からの Dsg3 特異的なメモリー B 細胞の検出ならびにその頻度の算定

PBMC を *in vitro* で、低濃度の PWM と rDsg3 とで併用刺激したものについて限界希釈法を併用した ELISPOT 法を行い、患者循環血中に存在する Dsg3 特異的なメモリー B 細胞を検出した (図 1 B)。PV 患者 14 例から採取した PBMC21 検体と、健常人 10 例から採取した PBMC10 検体を用いた。抗原特異的なメモリー B 細胞が、スコア 3 の重症度を示す 4 例の患者全てから検出されたのみでなく、スコア 2 を示す 2 例の患者全て、スコア 1 を示す患者の 4 例中 3 例 (8 検体中 6 検体)、ならびに寛解例の患者の 6 例中 2 例 (7 検体中 3 検体) からも検出された。症状の重症度と抗原特異的なメモリー B 細胞の頻度との間に明らかな相関関係は見出せなかった。抗原特異的なメモリー B 細胞は、Dsg3 ELISA 陽性患者の PBMC からのみ検出された。健常人か

らは抗原特異的なメモリーB細胞は検出されなかった。

以上の結果から、本法を *in vitro* での刺激培養と併用することにより、抗原特異的な IgG 産生 B 細胞が検出されない軽症例や寛解例の患者から、抗原特異的なメモリー B 細胞を検出、計数できることが明らかとなった。

3. *in vitro* での抗 Dsg3 抗体産生における T 細胞の役割

さらに本法により、抗 Dsg3 抗体産生における T 細胞の役割について検討した。まず PV 患者 3 例 (KH、ET、CK) から採取した PBMC を抗原特異的に刺激し、自己抗体産生細胞を活性化するための至適培養条件をそれぞれの患者由来の PBMC について決定した (表 1)。

次に、T 細胞、特に CD4 陽性ヘルパー T 細胞が、*in vitro* での抗 Dsg3 抗体産生に必要なものであるかを検討するため、前述の 3 例の PV 患者 PBMC から CD4 陽性 T 細胞を除去したものについて、至適条件下で 7 日間培養した後に ELISPOT 法を行い、得られたスポット数を CD4 陽性 T 細胞を除去していないものと比較した。全例の患者で、抗 Dsg3 抗体の産生は、CD4 陽性 T 細胞を除去することによってほぼ完全に阻害された (図 2)。

最後に、*in vitro* での抗 Dsg3 抗体産生に対する MHC クラス II 阻害抗体の効果について検討した。抗 HLA-DR、HLA-DQ、HLA-DP モノクローナル抗体と、アイソタイプコントロール抗体とをそれぞれ培養開始時に添加した。2 例の患者では (KH、ET)、抗 HLA-DR、HLA-DQ 抗体のいずれを添加したときも抗体産生が阻害されたが、1 人の患者では (CK)、抗 HLA-DQ 抗体を添加したときのみ抗体産生が阻害された (図 3)。抗 HLA-DP 抗体とアイソタイプコントロール抗体は自己抗体産生に影響しなかった。

以上の結果から、*in vitro* での抗 Dsg3 抗体産生は CD4 陽性 T 細胞と B 細胞との協調によって行われ、その際には HLA-DR、HLA-DQ 分子の双方またはいずれかと T 細胞レセプターとの結合が重要であることが示唆された。

考 察

今回、我々は ELISPOT 法を用いて、PV 患者の循環血中に存在する、Dsg3 特異的な B 細胞の検出ならびにその頻度の算出を行った。循環血中に存在する Dsg3 特異的な IgG 産生 B 細胞が重症例の PV 患者からのみ検出されたのに対し、Dsg3 特異的なメモリー B 細胞は寛解例を含む様々な重症度の患者から検出された。また抗原特異的なメモリー B 細胞を循環血中に有する全ての患者から、ELISA により Dsg3 特異的な循環抗体を検出した。すなわち軽症例の Pv 患者末梢血中には、少数のメモリー B 細胞のみが存在するのに対し、重症例の患者ではそれらの細胞に加えて、自己抗体を産生する B 細胞が末梢血中に存在した。循環血中の自己抗体産生 B 細胞の頻度は症状の重症度のある程度反映するのに対し、メモリー B 細胞の存在は、病勢よりむしろ循環自己抗体の存在と関連しているように考えられた。

また今回、CD4 陽性 T 細胞が PV 患者の抗原特異的な自己抗体の産生に関与することが証明された。このことは強皮症や自己免疫性血小板減少性紫斑病に対する過去の報告と同様 (9-10)、PV 自己抗体の産生が T-B 細胞間の相互作用によって促されることを証明するものである。さらに今回、Dsg3 特異的な IgG の産生が、抗 HLA-DR、HLA-DQ 抗体の双方あるいはいずれかの存在によって阻害されることが証明された。このことは HLA-DR と HLA-DQ 分子が Dsg3 由来のペプチドを自己反応性 T 細胞に提示することを示すものであり、また T 細胞に対する MHC

class II分子の拘束性はそれぞれのPV患者によって異なることを示唆するものである。

以上の結果により、我々はELISPOT法を用いて、PV患者循環血中に存在する自己抗体産生細胞ならびに自己反応性のメモリーB細胞を初めて検出した。またDsg3特異的な自己抗体の産生にMHCクラスII拘束性のT-B細胞の協調が必要であることを示した。今回用いた方法は、PVの自己抗体産生機序を明らかにするばかりでなく、様々な自己免疫疾患における自己抗体産生機序の解明に適用できる。

謝 辞

本研究に協力いただいた、天谷雅行、桑名正隆、西藤公司先生（慶應大）に深謝いたします。

参考文献

1. Stanley, J. R. 1993. Cell adhesion molecules as targets of autoantibodies in Pemphigus and pemphigoid, Bullous diseases due to *defective epidermal* cell adhesion *Adv Immunol* 53 : 291-325.
2. Amagai, M. 1996. Pemphigus: autoimmunity to epidermal cell adhesion molecules. *Adv Dermatol* 11 : 319-352.
3. Amagai, M., V. Klaus-Kovtun, and J. R. Stanley. 1991. Autoantibodies against a novel epithelial cadherin in pemphigus vulgaris, a disease of cell adhesion. *Cell* 67 : 869-877.
4. Amagai, M., T. Hashimoto, N. Shimizu, and T. Nishikawa. 1994. Absorption of pathogenic autoantibodies by the extracellular domain of pemphigus vulgaris antigen (Dsg3) produced by baculovirus. *J Clin Invest* 94 : 59-67.
5. Amagai, M., P. J. Koch, T. Nishikawa, and J. R. Stanley. 1996. Pemphigus vulgaris antigen (desmoglein 3) is localized in the lower epidermis, the site of blister formation in patients. *J Invest Dermatol* 106: 351-355.
6. Ishii, K., M. Amagai, R. P. Hall, T. Hashimoto, A. Takayanagi, S. Gamou, N. Shimizu, and T. Nishikawa. 1997. Characterization of autoantibodies in pemphigus using antigen-specific enzyme-linked immunosorbent assays with baculovirus-expressed recombinant desmogleins. *J Immunol* 159 : 2010-2017.
7. Amagai, M., A. Komai, T. Hashimoto, Y. Shirakata, K. Hashimoto, T. Yamada, Y. Kitajima, K. Ohya, H. Iwanami, and T. Nishikawa. 1999. Usefulness of enzyme-linked immunosorbent assay using recombinant desmogleins 1 and 3 for serodiagnosis of pemphigus. *Br J Dermatol* 140 : 351-357.
8. Lenz, P., M. Amagai, B. Volc-Platzter, G. Stingl, and R. Kirnbauer. 1999. Desmoglein 3-ELISA: a pemphigus vulgaris-specific diagnostic tool. *Arch Dermatol* 135 : 143-148.
9. Kuwana, M., T. A. Medsger, and T. M. Wright. 1995. T and B cell collaboration is essential for the autoantibody response to DNA topoisomerase I in systemic sclerosis. *J Clin Invest* 155 : 2703-2714.
10. Kuwana, M., J. Kaburaki, and Y. Ikeda. 1998. Autoreactive T cells to platelet GPIIb-IIIa in immune thrombocytopenic purpura. *J Clin Invest* 102 : 1393-1402.

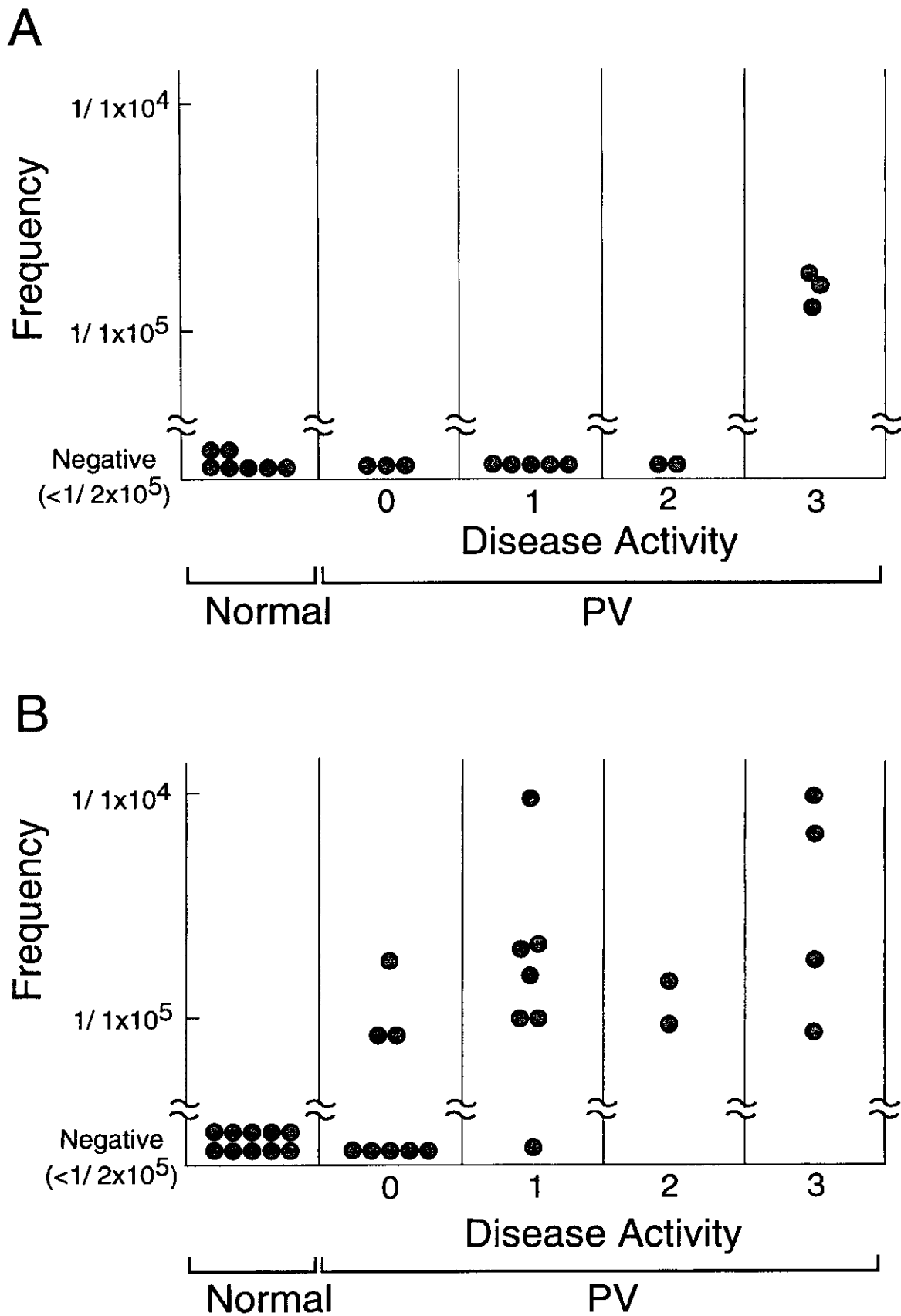


図1 PV患者PBMC中に存在する抗Dsg3IgG産生B細胞およびDsg3特異的なメモリーB細胞の頻度。(A);PV患者および健常人から採取した新鮮なPBMCをELISPOT法に用いた。(B);PV患者および健常人から採取したPBMCをin vitroでPWMとrDsg3により4日間刺激培養し、限界希釈法を併用したELISPOT法を行った。抗原特異的なB細胞の頻度を、PBMC10⁶細胞中におけるスポット数として片対数グラフ上に示した。PV患者を病勢の程度により分類した(スコア;0-3)。本法の検出限界は、PBMC10⁶細胞中0.5細胞であった。

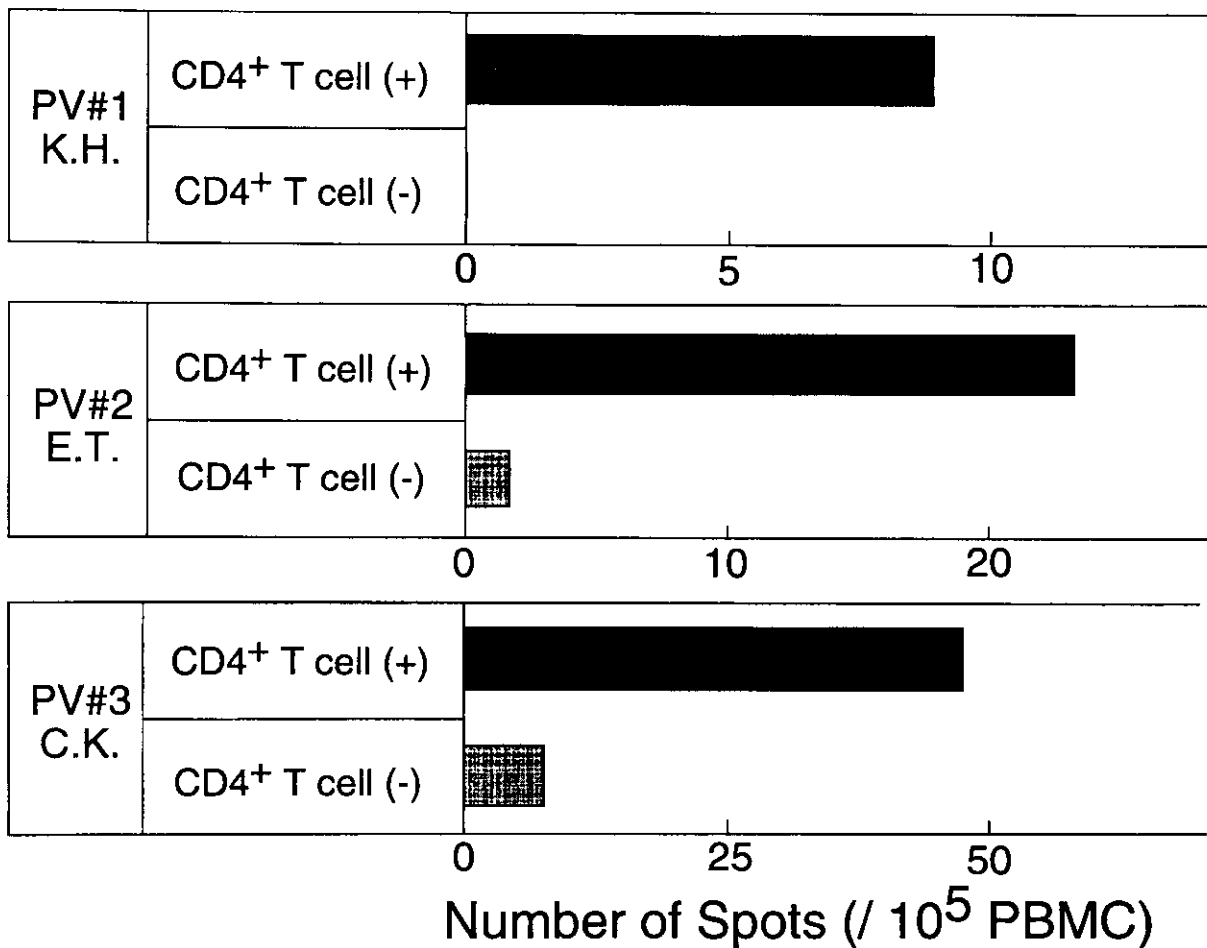


図2 CD4 陽性T細胞の除去による *in vitro* での抗体産生への影響。CD4 陽性T細胞を除去した群としていない群とでスポット数の比較を行った。PBMCを抗CD4モノクローナル抗体結合マグネティックビーズで処理し、ビーズに結合した細胞を磁気処理により除去した。マグネティックビーズを加えずに同様の処理を行った群を対照群とした。続いてこれらの細胞をPWMとrDsg3により7日間刺激培養した。スポット数はCD4陽性T細胞の除去により著しく減少した。

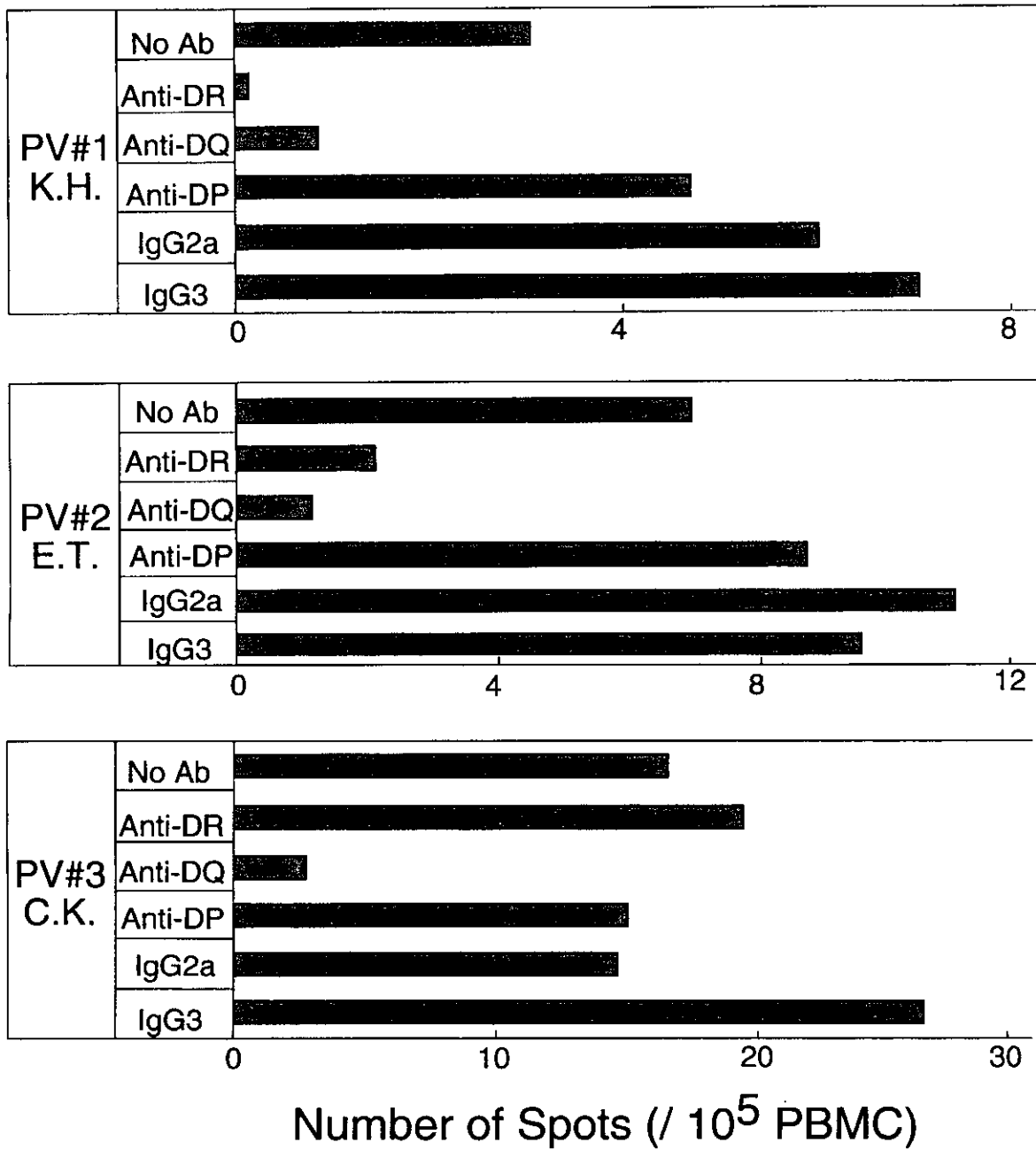


図3 抗 MHC class II モノクローナル抗体の添加による in vitro での B 細胞の分化への影響。抗 HLA-D R、HLA-DQ、HLA-DP モノクローナル抗体と、アイソタイプコントロール抗体とをそれぞれ培養開始時に添加し、それぞれの細胞を ELISPOT 法に用いた。抗 HLA-DR 抗体 (KH、ET)、抗 HLA-DQ 抗体 (KH、ET、CK) はスポット数を著しく減少させたが、抗 HLA-DP 抗体とアイソタイプコントロール抗体はスポット数に影響を示さなかった。

表 1 各 PV 患者の MHC クラス II 対立遺伝子および *in vitro* の抗原刺激に用いられた PWM と rDsg3 の至適濃度

Patient	MHC class II					Optimal concentration ($\mu\text{g per ml}$)	
	DR	DQ	DRB1	DQB1	DPB1	PWM	rDsg3
1. KH	6	1	1302/1405	0503/0604	0201/0401	0.25	0.25
2. ET	5, 6	1, 3	1202/1401	0503/0301	0501/0901	0.25	0.25
3. CK	4, 6	1, 3	0403/1401	0502/0302	0301/0501	0.125	4.00

6) 自己免疫性水疱症血清の蛍光抗体法ならびに ELISA 法による抗体 検索：日米 2 施設で交換された各 20 例の未知血清の検討

分担研究者：西 川 武 二 (慶応大学皮膚科)

抄 録

今回我々は日米 2 施設で交換された自己免疫性水疱症未知血清の間接蛍光抗体法 (IIF) とデスマグレイン ELISA の比較検討を行った。IIF、ELISA にて併せて 38/40 例において両施設間での結果が一致した。IIF は基質や検査担当者によるばらつきがあるという欠点があったが、抗表皮細胞間抗体のみならず、抗基底膜抗体や抗核抗体等の自己抗体検索に有用な検査法であった。ELISA での結果はばらつきが少なく、天疱瘡を他の自己免疫水疱症からの的確に鑑別しうる有用な検査法であることが確認された。また IIF で検出し得なかった自己抗体を ELISA にて検出し得た症例も認められた。今後自己免疫性水疱症の診断には蛍光抗体法と ELISA が併用されることが望ましい。

Comparison of indirect immunofluorescence test and pemphigus-specific enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) in autoimmune bullous diseases: exchanging 20 unknown sera between two laboratories.

Takeji Nishikawa (Keio university School of Medicine, Department of Dermatology)

Indirect immunofluorescence test (IIF) and pemphigus specific enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) in autoimmune bullous diseases were compared by exchanging 20 unknown sera between two laboratories. With IIF and ELISA altogether, the results of 38 out of 40 sera were compatible with the diagnosis. IIF was an essential tool for the diagnosis of autoimmune bullous diseases, that it was able to detect various anti-epithelial antibodies, including anti-BMZ antibodies, anti-nuclear antibodies, in addition to anti-ICS antibodies, though the results may vary depending on the substrates or the reader. ELISA, on the other hand, was a very reliable tool with minimum inconsistency in results and also useful to differentiate pemphigus from other types of autoimmune bullous diseases. For the diagnosis of autoimmune bullous diseases, combined use of IIF and ELISA are most desirable.

はじめに

自己免疫性水疱症の大標的疾患である天疱瘡の抗原蛋白であるデスマグレインを分子生物学的手法を用いて組換え蛋白として産生することが可能となり、抗体検出手段として従来の蛍光抗体法にかわる ELISA 法が開発された^{1,2)}。すなわち、昆虫細胞を用いるバキュロウイルス発現系により、本来の抗原蛋白の三次元構造をもつ組換えデスマグレイン蛋白を作成し、これを抗原とした ELISA (enzyme linked immunosorbent assay) 法が特異性及び感度の高い抗体診断法であることが示された^{1,4)}。今回、我々は、天疱瘡・類天疱瘡の自己抗体の発見者である Beutner

博士より未知血清の ELISA による抗体検索の依頼を受け、未知血清の蛍光抗体間接法（IIF）と ELISA を日米 2 施設間で比較検討することになった。すなわち、双方の研究室から 20 例の未知血清を交換し、IIF と ELISA で自己抗体の有無と抗体価を検索しその結果から 2 つの抗体検索法の長所・短所を検討した。

対 象 と 方 法

ニューヨーク大学 Buffalo 校および慶応大学皮膚科で集められた血清 20 例ずつを交換し、それぞれの血清を IIF、ELISA を用いて検討し、両研究室間の結果を比較検討した。Buffalo から送られてきた血清は 20 例中 9 例が尋常性天疱瘡（以下 PV）、7 例が落葉状天疱瘡（以下 PF）、2 例が水疱性天疱瘡（以下 BP）、2 例が正常人のものであった。その内 PV の 2 症例は同一患者のものであった。当科から Buffalo に送った症例は 8 例が PV、5 例が PF、1 例が疱疹状天疱瘡（以下 HP）、4 例が BP、2 例が正常人のものであった。PF の 1 例は寛解例の症例であった。これらの血清はお互いに情報を与えることなくブラインドで交換された。IIF に関しては Buffalo ではサルの食道およびモルモットの食道を基質として常法にて検索した。ELISA はそれぞれの研究室で組換え天疱瘡抗原 Dsg1 および Dsg3 が固相化されたプレート（MBL 社製）を用いて検討を行った。ELISA は index 値 20 を cut-off 値にして検討を行った。

結 果

それぞれの研究室で施行した結果を表に示す。

東京から Buffalo に送った血清 20 例の結果

表 1 に東京から Buffalo に送った血清 20 例の IIF および ELISA の結果を示した。IIF では 20 例中 19 例において研究室間での結果が一致し、一方 ELISA では全症例において研究室間での結果の一致を認めた。まず IIF における結果であるが、同じ症例でも基質によって陽性、陰性と結果のばらつきが得られた症例が当科においては 3 例、Buffalo においては 6 例に認められた。また、1 例において正常人の血清にも関わらずモルモットの基質で BMZ への反応を認めた症例があった。具体的に問題となった症例をここで述べる。まず症例 9T、14T、20T の 3 症例において当科でヒト正常皮膚およびモルモット食道間で基質の違いにより異なる結果が得られた。また症例 8T、9T、11T、14T、15T、20T の 6 症例において BMZ でサルの食道およびモルモット食道間の基質の違いにより異なる結果が得られた。症例 11T の正常人の血清においては、Buffalo 大学側でモルモットの基質を用いた IIF で BMZ に陽性反応を認め、いわゆる false positive と判定された。また 15T の PV の症例においてはモルモットを基質として用いた結果、当院では ICS に陽性、Buffalo では陰性という異なる結果が得られた。さらに 5T の疱疹状天疱瘡の症例においては IIF では抗核抗体陽性のためマスクされていた抗表皮細胞間抗体が両施設で ELISA によって初めて認識された。

Buffalo から東京に送られてきた血清 20 例の結果

表 2 に Buffalo から東京に送られてきた血清 20 例の結果を示した。IIF では、20 例全症例において診断通りの結果が得られ、ELISA においては 1 例を除いた 20 例中 19 例において結果が一致した。まず IIF における結果であるが、基質の違いによる結果のばらつきは当科にて 2 例、

Buffaloにて4例に認められた。また同じモルモットの基質を用いた結果においても研究室間で異なる結果が4例に認められた。Buffaloから送られてきた血清の中で注目すべき症例はまず症例2Bおよび4Bは同一症例で、PVの症例であったが、IIFおよびELISA両者において同じ結果が得られた。一方7B、8B、9B、10B、の4症例においてBuffalo側でサル食道およびモルモットの食道間で基質の違いにより異なる結果が得られ、これら4症例においては当院でのモルモット基質を用いた結果とも異なる結果が得られた。また7Bおよび11Bの2症例においては当科でヒト正常皮膚およびモルモット食道間で基質の違いによりばらついた結果が得られた。症例17Bにおいては研究室間でのELISAの結果が当科では陽性、Buffalo側では陰性と異なる結果が得られた。この症例はPF患者であったが、当科でのDsg3の値がcut-off値である20を若干ではあったものの越えており、false positiveと判定された。

考 案

今回の日米未知血清交換によるIIFならびにELISAの比較検討は両法の長所、短所を明瞭にさせたと言える。両法の特徴を表2にまとめた。すなわち、IIFは抗表皮細胞間抗体のみならず、抗基底膜部抗体や抗核抗体の存在を証明しうる皮膚科領域の自己抗体検索に有用な検査法である。しかしながら、基質によるバラツキは特に検査担当者により大きく、米国の検査では偽陰性症例は10例、日本では、5例であった。Sabolinskiら⁹⁾の天疱瘡病型と基質の検討によればPVではサル食道粘膜、PFではモルモット食道粘膜が最適であるということになり、この知見を今回のIIFにあてはめると米国の偽陰性は基質が適当でなかったためのものということになる。一方、日本での検査はサル食道粘膜を使用し得なかったために米国例と比較し得ないが偽陰性5例のうち3例は基質の不適といえる。しかし、モルモット食道粘膜は、日米双方で使用し、米国での5例の陰性例は、日本の検査では陽性を示したことは、IIFが、検査者の観察によって左右されることを示すものである。IIFではBuffaloから同じ血清が異なったナンバー(2B、4B)で送られたが、日本の検査で的確な結果(同じ結果)を観察し得たことは検査法、もしくは検査者の観察眼の正確さを示唆するといえよう。

一方、ELISAでの検査結果のバラツキはIIFほど大きくなく、偽陰性を示した症例は見られなかった。しかし、1例(17B)において日本の結果がわずかではあるが、カットオフ値を越えて陽性となったために、PFの血清がPVと血清学的に誤って診断される結果となった。他の症例では両国での検査のバラツキはIIFほどでなく、正しい診断に至ったことは特筆されよう。また、5Tでは、両国のIIFの観察では共に抗核抗体強陽性で抗表皮細胞間抗体は陰性であったが、ELISAではいずれも抗Dsg抗体抗体陽性の成績を得たことも特筆すべきである。ELISAは天疱瘡を他の自己免疫性水疱症あるいは抗核抗体を有する症例から、的確に鑑別する有用な方法であることが、今回の共同研究からも明らかとなった。また、病型の鑑別にも有用であることも確認された。本法は一度に多数例の検索が可能であるし、検査者によるバラツキのすくないことから、今後、検査室レベルでも幅広く使用しうる検査法である。

それ故、今後の自己免疫性水疱症の診断には、蛍光抗体法とデスマグレインELISAが使用されることが望ましい。

謝 辞

本研究に協力していただいた布袋祐子、天谷雅行先生に深謝いたします。

参考文献

1. Ishii K., M. Amagai, R. P. Hall, T. Hashimoto, A. Takayanagi, S. Gamou, N. Shimizu, T. Nishikawa: Characterization of autoantibodies in pemphigus using antigen-specific ELISAs with baculovirus expressed recombinant desmogleins. *J Immunol* 159 : 2010-2017, 1997.
2. Amagai M., A. Komai, T. Hashimoto, T. Yamada, Y. Kitajima, K. Ohya, H. Iwanami, T. Nishikawa: Usefulness of enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) using recombinant desmogleins 1 and 3 for serodiagnosis of pemphigus. *Br J Dermatol* 140 : 351-357, 199.
3. Lenz P., M. Amagai, B. Volc-Platzer, G. Stingl, R. Kirnbauer : Desmoglein3-ELISA : A pemphigus vulgaris-specific diagnostic tool. *Arch Dermatol* 135 : 143-148, 1999.
4. 布袋祐子、天谷雅行、西川武二、木下慶子、大矢和彦 : 新しい天疱瘡の血清学的診断法—組換え天疱瘡の血清学的診断法。 *臨皮* 53 : 1081-1086, 1999.
5. 石井健 : バキュロウイルス発現系による組換え天疱瘡抗原を用いた ELISA 法の有用性。 *日皮会誌* 108 : 937-942, 1998.
6. Sabolinski ML., E. H. Beutner, S. Krasny, V. Kumar, J. Huang, T. P. Chorzelski, S. Sampaio, J. C. Bystryń : Substrate specificity of anti-epithelial antibodies of pemphigus vulgaris and pemphigus foliaceus sera in immunofluorescence tests on monkey and guinea pig esophagus substrates. *J Invest Dermatol* 1087 : 545-549, 1987

表 1 東京から Buffalo に送った血清 20 例の結果

No.	診断	慶応 (IIF)			Buffalo (IIF)			慶応 (ELISA)		Buffalo (ELISA)	
		NHS ⁺	GE ⁺	IIF Pat ⁺	ME	GE	IIF Pat	Dsg3	Dsg1	Dsg3	Dsg1
#1T	PF	160	160	ICS	320	320	ICS	3.3	106.6	2.1	137.8
#2T	BP	10	160	BMZ	20	40	BMZ	-1.1	-1.0	1.3	0.0
#3T	Normal	<10	<10	-	<10	<10	-	2.7	13.3	1.4	0.7
#4T	PF	160	160	ICS	40	20	ICS	0.1	85.0	0.4	64.8
#5T	HP	<10	<10	ANA(++)	<10	<10	ANA(+)	28.1	5.7	20.0	3.7
#6T	PV	160	40	ICS	320	40	ICS	193.6	8.4	185.9	12.2
#7T	PF	160	160	ICS	320	160	ICS	-1.8	53.2	0.5	114.0
#8T	PF	40	40	ICS	<10	80	ICS	2.5	105.7	1.2	102.5
#9T	PV	40	<10	ICS	20	<10	ICS	120.1	11.3	108.3	11.2
#10T	PF	<10	<10	-	<10	<10	-	0.1	2.7	1.1	8.0
#11T	Normal	<10	<10	-	40	<10	BMZ	0.7	2.8	0.5	0.6
#12T	PV	40	40	ICS	160	160	ICS	199.3	64.7	106.8	59.1
#13T	BP	<10	<10	-	<10	<10	-	3.3	3.6	0.9	4.2
#14T	PV	40	<10	ICS	320	<10	ICS	223.0	3.2	213.1	3.3
#15T	PV	40	40	ICS	320	<10	ICS	130.7	2.0	150.2	2.1
#16T	PV	40	40	ICS	320	80	ICS	198.8	1.5	198.5	1.5
#17T	BP	160	160	BMZ	>320	>320	BMZ	5.2	2.1	5.2	2.9
#18T	Normal	<10	<10	-	<10	<10	-	9.3	3.1	3.6	2.6
#19T	PV	40	160	ICS	320	160	ICS	249.6	68.0	212.1	51.9
#20T	PV	10	<10	ICS	40	<10	ICS	92.0	0.5	71.9	1.8

表2 Buffaloから東京に送られてきた血清20例の結果

No.	診断	慶応 (IIF)			Buffalo (IIF)			慶応 (ELISA)		Buffalo (ELISA)	
		NHS ⁺	GE ⁺	IIF Pat ⁺	ME	GE	IIF Pat	Dsg3	Dsg1	Dsg3	Dsg1
#1B	BP	40	160	BMZ	<10	<10	BMZ	0.5	0.9	-0.8	-0.3
#2B	PV	40	160	ICS	160	160	ICS	158.8	78.7	152.3	130.1
#3B	normal	<10	<10	-	<10	<10	-	0.4	0.3	0.4	1.4
#4B	PV	40	160	ICS	160	160	ICS	164.5	84.9	150.3	130.3
#5B	BP	40	160	BMZ	<10	<10	BMZ	-0.7	-0.4	0.2	0.0
#6B	PV	10	40	ICS	2560	10	ICS	219.9	8.2	231.2	10.5
#7B	PV	<10	10	ICS	160	<10	ICS	123.8	2.1	94.8	1.6
#8B	PV	160	160	ICS	1280	<10	ICS	235.4	65.6	233.1	10.2
#9B	PV	40	40	ICS	320	<10	ICS	242.1	1.9	206.2	3.2
#10B	PV	40	40	ICS	>640	<10	ICS	231.8	0.4	153.3	1.0
#11B	PV	<10	10	ICS	80	80	ICS	111.9	29.4	79.0	37.2
#17B	PF	40	40	ICS	160	640	ICS	20.5	110.3	3.1	99.7
#19B	PV	160	260	ICS	2560	640	ICS	237.7	103.2	215.2	96.6
#20B	normal	<10	<10	-	<10	<10	-	0.2	0.8	0.7	1.1
#21B	PF	40	160	ICS	320	640	ICS	0.2	116.9	0.6	143.1
#22B	PF	40	40	ICS	320	640	ICS	-1.3	121.3	0.1	139.4
#23B	PF	40	40	ICS	320	640	ICS	18.3	122.2	5.1	136.5
#24B	PF	40	40	ICS	640	640	ICS	19.1	120.4	6.2	139.0
#25B	PF	40	40	ICS	320	640	ICS	1.6	125.8	1.2	146.2
#26B	PF	40	160	ICS	320	640	ICS	-1.3	148.0	0.8	138.0

7) 培養表皮細胞創傷モデルの治癒過程における天疱瘡抗体の影響

分担研究者：北 島 康 雄（岐阜大学皮膚科）

共同研究者：山 田 孝 宏、青 山 裕 美（岐阜大学皮膚科）

キーワード：天疱瘡、デスモソーム、デスモグレイン、ケラチノサイト、創傷治癒

抄 録

〔目的〕我々は先に天疱瘡抗体（PV-IgG）を培養ケラチノサイト（KC）に作用させると、desmoglein3（Dsg3）がリン酸化・分解され、20分で可溶性プールから、32時間でデスモソーム（DS）から消失することを報告した。このことは、PV-IgGはDSを離解するより、正常DSをDsg3欠損DSと置換することを示唆する。そこで、今回はこれをより実験的に明確にすることを目的とした。〔方法〕培養DJM-1細胞（ヒト扁平上皮細胞癌）を用いて、DSの代謝回転の速い系（培養KCのコロニーをピペットの先で多数の溝を作った創傷モデルの回復過程）を考案した。溝は48時間で破覆される様に作成し、一定時間後に、DSの構成分子の量的変化をPV-IgGの存在下・非存在下で細胞質、Triton X-100可溶性画分（膜+ α ）、細胞骨格画分に分離し免疫ブロット法で分析した。〔結果〕コントロールでは創傷作成後30分ですでにDsg3がTriton X-100可溶性プールから減少し、48時間後には回復した。PV-IgG添加群細胞骨格画分では30分で若干減少し48時間後減少し、PV-IgG+創傷群では1例で早期から減少した。〔結論〕本研究は培養KC創傷モデルではDSの代謝回転が促進していることを示した。また、PV-IgG存在下ではDsg3-欠損DSを早期から形成することを示した。このことから、天疱瘡では炎症等表皮細胞回転の亢進している部位で発症しやすいことが推測される。

はじめに

天疱瘡抗体（PV-IgG）がデスモソーム（DS）構成分子 desmoglein3（Dsg3）に結合した後の水疱形成に至る機序は不明である。我々は水疱形成機序に関して抗体とDsg3との結合で惹起される細胞内シグナル伝達の観点から培養ケラチノサイト（KC）と癌（DJM-1）細胞を用いて研究してきた（1）。これまでにPV-IgGのDsg3への結合によって、イノシトールリン脂質代謝回転（PI-turnover）亢進（2）とCa⁺⁺流入（3）とprotein kinase C（PKC）の活性化が30秒以内に生じ（4）、これがプラスミノージェンアクチベータの分泌につながる（5）を報告した。さらにPKCについてはPKC α 、 δ 、 ζ 、 ϵ に対する各抗体を用いて免疫ブロットで検討したところ、すべてのPKCが細胞質から細胞膜画分へPV-IgG刺激30秒後に転移したこと、PKC α は30分後まで転移し、 δ は5分後に膜から消失し一過性転移であったことを見いだしている（4）。

一方、Dsg3の細胞表面の分布については、モルモット表皮のトリプシン処理遊離細胞を用いたフェリチンラベル法（6）、マウス表皮を用いたペルオキシダーゼ法（7）、培養マウス表皮ケラチノサイトおよび患者皮膚を用いた金ラベル法（8）、また、患者皮膚のペルオキシダーゼ法（9）による観察結果から、デスモソームとそれ以外の細胞膜表面に分布していることが報告されてきた。しかし、最近ではDsg3はデスモソームに局限して分布し、非デスモソーム細胞膜表

面にはほとんど分布していないという報告が多い(10-15)。また、PV-IgGの結合後Dsg3の運命については、細胞内に取り込まれるという報告(6、7)もあるが、不明な点が多い。我々は昨年度の研究ではこの点に注目し、Dsg3の非デスモソーム細胞膜表面での分布様態とそのPV-IgG結合後の分布動態を免疫電顕の時間差ラベルによって検討したところ、そのエンドサイトーシスによる細胞内取込を確認した(投稿中)。

さらに、昨年度研究では、培養DJM-1細胞(ヒト扁平上皮細胞癌)を用いて、PV-IgG添加によるDsg3の量的変化を細胞質、膜、細胞骨格画分に分画し免疫ブロット法で分析し、加えて細胞内分布変化を蛍光抗体法で観察した。その結果、PV-IgGの結合20分で、Dsg3のみが膜画分から消失し、30時間後には膜画分、細胞骨格画分両者から消失した。蛍光抗体法では、30時間後には細胞間橋からDsg3のみが消失し、Dsg1、DPK、PGは細胞間橋に認められた(16)。以上から、PV-IgGが細胞表面のDsg3分子に結合するとDsg3は20分以内にそのプールから消失し、30時間後にはDsg3欠損デスモソームが形成されることが示唆される。この現象は、Dsg3ノックアウトマウスの結果(17)と考えあわせると水疱形成に關与する可能性が高いと推察される。本実験ではさらにこの現象を顕著にするためにDSの分解と形成回転の亢進している系を考案し、同様の実験を行った。

材 料 と 方 法

1) IgGの精製

尋常性天疱瘡3例、および健常人の血清より、ハイトラップープロテインA-アフィニティカラム(ファルマシア)を用いてIgG分画を得た。尋常性天疱瘡の診断は臨床症状、直接免疫蛍光抗体法、間接免疫蛍光法およびイムノブロット法によって行われた。また、抗体のDsg3への結合性は、リコンビナントDsg3を基質にしたELSA法(18)によって確認し、Dsg1に対する抗体活性のない血清を用いた。

2) 細胞の培養

ヒト扁平上皮癌細胞から分離したDJM-1細胞(19)を、Eagle's essential medium (MEM), 0.09mM Ca^{2+} , 0.4ug/ml ハイドロコチゾン、10ng/ml EGF, 84ng/ml コレラトキシン、100units/ml ペニシリン、100mg/ml ストレプトマイシン、10%FCSを含む培地中で100mmシャーレ内で培養した。継代後、コンフルエントになった細胞を1.87mM Ca^{2+} 培地で1-3日間培養した後実験に用いた。

創傷モデルは上記のように培養したコロニーをピペット(200 μ l yellow pipette chip, Greiner GmbH, Frickenhausen, Germany)の先で図のように溝を作成した。溝の太さは、48時間で閉鎖される幅に設定した。

3) DS構成分子の細胞内分布変化解析のための細胞分画と免疫ブロット

上記のように創傷モデルとして培養したDJM-1細胞をPV-IgG、正常ヒトIgG、または緩衝液のみを0.3mg/mlになるように添加し、30分間、1、4、24または、48時間培養した後、生理的食塩水リン酸緩衝液(PBS)で洗浄し、緩衝液A(1mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 5mM E64, PBS)で超音波処理し、105,000G、1時間超遠心後の上清を細胞室画分、沈渣をさらに1% Triton X-100含有緩衝液Aで超音波処理、超遠心後の上清をTriton X-100可溶性(s画分

(ここでは膜画分とする)、その沈渣を細胞骨格画分として分離した。細胞骨格画分にはデスモソームも含まれる。それぞれの画分をデスモソーム構成分子である Dsg1、Dsg3、デスモプラキン (DPK)、プラコグロビン (PG)、E-カドヘリン (E-Cad) に対する抗体で免疫ブロットを行った。

4) 免疫ブロットによる解析

免疫ブロット用試料を 2%SDS, 10%2-メルカプトエタノール、30%グリセロール、0.25M トリス液 (pH. 6.8) に溶解 (98°C、5 分) 後、10%ポリアクリルアミドゲルを用いて電気泳動し (1 レーンあたり 30g のサンプル)、その後ニトロセルロース膜に転写した。この膜を、一次抗体として抗デスモソーム構成分子である Dsg1、Dsg3、DPK、PG、E-Cad に対する抗体で免疫ブロットを行った。検出は ECL デイテクションシステム (アマシャム) を用いて発色した。

結果と考察

1. 創傷治癒過程における DS 分子の量的変化

培養 DJM-1 細胞を方法の項に述べたように多数の溝を 48 時間後に修復される幅に造り、経時的に全細胞 SDS 可溶化タンパク質の免疫ブロットによって、DS 構成分子の量的変化を追跡した。その結果、Dsg3、Dsg1、PG において創傷後 30 分から 4 時間まで著名な減少が見られた (図 2)。

ついで、細胞を細胞質、Triton X-100 可溶性画分、細胞骨格画分に分画し、検討した (図 3)。Dsg3 と PG は細胞質画分では検出されず、細胞膜画分と細胞骨格画分に分布した。Dsg1 と E-Cad は 3 分画共に分布し、DPK は細胞質画分と細胞骨格画分のみ分布した。創傷後 30 分から 4 時間の間で Dsg3、PG 及び Dsg1 が細胞膜画分で有意な減少を示した。DPK も細胞質画分においてこの時間内で著名な減少を示した。細胞骨格画分ではこれらの分子の減少は 30 分から 24 時間で軽度見られた。このことは DS の量 (数) の減少に比してその構成分子の細胞膜あるいは細胞質プールでの減少を示唆し、しいては、DS の形成と分解の回転の亢進を示唆している。

2. 創傷治癒過程における DS 分子の量的変化に対する PV-IgG の影響

Dsg3 は、膜画分と細胞骨格画分において創傷後 48 時間で元の量に復元している (図 2) が、PV-IgG 添加群では創傷群 (図 3 の PW)、非創傷群 (P) 共に減少している。しかし、細胞骨格画分で PV-IgG 添加群において、非創傷群 (図 3、P の 48) より創傷群 (図 3、PW の 48) でより著名に減少している。また、両群共に、細胞骨格における Dsg1、DPK に対する Dsg3 の構成量比が、天疱瘡添加非創傷群より極めて少なくなっていることを示唆している。すなわち、48 時間後の時点で Dsg1、DPK の減少が全く見られないことは DS の数の減少はほとんどないことを示唆するので、創傷 (DS の代謝回転亢進) は Dsg3 欠損 DS の形成を促進するといえよう。このことは、一旦炎症が起きて、表皮の回転が亢進すると水疱がさらに生じやすくなることを説明するかもしれない。

参考文献

- 1) Seishima M, Esaki C, Osada K, Mori S, Hashimoto T, Kitajima Y. Pemphigus IgG, but not bullous pemphigoid IgG, causes a transient increase in intracellular calcium and inositol, 4, 5-trisphosphate in DJM-1 cells, a squamous cell carcinoma line. *J. Invest. Dermatol* 104 : 33-37, 1995.
- 2) Esaki C, Seishima M, Yamada T, Osada K, and Kitajima Y. Pharmacologic evidence for involvement of phospholipase C in pemphigus IgG-induced inositol 1, 4, 5-trisphosphate generation, intracellular calcium increase, and plasminogen activator secretion in DJM-1 cells, a squamous cell carcinoma line. *J. Invest. Dermatol* 105 : 329-333, 1995.
- 3) Osada K, Seishima M, Kitajima Y. Pemphigus IgG activates and translocates protein kinase C from the cytosol to the particulate/cytoskeleton fractions in human keratinocytes. *J Invest Dermatol* 108 : 482-487, 1997.
- 4) Kitajima Y : Adhesion molecules in the pathophysiology of bullous diseases. *Eur J Dermatol* 6 : 399-405, 1996.
- 5) Seishima M, Satoh S, Nojiri M, Osada K, Kitajima Y : Pemphigus IgG induces expression of urokinase plasminogen activator receptor on the cell surface of cultured keratinocytes. *J Invest Dermatol* 109 : 650-655, 1997.
- 6) Takigawa M, Imamura S, Ofuji S : Surface distribution of pemphigus antibodybinding substance(s) on isolated guinea pig epidermal cells. An immunoferritin electron microscopic study. *J Invest Dermatol* 71 : 182-185, 1978.
- 7) Takahashi Y, Patel HP, Labib RS, Diaz LA, Anhalt GJ : Experimentally induced pemphigus vulgaris in neonatal BALB/c mice : a time-course study of clinical, immunologic, ultrastructural, and cytochemical changes. *J Invest Dermatol* 84 : 41-46, 1985.
- 8) Jones JC, Yokoo KM, Goldman RD : A cell surface desmosome associated component : identification of tissue-specific cell adhesion molecule. *Proc Natl Acad Sci USA* 83 : 7283-7286, 1986.
- 9) Bedane C, Prost C, Thomine E, Intrator L, Joly P, Caux F, Blecker M, Bernard P, Leboutet MJ, Tron F, Lauret P, Bonnetblanc JM, Dubertret L : Binding of autoantibodies is not restricted to desmosomes in pemphigus vulgaris : Comparison of 14 cases of pemphigus vulgaris and 10 cases of pemphigus foliaceus studied by Western immunoblot and immunoelectron microscopy. *Arch Dermatol Res* 288 : 343-352, 1996.
- 10) Jones JCR, Yokoo KM, Goldman RD : Further analysis of pemphigus autoantibodies and their use in studies on the heterogeneity, structure and function of desmosomes. *J Cell Biol* 102 : 1109-1117, 1986.
- 11) Karpati S, Amagai M, Prussick R, Cehrs K, Stanley JR : Pemphigus vulgaris antigen, a desmoglein type of cadherin, is located within keratinocyte desmosomes. *J Cell Biol* 122 : 409-415, 1993.
- 12) Iwatsuki K, Takigawa M, Imaizumi S, Yamada M : In vivo binding site of pemphigus vulgaris antibodies and their fate during acantholysis. *J Am Acad Dermatol* 20 : 578-582, 1989.
- 13) Iwatsuki K, Takigawa M, Jin F, Yamada M : Ultrastructural binding site of pemphigus foliaceus autoantibodies : comparison with pemphigus vulgaris. *J Cutan Pathol* 18 : 160-163, 1991.
- 14) Akiyama M, Hashimoto T, Sugiura M, Nishikawa T : Ultrastructural localization of pemphigus vulgaris and pemphigus foliaceus antigens in cultured human squamous carcinoma cells. *Br J Dermatol* 125 : 233-237, 1991.
- 15) Zhou S, Ferguson DJP, Allen J, Wojnarowska F : The location of binding sites of pemphigus vulgaris and pemphigus foliaceus autoantibodies : a postembedding immunoelectron microscopic study. *Br J Dermatol* 136 : 878-883, 1997.
- 16) Aoyama Y, Kitajima Y : Pemphigus vulgaris-IgG causes a rapid breakdown of free desmoglein 3 (Dsg3),