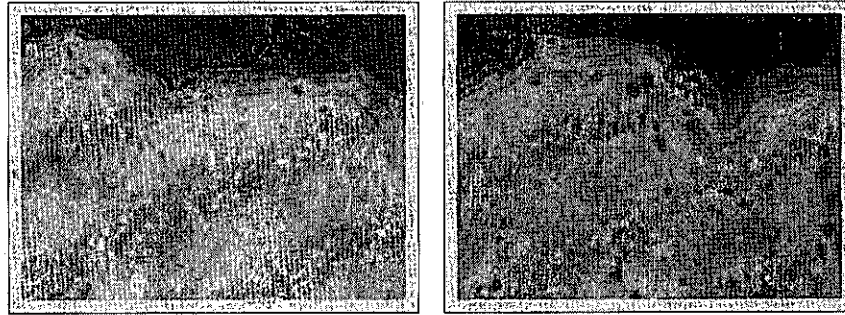


図1 免疫ブロット法の結果

- 左) ヒト Dsc1,2,3 リコンビナント蛋白は抗 E-tag 抗体を用いた免疫ブロット法において予想された大きさの蛋白バンドを示した。
- 右) ヒト Dsc1,3 リコンビナント蛋白はそれぞれに特異的な 2 種のポリクローナル抗体 (Dsc1 に関しては JCMC と D1K2、Dsc3 に関しては LNCF3 と KK-2) と反応した。

Immunoabsorption assay (IgG)



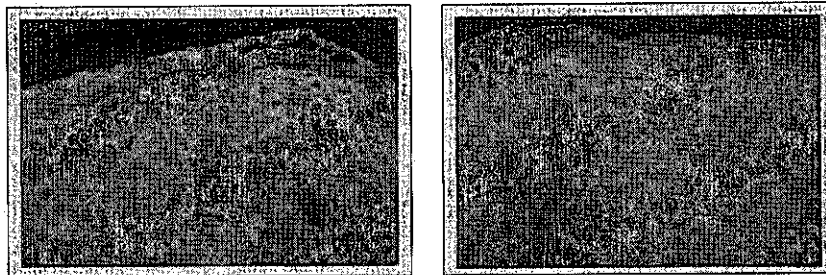
A: control solution

B: rDsc1-His

図2 吸収試験の結果 (IgG)

- A) Dsc1 に対して IgG/IgA の自己抗体をもつ患者血清を、全くバキュロ蛋白が含まれていない、High Five 細胞だけの培養上清と一晚 incubation したものを 1 次抗体として反応させ、二次抗体として FITC 標識抗ヒト IgA 抗血清を用いて蛍光抗体間接法を行った。High Five 細胞の培養上清では反応は全く吸収されなかった。
- B) 同じ血清を Dsc1 バキュロ蛋白が含まれている培養上清と一晚 incubation したものを 1 次抗体として蛍光抗体間接法を行うと反応は完全に吸収された。

Immunoabsorption assay (IgA)



A: control solution

B: rDsc1-His

図3 吸収試験の結果 (IgA)

- A) Dsc1 に対して IgG/IgA の自己抗体をもつ患者血清を、全くバキュロ蛋白が含まれていない、High Five 細胞だけの培養上清と一晚 incubation したものを 1 次抗体として反応させ、二次抗体として FITC 標識抗ヒト IgA 抗血清を用いて蛍光抗体間接法を行った。High Five 細胞の培養上清では反応は全く吸収されなかった。
- B) 同じ血清を Dsc1 バキュロ蛋白が含まれている培養上清と一晚 incubation したものを 1 次抗体として蛍光抗体間接法を行うと反応は完全に吸収された。

4) バキュロウイルス発現蛋白を用いた ELISA 法による IgG および IgA 抗デスマコリン 1,2,3 自己抗体の検出

分担研究者：橋 本 隆（久留米大学医学部皮膚科）
研究協力者：永 田 祥 子（久留米大学医学部皮膚科）
天 谷 雅 行（慶應義塾大学医学部皮膚科）

要 約

前回、私どもはバキュロウイルス発現系を用いてデスマコリン (Dsc) 1,2,3 のリコンビナント蛋白を作製したことを報告した。今回、私どもは、これらのバキュロ蛋白を用いた ELISA 法を確立し、各種天疱瘡血清の IgG ならびに IgA 抗体の反応性について検討した。全般的に各種 Dsc に対する自己抗体の検出率は低く、この ELISA 法の特異性が示唆された。しかしながら、1 例の IgG/IgA 天疱瘡において、IgG/IgA 抗 Dsc1 抗体が検出された。さらに、1 例の異型な天疱瘡症例で IgG および IgA 抗 Dsc3 抗体が、また 1 例の異型な IgA 天疱瘡症例で IgA 抗 Dsc2、IgA 抗 Dsc3 抗体が検出された。これらの反応は Dsc2, 3 cDNA をトランスフェクトした COS7 細胞との陽性反応で確認された。本研究は Dsc2、Dsc3 に対する自己抗体の存在を示したはじめの研究である。

目 的

この研究に至った背景については前回の報告で述べているので、ここでは簡単に述べる。まず第 1 にデスマコリン (Dsc) に対する自己抗体は従来の免疫プロット法や免疫沈降法によって検出できないということ、第 2 に cDNA トランスフェクション法によって、SPD 型 IgA 天疱瘡の自己抗原が Dsc1 であることが判明したこと、第 3 に、現在のところ IgG 抗デスマコリン抗体を検出する方法は確立していないことが挙げられる。今回、私どもは前回、作製したバキュロウイルス発現系を用いた Dsc1,2,3 のリコンビナント蛋白を用いた ELISA 法を確立し、各種天疱瘡血清の IgG ならびに IgA 抗体の反応性について検討を行った。

方 法

1) 血清：古典的天疱瘡 45 例、腫瘍随伴性天疱瘡 (PNP) 22 例、ブラジル天疱瘡 (BPF) 21 例、妊娠性疱疹 (HG) 30 例、疱疹状天疱瘡 (HP) 13 例、水疱性類天疱瘡 (BP) 12 例、SPD 型 IgA 天疱瘡 8 例、IEN 型 IgA 天疱瘡 11 例、異型 IgA 天疱瘡 1 例、異型 IgG/IgA 天疱瘡 3 例、正常人コントロール 23 例。

2) ELISA：精製した Dsc1,2,3 バキュロ蛋白を 0.5mM の CaCl_2 を含んだ PBS (PBS-Ca) で 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度に希釈し、それを 50 μl ずつ ELISA plate に 4 $^{\circ}\text{C}$ で一晩、コーティングした。翌日、High Five 昆虫細胞の培養上清に 1% BSA、10% FCS を加えたものを blocking buffer とし、ELISA plate を 2 時間、室温で block した。2 時間後、plate を洗い、blocking buffer で 400 倍に希釈した血清 (1 次抗体) を 50 μl ずつ plate にまき、室温に 1 時間おいた。1 時間後、plate を洗い、blocking buffer で 2000 倍に希釈した 2 次抗体 (ペルオキシダーゼ抗ヒト IgG あるいは IgA) と室温 1 時間、反応させた。その後、plate を洗い、substrate solution で発色さ

せ、その 30 分後、4 M の H₂SO₄ を 50 μ l 加え、反応を止めた。その後、ELIS Areader で 490nm 波長で吸光度を測定した。

3) COS7 細胞 cDNA トランスフェクション法 (蛍光抗体法) : ヒト Dsc1,2,3 のそれぞれの全長の cDNA を有核細胞発現ベクター pcDNA1-amp に組み込み、あらかじめ Dsc を発現してはなことを確認した COS7 細胞にトランスフェクトした。そしてその COS7 細胞に発現した Dsc1,2,3 に対する反応を蛍光抗体法で検索した。

結 果

ELISA (図 1,2) : IgG 抗体に関しては 169 症例を検討し、IgG 抗 Dsc1 抗体陽性を示した例は 6 例、IgG 抗 Dsc2 抗体陽性を示した例は 4 例、IgG 抗 Dsc3 抗体陽性を示した例は 6 例であった。IgA 抗体に関しては 46 症例を検討し、IgA 抗 Dsc1 抗体陽性を示した例は 2 例、IgA 抗 Dsc2 抗体陽性を示した例は 1 例、IgA 抗 Dsc3 抗体陽性を示した例は 2 例で、全般的に各種 Dsc に対する自己抗体の検出率は低かった。

COS7 細胞 cDNA トランスフェクション法 (蛍光抗体法) : ELISA において陽性を示した症例の中で IgA 抗体に関してのみ、COS7 細胞トランスフェクション法で確認を行った。IgA 抗 Dsc 抗体を示した 2 例は以前の検索で陽性反応を示したことが判明していた (図 3)。IgA 抗 Dsc2 抗体を示した 1 例も陽性反応を示した (図 4)。IgA 抗 Dsc3 抗体を示した 2 例も共に陽性反応を示した (図 5)。また 1 例は患者血清と Dsc3 に対するポリクローナル抗体である KK2 を用いて行った二重染色でも共に同じ染色パターンを示した (図 6)。

考 案

1 例の異型の IgG/IgA 天疱瘡において IgG/IgA 抗 Dsc1 抗体が検出され、これは Dsc1 バキューロ蛋白で完全に吸収された。さらに、1 例の異型な IgG/IgA 天疱瘡において IgG/IgA 抗 Dsc3 抗体が、また 1 例の異型の IgA 天疱瘡において IgA 抗 Dsc2、IgA 抗 Dsc3 抗体の両方が検出された。そして、これらの反応は全長ヒト Dsc2, 3 cDNA をトランスフェクトした COS7 細胞を用いた蛍光抗体法の陽性反応で確認された。以上のことから、Dsc1,2,3 に対する IgG/IgA 自己抗体は、ある特殊な non-classical type の天疱瘡血清中に存在することが示唆された。ELISA において、Dsc1,2,3 に対する IgG/IgA 自己抗体は、ある特殊な non-classical type の天疱瘡血清中に存在することが示唆された。ELISA において、Dsc1,2,3 に対する IgG 抗体を検出した症例に関しては、血清残量に限りがあるが、今後、更に検討する予定である。

参考文献

- 1) Amagai M, Klaus-Kovtun. V, Stanley JR: Autoantibodies against a novel epithelial cadherin in pemphigus vulgaris, a disease of cell adhesion. *Cell* 67: 869-877, 1991
- 2) Amagai M: Pemphigus: autoimmunity to epidermal cell adhesion molecules. *Adv Dermatol* 11: 319-352, 1996
- 3) Dmochowski M, Hashimoto T, Chidgey MAJ, Yue KKM, Wilkinson RW, Nishikawa T, Garrod DR: Demonstration of antibodies to bovine desmocollin isoforms in certain pemphigus sera. *Br J Dermatol*

133: 519-525, 1995

- 4) Hashimoto T, Kiyokawa C, Mori O, Miyasato M, Chidgey MAJ, Garrod DR, Kobayashi Y, Komori K, Ishii K, Amagai M, Nishikawa T: Human desmocollins 1 (Dsc1) is an autoantigen for the subcorneal pustular dermatosis type of IgA pemphigus. *J Invest Dermatol* 109: 127-131, 1997
- 5) Amagai M, Komai A, Hashimoto T, Shirakata Y, Hashimoto K, Yamada T, Kitajima Y, Ohya K, Iwanami H, Nishikawa T: Usefulness of enzyme-linked immunosorbent assay using recombinant decombinant desmogleins 1 and 2 for serodiagnosis of pemphigus. *Br J Dermatol* 140: 351-357, 1999

Detection of IgG and IgA autoantibodies reactive with human desmocollins 1,2 and 3 by enzyme-linked immunosorbent assays using baculovirus-expressed recombinant desmocollins.

Takashi Hashimoto¹, Yoshiko Nagata¹, Masayuki Amagai²

¹Department of Dermatology, Kurume University School of Medicine, Fukuoka, Japan,

²Department of Dermatology, Keio University School of Medicine, Tokyo, Japan.

We have previously shown that human desmocollin (Dsc) 1 is reacted by IgA antibodies of subcorneal pustular dermatosis type of IgA pemphigus. However, the presence of IgG anti-Dsc autoantibodies is still controversial, and antibodies to Dsc2 and Dsc3 have not been clearly identified. To solve these problems, we have successfully produced recombinant proteins containing entire extracellular domains of human Dsc1,2 and 3 by baculovirus-expression system, and subsequently established an enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA) for both IgG and IgA antibodies using these recombinant desmocollins. By this ELISA, none of the 45 sera of classic types of pemphigus showed IgG antibodies to any Dsc, while 3 of 21 Brazilian pemphigus sera and 2 of 22 paraneoplastic pemphigus sera showed IgG antibodies reactive with Dsc3. In addition, one atypical pemphigus serum showed IgG and IgA antibodies to Dsc1, which were completely absorbed by incubation with Dsc1 baculoprotein. Furthermore, this ELISA detected IgA anti-Dsc3 antibodies and IgA antibodies to both Dsc2 and Dsc3 in one each of atypical pemphigus case. This reactivity was confirmed by the positive IgA immunofluorescence staining with human Dsc2 and Dsc3 expressed on COS7 cells transfected with cDNA of each Dsc. These results suggest that, both IgG and IgA autoantibodies against all of Dsc1,2 and 3 are present in the sera of particular non-classical types of pemphigus, although they are rarely detected in classic pemphigus.

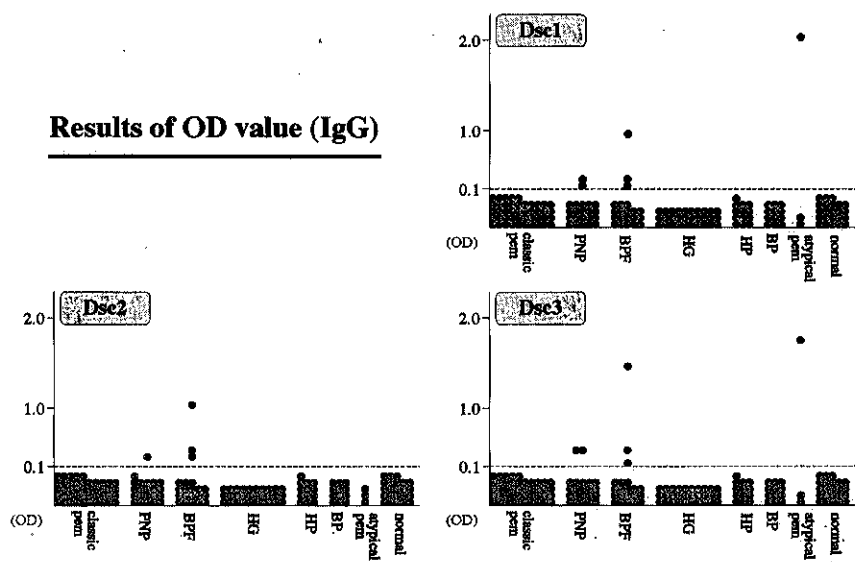


図1 ELISAの結果 (IgG)

IgG抗体に関しては169症例を検討し、IgG抗Dsc1抗体陽性を示した例は6例（PNP 2例、BPF 3例、異型な天疱瘡1例）、IgG抗Dsc2抗体を示した例は4例（PNP 1例、BPF 3例）、IgG抗Dsc3抗体を示した例は6例（PNP 2例、BPF 3例、異型な天疱瘡1例）であった。

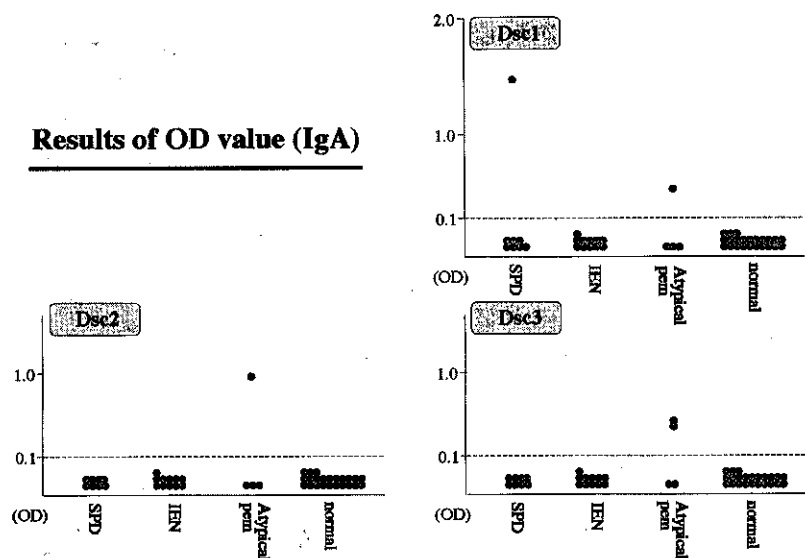


図2 ELISAの結果 (IgA)

IgA抗体に関しては46症例を検討し、IgA抗Dsc1抗体陽性を示した例は2例（SPD型IgA天疱瘡1例、異型な天疱瘡1例）、IgA抗Dsc2抗体陽性を示した例は1例（異型な天疱瘡1例）、IgA抗Dsc3抗体陽性を示した例は2例（異型な天疱瘡2例）であった。

Immunoabsorption assay

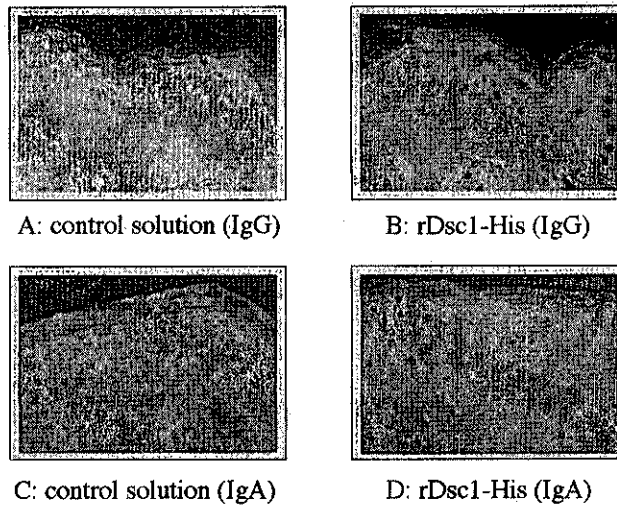


図3 吸収試験の結果

A (IgG), B (IgA); Dsc1 に対して IgG/IgA の自己抗体をもつ患者血清を、全くバキュロ蛋白が含まれていない、High Five 細胞だけの培養上清と一晚 incubation したものを 1 次抗体として蛍光抗体間接法を行った。反応は全く吸収されなかった。

C (IgG), D (IgA); 同じ血清を Dsc1 バキュロ蛋白が含まれている培養上清と一晚 incubation したものを 1 次抗体として蛍光抗体間接法を行った。反応が完全に吸収された。

Immunofluorescence of COS7 cells transfected with human Dsc2

- a: patient (Case2) serum
- b: normal serum
- c: patient serum (no transfection)

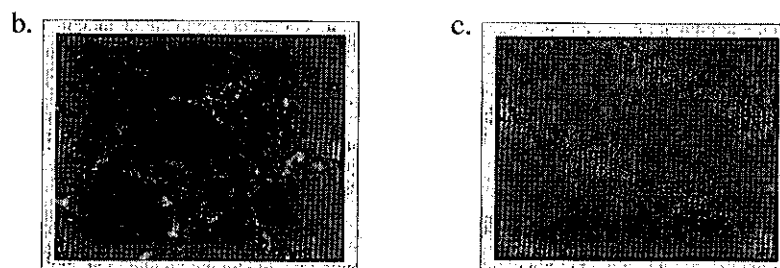


図4 COS7 細胞 cDNA トランスフェクション法の結果 (ELISA で IgA 抗 Dsc2 抗体陽性を示した症例)

- a) 全長ヒト Dsc2 cDNA をトランスフェクトした COS7 細胞と患者血清を反応させ、陽性反応を示した。
- b) 全長ヒト Dsc2 cDNA をトランスフェクトした COS7 細胞と正常人血清を反応させ、陰性であった。
- c) 何もトランスフェクトしていない COS7 細胞と患者血清を反応させ、陰性であった。

Immunofluorescence of COS7 cells transfected with human Dsc3

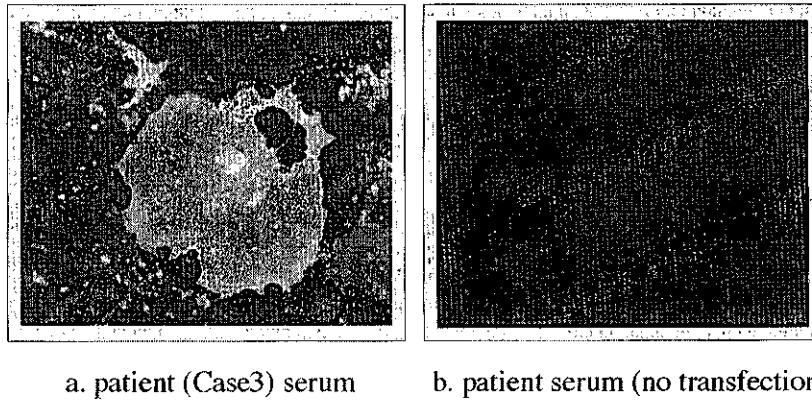


図5 COS7細胞 cDNA トランスフェクション法の結果
(ELISA で IgA 抗 Dsc3 抗体陽性を示した症例)

- a) 全長ヒト Dsc3 cDNA とトランスフェクトした COS7 細胞と患者血清を反応させ、陽性反応を示した。
- b) 何もトランスフェクトしていない COS7 細胞と患者血清を反応させ、陰性であった。

Immunofluorescence of COS7 cells transfected with human Dsc3

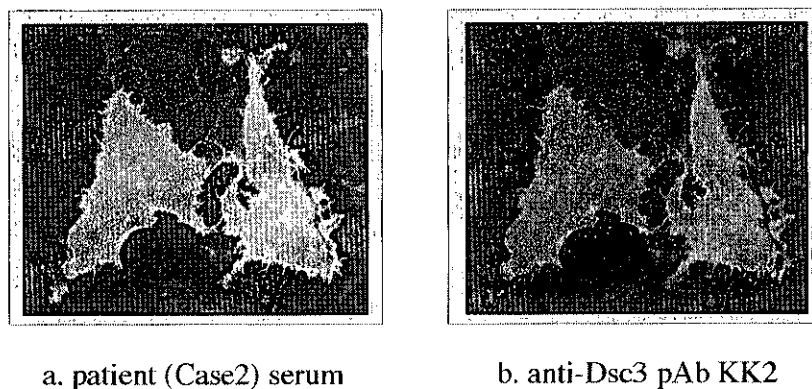


図6 COS7細胞 cDNA トランスフェクション法の結果
(ELISA で IgA 抗 Dsc3 抗体陽性を示した症例)

- 患者血清と Dsc3 に対するポリクローナル抗体である KK2 を用いて行った二重染色において共に同じ染色パターンを示した。(a,b)

5) 天疱瘡抗原三次元エピトープの解析

分担研究者：西 川 武 二（慶應大学医学部皮膚科）

共同研究者：天 谷 雅 行、関 口 麻衣子（慶應大学医学部皮膚科）

抄 録

天疱瘡抗原であるデスモグレイン (Dsg) はカドヘリンファミリーに属するカルシウム依存性の細胞間接着分子であり、落葉状天疱瘡 (PF) 抗原である Dsg1 と尋常性天疱瘡 (PV) 抗原である Dsg3 があるが、自己抗体はそれぞれの抗原を特異的に認識する。自己抗体がそれぞれの抗原を認識し水疱形成に至るためには、抗原の三次元エピトープが重要である。本研究では、Dsg1 および Dsg3 の三次元エピトープの分子上局在を検討する目的で、Dsg1 および Dsg3 の細胞外領域を様々なフラグメントとし、欠失領域に類似分子である Dsg3 または Dsg1 を融合させた 10 種類のスワッピング分子を作成し、これらに対する PF および PV 抗体の反応を Competition ELISA により検討した。Dsg1 は N 末アミノ酸 26-87、Dsg3 は N 末アミノ酸 25-88 に主要な三次元エピトープが存在することが判明した。天疱瘡において、カドヘリン分子の分子間結合に重要な接着面に対して抗体が産生していることが明らかにされた。

Abstract

Desmoglein (Dsg) is a cadherin-type adhesion molecule found in desmosomes. Dsg1 and Dsg3 are the target antigens in the autoimmune blistering diseases, pemphigus foliaceus (PF) and pemphigus vulgaris (PV), respectively. To map conformational epitopes of Dsg1 and Dsg3 in PF and PV, we generated Dsg1-and Dsg-3-domain-swapped molecules and pointmutated Dsg3 molecules with Dsg1-specific residues by baculovirus expression. The swapped domains were portions of the N-terminal extracellular domains of Dsg1 (1-496) and Dsg3 (1-566), which have similar structures but distinct epitopes. The binding of autoantibodies to the mutant molecules was assessed by competition enzyme-linked immunosorbent assays. Domain-swapped molecules containing the N-terminal 161 residues of Dsg1 and Dsg3 yielded greater than 50% competition in 30/43 (69.8%) PF sera and 31/40 (77.5%) PV sera, respectively. Within these regions, most of the epitopes were mapped to residues 26-87 of Dsg1 and 25-88 of Dsg3. Using the predicted three-dimensional structure of classic cadherins as a model, these findings suggest that the major autoimmune epitopes in both PF and PV are found in the N-terminal adhesive surfaces of Dsgs.

研 究 目 的

本研究の目的は、天疱瘡抗原 Dsg1 および Dsg3 の三次元エピトープの分子上局在を尋常性天疱瘡血清、落葉状天疱瘡血清を用いて検討する。

研 究 方 法

Dsg はカドヘリンファミリーに属するカルシウム依存性の細胞間接着分子であり、膜貫通型タンパクとして存在している。その細胞外領域はN末側よりカドヘリンリピートと呼ばれる細胞外ドメインが5つタンデムに並んだ構造をとっている(図1)^[1-2]。天疱瘡では、自己抗体がこれら標的抗原の細胞外領域をエピトープとして認識し、水疱形成が誘導されると考えられており、自己抗体がエピトープを認識するためには、その三次元構造が保存されていることが重要である。

すでに我々は、昆虫細胞を利用するバキュロウイルス発現系を用いて、三次元構造を持ったDsg1 および Dsg3 を作成している^[3-4]。両者の間ではアミノ酸配列の保存性が高く、非常に類似した分子構造をとっているにも関わらず、PF および PV の自己抗体は Dsg 1、Dsg3 それぞれに特異的な反応を示すことが解っている。そこで Dsg1 と Dsg3 の細胞外領域を様々な領域に入れ換えた10種類のスワッピング分子を作成した(図2 A, B)。こうして、全体としての立体構造を保つことで、Dsg1 または Dsg3 の一定領域における抗原特異性も保存されることが期待される^[5]。

研 究 結 果

Dsg1 および Dsg3 の細胞外領域をN末側1/3、2/3、C末側1/3、2/3に制限した分子(図2 A)に対する反応を、PF 患者血清43例を用いて検討した結果(図3)、吸収率50%異常を有意な値とした場合、Dsg1 のN末アミノ酸1-401の分子では43/43(100%)が有意な吸収率を示し、全体の平均吸収率は98.2%であった。さらにN末アミノ酸1-161の分子でも30/43(69.8%)が有意な吸収率を示し、平均吸収率は62.5%であった。一方、C末アミノ酸164-496および404-496の分子では、それぞれ2/43(4.7%)および0/43(0%)でほとんど有意な反応は示さなかった。またPV患者血清40例を用いて検討した結果、Dsg3 のN末アミノ酸1-403および1-161の分子では38/40(95%)および31/40(77.5%)が有意な吸収率を示し、平均吸収率はそれぞれ85.8%および67.4%であった。一方、C末アミノ酸163-566および405-566の分子では、それぞれ4/40(10%)および0/40(0%)でほとんど有意な反応は示されなかった。よって、主要な三次元エピトープはPF および PV のどちらにおいてもDsg1 および Dsg3 のN末アミノ酸1-161の領域に局在すると考えられた。

そこで次に、N末アミノ酸1-161で50%以上の有意な吸収率を示したPF および PV 血清について、Dsg1 および Dsg3 のN末アミノ酸1-161の領域をさらに細かい領域に限定したスワッピング分子を用いて、さらにcompetitionELISAを施行した。自己抗体吸収率は、N末アミノ酸161までの分子と反応させた時のOD値を吸収率100%として求めた。

PF 血清26例を用いて検討したところ(図4)、Dsg1 の1-24、1-64、1-87、26-161、63-161、89-161の分子でそれぞれ平均吸収率が14.9%、38.5%、41.0%、55.1%、39.3%、18.4%となり、1-24 および 89-161 の分子で有意な吸収率を示した症例はそれぞれ0/26(0%) および1/26(3.8%)とほとんど示されなかったのに比べ、1-64、1-87、26-161、63-161の分子ではそれぞれ6/26(23.1%)、10/26(38.5%)、13/26(50%)、9/26(34.6%)で有意な値が示された。このことからDsg1の主要な三次元エピトープはN末アミノ酸26-87の領域に局在していると考えられた。同様にPV血清30例を用いて検討したところ、やはりPFにおけるDsg1の結果とほぼ同様の成績が示され、PVにおけるDsg3の主要な三次元エピトープはN末アミノ酸25-88の

領域に局在すると考えられた。同様に PV 血清 30 例を用いて検討したところ、やはり PF における Dsg1 の結果とほぼ同様の成績が示され、PV における Dsg3 の主要な三次元エピトープは N 末アミノ酸 25-88 の領域に局在すると考えられた。

考 察

本研究結果から、PF の標的抗原である Dsg1 では N 末アミノ酸 26-87、PV の標的抗原である Dsg3 では 25-88 に主要な三次元エピトープと考えられた。

Dsg1 と Dsg3 のアミノ酸配列を比較すると、C 末側に比べ N 末側でより相同性が高い。興味深いことに、主要な三次元エピトープは、Dsg3 及び Dsg1 の分子間で非常に高い相同性を持っている領域に認められることが判明した。天疱瘡において自己免疫産生がなぜ、この領域に起こるのか現在のところは不明である。しかし、Dsg1 あるいは Dsg3 分子のみを特異的に排除したいと免疫系が考えた場合に、C 末の相同性の低い部位に抗体を産生するはずである。わざわざ N 末の相同性が高い領域に自己抗体が産生される理由があり、そこに、天疱瘡発症機序を解く鍵が隠されていることが想像される。

今後、この領域において Dsg3 のアイソタイプ特異的アミノ酸配列に Dsg1 特異的アミノ酸を導入した変異 Dsg3 タンパクを作成し、PF 血清の反応性を検討し、さらにエピトープと細かく同定する予定である。

結 論

本研究では、今回我々の作成したスワッピング分子が三次元エピトープマッピングに有効であることが示され、これにより Dsg1 および Dsg3 それぞれの主要な三次元エピトープの局在が明らかになった。天疱瘡抗原 Dsg の三次元エピトープの局在を特定することは、抗原特異的血漿交換療法などの新しい治療法の開発、自己免疫反応により誘導される天疱瘡の病態発現機序を解明する上においても重要であると考えられる。

参考文献

1. 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.
2. Amagai, M. 1995. Adhesion Molecules I: Keratinocyte-Keratinocyte Interactions, Cadherins and Pemphigus. *J Invest Dermatol* 104: 146.
3. 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.
4. Amagai, M., T.Hashimoto, K.J.Green, N.Shimizu, and T.Nishikawa. 1995. Antigen-specific immunoadsorption of pathogenic autoantibodies in pemphigus foliaceus. *J Invest Dermatol* 104: 895.
5. Futei, Y.,M. Amagai, Sekiguchi, K.Nishifuji, Y.Fujii, and T. Nishikawa. 2000. Conformational epitope mapping of desmoglein 3 using domain-swapped molecules in pemphigus vulgaris. *J Invest Dermatol* 115: 829.

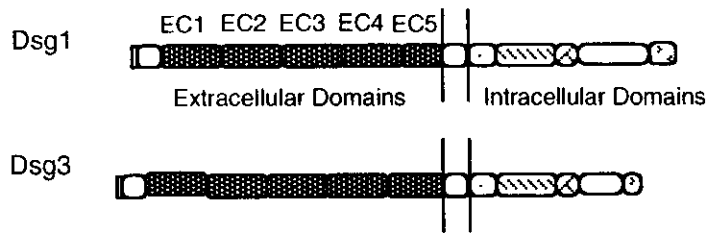


図1 天疱瘡抗原デスモグレイン

カドヘリンファミリーに属するカルシウム依存性の細胞間接着分子で、膜貫通型タンパクとして存在し、その細胞外領域はN末側よりカドヘリンリピートと呼ばれる細胞外ドメインが5つタンデムに並んだ構造をとる。

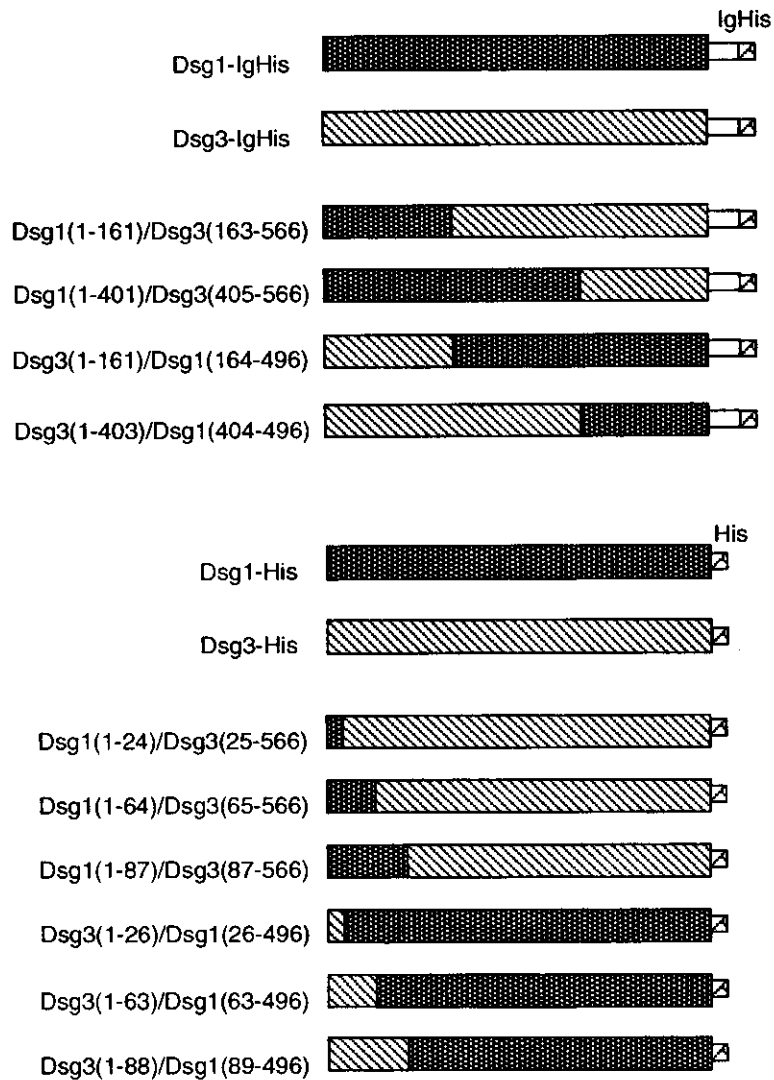


図2 スワッピング分子

全体として立体構造を保つことでDsg1またはDsg3の一定領域における抗原特異性も保存されるように、Dsg1とDsg3の細胞外領域を様々な領域で入れ換えた10種類のスワッピング分子を作成した。

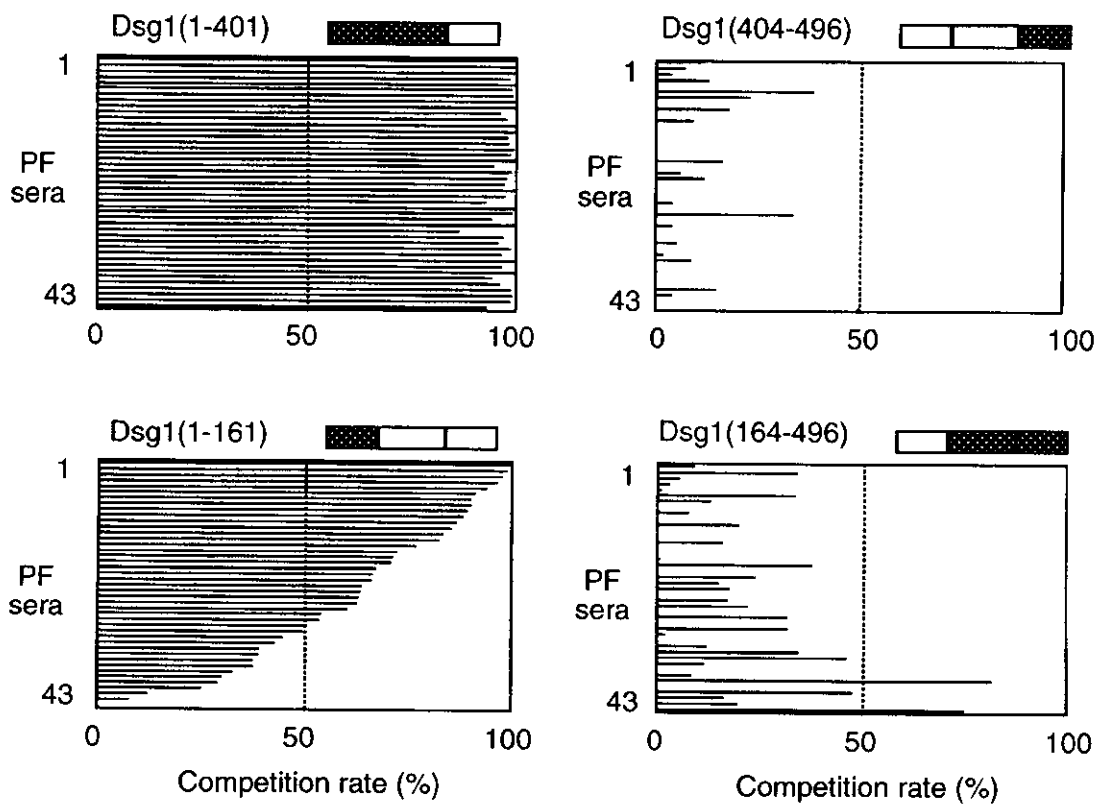


図3 PF血清の三次元エピトープ解析(1)
 主要な三次元エピトープはPFおよびPVのどちらにおいてもDsg1およびDsg3のN末アミノ酸1-161の領域に局在すると考えられた。

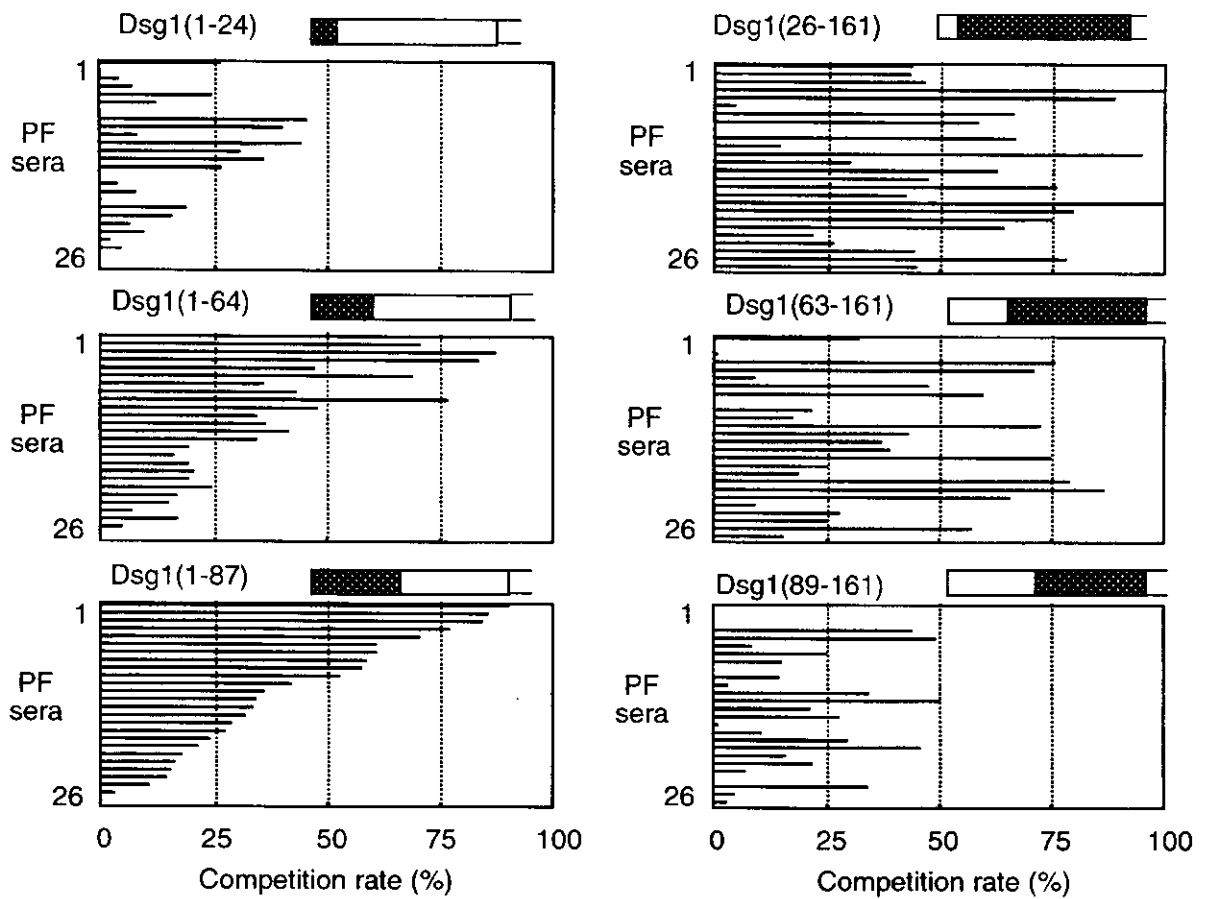


図4 PF血清の三次元エピトープ解析(2)
 PFの標的抗原であるDsg1ではN末アミノ酸26-87、PVの標的抗原であるDsg3では25-88に主要な三次元エピトープが存在すると考えられた

6) リコンビナントデスマグレイン 1,3 ELISA 値の高い患者における 臨床応用：血清試料の適正希釈倍率の検討

分担研究者：北 島 康 雄（岐阜大学医学部皮膚科）

共同研究者：辻 村 有 紀、青 山 裕 美、山 田 孝 宏
（岐阜大学医学部皮膚科）

要 約

天疱瘡患者のリコンビナントデスマグレイン1,3によるELISA検査において、高抗体価の症例は、インデックス値の推移が臨床経過を反映しない傾向がみられる。これは、天疱瘡診断に用いるELISAキットは定量性を前提としているが、高抗体価の場合、ELISAキットの定量範囲を超えて、飽和状態になってしまうためではないかと考えられる。定量性を検討するため、高抗体価血清の試料を逐次希釈して測定したところ、インデックス値が150より低い範囲では定量性が保持されていた。そこで、当科に血清診断依頼のあった尋常性天疱瘡血清の9割はインデックス値が150を超えていたことをふまえ、定量性の検討から得られた結果をもとに、高抗体価天疱瘡のELISA法による、より正確な病勢の評価方法を考案した。その結果、希釈倍率を16倍または32倍にすればインデックス値はほとんどの症例において臨床症状の経過を極めて良く反映した。従って、より正確な抗デスマグレイン3（Dsg3）抗体価を求められるこの方法が症例の治療経過を追うには適当であると結論することができる。

はじめに

天疱瘡は口腔粘膜および全身の皮膚に水疱とびらんを生ずる自己免疫性水疱症である。病理組織学的に表皮顆粒細胞層付近の細胞間接着が障害される落葉状天疱瘡、基底細胞直上から中層の有棘細胞間接着が障害される尋常性天疱瘡があり、それぞれの自己抗体の標的抗原としてデスマゾーム構成分子のデスマグレイン（Dsg1：分子量160kDa）、Dsg3（分子量130kDa）が同定されている（総説）¹⁻³⁾。

天疱瘡抗体が水疱形成の原因であることは、症状が抗体価とほぼ比例すること、抗体を新生マウスに注入すると12-24時間後に水疱形成を認めることなどから推定されている。さらに、AmagaiらはDsg3の細胞外ドメインに対する特異的抗体を新生マウスの皮下に注入すると18時間後に表皮細胞間の接着障害が起きることからこの部位が病因抗原であること⁴⁾、また患者抗体を、バキュロウイルスで産生した立体構造を保持したDsg3の細胞外ドメインで吸着するとその水疱形成能が消失することから抗体の抗原認識にはDsg3の細胞外ドメインの立体構造が重要であることを報告している⁵⁾。

これらを考慮して、天谷らはバキュロウイルスで産生した立体構造を保持したDsg1およびDsg3の細胞外ドメインのリコンビナントタンパクを基質にしてELISAを開発した^{6,7)}。この方法を用いて臨床研究を行う過程で、高抗体価の場合、ELISAキットの定量範囲を超えて、飽和状態になってしまう症例が多いことに気づいた。そこで、本研究では、定量性を検討するため、高抗体価血清の試料を逐次希釈して測定した。その結果、インデックス値が150を越える症例では、希釈倍率を16倍または32倍にすればインデックス値はほとんどの症例において臨床症状の

経過を極めて良く反映することが明らかにされた。

材 料

血 清

定量性の検討には、当科に血清診断依頼のあった尋常性天疱瘡血清 10 例と落葉状天疱瘡 12 例を用いた（表 1）。各血清を ELISA キットのプロトコールに従って、200 倍に希釈し、さらに 2、4、8、16、32 倍に希釈した血清を試料とした。

希釈法の検討では、定量性の検討に用いた血清のうち、200 倍に希釈したときのインデックス値が 150 以上で、200 倍希釈からさらに 16 倍に希釈したときのインデックス値が 150 より小さく、かつ、経時的に保存してある症例 3 例を用いた。各血清を原法通りの 200 倍に希釈した血清と、さらに 16 倍に希釈した血清を試料とした。

方 法

Dsg3 ELISA kit および Dsg1 kit (MBL, Nagoya, Japan) を用いた^{6, 7)}。

バキュロウイルスによって生産された組み換え Dsg3 を固相化したマイクロカップに目的に応じて反应用緩衝液で希釈した血清を添加し、室温で一時間静置反応させた。洗浄液 (0.13% Tween 20 を含むリン酸緩衝液 pH7.3) で洗浄後、二次抗体 (Peroxidase conjugated anti-human IgG monoclonal antibody) を添加し、室温で一時間静置反応させた。再び、洗浄後、酵素基質液 (A 液 (Tetramethylbenzidine) と B 液 (Hydrogen Peroxide) を等量ずつ混合) を添加し、室温で 30 分静置反応させた。反応停止液 (2N Sulfuric Acid) を添加後、直ちに自動分光光度計 (Multisca MS) を用い、波長 450nm (副波長 620nm) で吸光度を測定した。測定値を基に、次式よりインデックス値を算出した。

$$\text{Index Value} = \frac{(A_{450} \text{ Sample} - A_{450} \text{ Negative Control})}{(A_{450} \text{ Positive Control} - A_{450} \text{ Negative Control})} \times 100$$

結 果 と 考 察

1. Dsg3・ELISA インデックス値の定量性の検討

インデックス値が一番高いときでも約 100 の症例では、インデックス値の推移は臨床症状の経過と一致したが、インデックス値が 200 を超えるような高値の場合、臨床症状の経過にかかわらず、インデックス値は高値のまま推移した。そこで Dsg3・ELISA インデックス値の定量性の検討を行った。

その結果、希釈率 1 (プロトコールに従い、血清を 200 倍希釈した試料) のインデックス値が 150 を下回る例では直線が得られ定量性が保たれていたが、200 以上の試料は希釈率の増加と共に飽和状態に陥っていた。すなわち、個々に詳しく検討したところ、インデックス値が 150 から 200 の間で定量性が失われはじめ、200 以上で飽和することが分かった (図 1)。

2. 患者への希釈法の応用

希釈率 1 のインデックス値が 150 以上の症例 9 例の血清を 16 倍に希釈して ELISA インデックス値を求めたところ、9 中、8 例は 16 倍に希釈するとインデックス値が 150 を下回った。このことから、実用上のインデックス値について、

- 1) インデックス値<150 のときは、真のインデックス値と一致する。
 - 2) インデックス値 \geq 150 のときは、真のインデックス値と解離する。
 - 3) 16 倍希釈のインデックス値<150 のとき、事実上のインデックス値 \approx 16 倍希釈のインデックス値 \times 16、
 - 4) 16 倍希釈のインデックス値 \geq 150 のとき、事実上のインデックス値 \approx 32 倍希釈のインデックス値 \times 32 として、計算すると実際の血清中のタイターを反映すると推定された。
- そこで、尋常背天疱瘡の患者 2 例について 16 倍に希釈して測定して得たインデックス値を求めたところ、プロトコール通りの標準法の測定値ではとらえられなかった値の変化が明瞭に捕らえられた (図 2、3)。また、このインデックス値の推移は臨床症状の経過と一致した。

3. Dsg1・ELISA インデックス値の定量性の検討

Dsg1 についても、希釈率とインデックス値の定量性、および高抗体価血清の希釈法による検討を試みたところ、Dsg3 とほぼ同じ傾向を示した。ただし、Dsg1 の場合、定量性が保たれるインデックス値の上限が Dsg3 よりも幾分低かった。

お わ り に

以上より、抗体価が 150 を越えるような場合、希釈して測定すると、値の変化がはっきりし、インデックス値の推移が臨床症状の経過とも一致することが分かった。

そこで、多数の症例について検討したところ、内服ステロイドで治療すると臨床症状がよくなってもインデックス値が高値であることには変わりがない症例があることが分かった。これについては、非病原性の抗体がある、という考え方と病原性の抗体があっても、ステロイドによる表皮細胞側の反応性低下のため、水疱形成が抑制されているという二つの考え方ができる⁸⁾。

今後はこれらの解明が必要と思われる。

参考文献

- 1) Kitajima, Y., Aoyama, Y., Seishima, M.: Transmembrane signaling for adhesive regulation of desmosomes and hemidesmosomes, and for cell-cell detachment induced by pemphigus IgG in cultured keratinocytes: Involvement of protein kinase C. JID Symposium Proceedings, 4:137, 1999
- 2) Kitajima, Y.: Adhesion molecules in the pathophysiology of bullous disease. Eur J Dermatol, 6:399, 1996.
- 3) 北島康雄: 細胞骨格と細胞接着の構造・機能とその異常としての皮膚疾患. 分子医科学シリーズ 2、細胞: 構造と機能、月田承一郎編、メディカルビュー社、東京、1995、p.116.
- 4) Amagai, M., Karpati, S., Prussick, R., et al.: Autoantibodies against the aminoterminal cadherin-like binding domain of pemphigus vulgaris antigen are pathogenic J Clin Invest, 90:919, 1992.
- 5) Amagai, M., Hashimoto, T., Shimizu, N., et al.: Absorption of pathogenic autoantibodies by the extracellular domain of pemphigus vulgaris antigen (Dsg3) produced by the baculovirus. J Clin Invest., 94:59, 1994.
- 6) Ishii, K., Amagai, M., Hall, R. P., et al.: Characterization of autoantibodies in pemphigus using antigen-specific ELISAs with baculovirus expressed recombinant desmogleins. J Immunol, 159: 2010, 1997

- 7) Amagai, M., Komai, A., Hashimoto, T., Shirakata, Y., Hashimoto, K., Yamada, T., Kitajima, Y., Ohya, K., Iwanami, H., Nishikawa, T.: Usefulness of enzyme-linked immunosorbent assay using recombinant desmogleins 1 and 3 for serodiagnosis of pemphigus. *Br J Dermatol*, 140:351, 1999
- 8) Aoyama, Y., Tsujimura, Y., Funabashi, M., Sato, M., Kamiya, H., Kitajima, Y.: An experience for ELISA for desmoglein 1, suggesting a possible diagnostic help to determine the initial therapy for pemphigus foliaceus. *Eur J Dermatol*, 10:18, 2000

Clinical Application of ELISA, Using Recombinant Desmoglein 1 and 3: Dilution of Samples for Quantitative Analysis of High Titer Sera

Yasuo Kitajima, Yuki Tsujimura, Yumi Aoyama, Takahiro Yamada,

Department of Dermatology, Gifu University School of Medicine

Pemphigus is an autoimmune skin disease, which is characterized by intra-epidermal blisterings due to autoantibodies against desmosomal cadherins, and divided into two major subgroups i.e., pemphigus vulgaris (PV) and pemphigus foliaceus (PF). The autoantibodies of the former are against desmoglein 3 (Dsg3) and those of the latter are against desmoglein (Dsg1). Although it has been suggested that the activity of the disease is rather correlated with the titer of the antibodies, there are still no precise studies on the relationships between the disease activity and the titers of autoantibodies determined by Dsg1- and Dsg3-ELISA. Previously, we have noticed that ELISA scores were not correlated with the disease severity, when they are higher than around 200 ELISA score. We suspect whether the higher ELISA scores over 200 of PV-IgG and PF-IgG may not reflect the real titers of autoantibodies due to saturation. Therefore, we determined the upper limit of ELISA scores and the dilution rate to adjust the high score samples to standard. We diluted ten PV and 11 PF sample sera from 1 to 32 times and subjected to the standard ELISA analysis. The samples showing over 200 ELISA score did not keep the linearity, whereas those under 150 ELISA score did. When diluted 16 times, ELISA scores of all samples were under 150 ELISA score, if a few were close to 200 ELISA score. The 16-times dilution method was applied to two cases of PV with extremely higher ELISA scores and the results showed the ELISA scores obtained by dilution were well correlated with their clinical courses. These results suggest that the upper limits of Dsg1-, Dsg3-ELISA scores are 150 and 16-times dilution of sample for standard ELISA method is recommended.

表 1 使用した血清一覧

症例	Index Dsg1	Index Dsg3
尋常性天疱瘡		
1	ND	336
2	-1	325
3	15	302
4	ND	293
5	ND	250
6	51	238
7	138	223
8	ND	191
9	ND	181
10	70	96
落葉状天疱瘡		
1	248	3
2	213	2
3	206	1
4	185	8
7	172	ND
5	157	2
6	135	3
8	133	ND
10	105	5
9	94	1
12	69	8
11	66	6

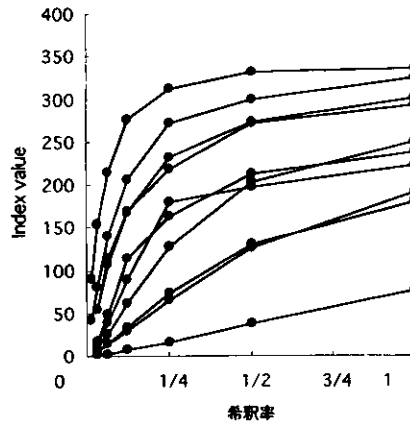


図 1

抗 Dsg3 抗体値の Dsg3・ELISA 値と血清試料の希釈率の関係。10 例中 3 例は希釈に比例してインデックス値も減少するが、希釈前の値が 200 以上の試料では飽和状態にある。希釈比とインデックス値の減少が比例するには 16 倍以上の希釈率が必要である。希釈率 1 は血清の 200 倍希釈試料（標準法）。

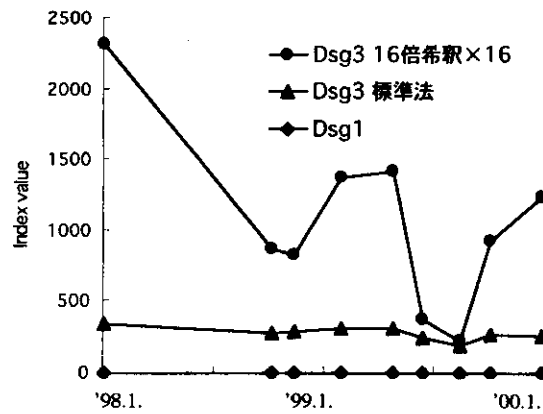


図 2

血清標準法試料と 16 倍希釈血清試料の Dsg3・ELISA 値。標準法では飽和して観察できない治療経過による抗 Dsg3 抗体価の減少が 16 倍希釈することによって観察されるようになった。