

されていることと関連している可能性がある。

今回、4種類の代表的な乾癬の治療法による治療後の組織像を観察した。その結果、それぞれの組織像が異なっていることが明らかになった。これは、それぞれの作用機序の違いを反映しているものと考えられる。今回の結果は、それぞれの小数例についての観察にもとづいている。今後、治療期間や投与量、および、ステロイドやVD₃では用いる薬剤の種類などを変え、症例数を増してさらに検索する必要があるものとする。

参考文献

- 1) 中山樹一郎：尋常性乾癬の治療～外用ステロイドホルモン治療、MB Derma 2:39-44、1997.
- 2) Castelijns FA, Gerritsen MJ, van Vlijmen-Willems, IM, van Erp PJ, van de Kerkhof PC: Proliferation is the main epidermal target in the treatment of psoriatic plaques with once daily application of tacalcitol ointment. Acta Derm Venereol 79:111-114, 1999.
- 3) Kondo S, Hozumi Y, Mitsuhashi Y: Comparative inhibitory effects of vitamin D₃ and an analogue on normal and psoriatic epidermis in organ culture. Arch Dermatol Res, 292:550-555, 2000.
- 4) 中川秀巳：尋常性乾癬の治療～シクロスポリン療法、MB Derma 2:45-52, 1997.
- 5) Lebwohl M, Ali S: Treatment of PUVA-and retinoid-PUVA-resistant severe psoriasis with systemic cyclosporin A. J Dermatol 17:482-488, 1999.

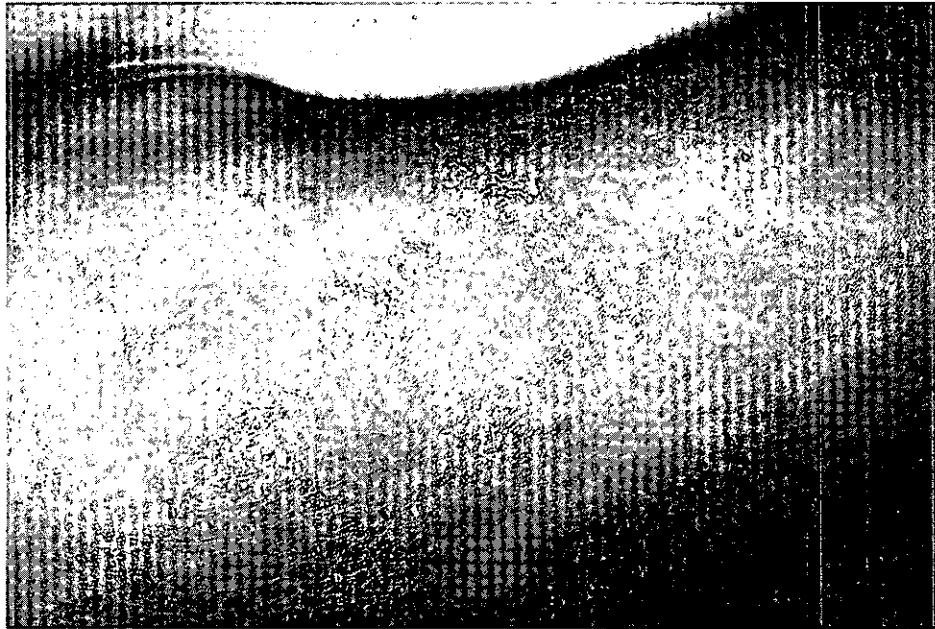


図1

副腎皮質ステロイドホルモン（ステロイド）と活性型ビタミンD₃(VD₃)外用前の臨床所見。右上腕。乾癬局面の近位側にステロイドを、遠位側にVD₃を外用。

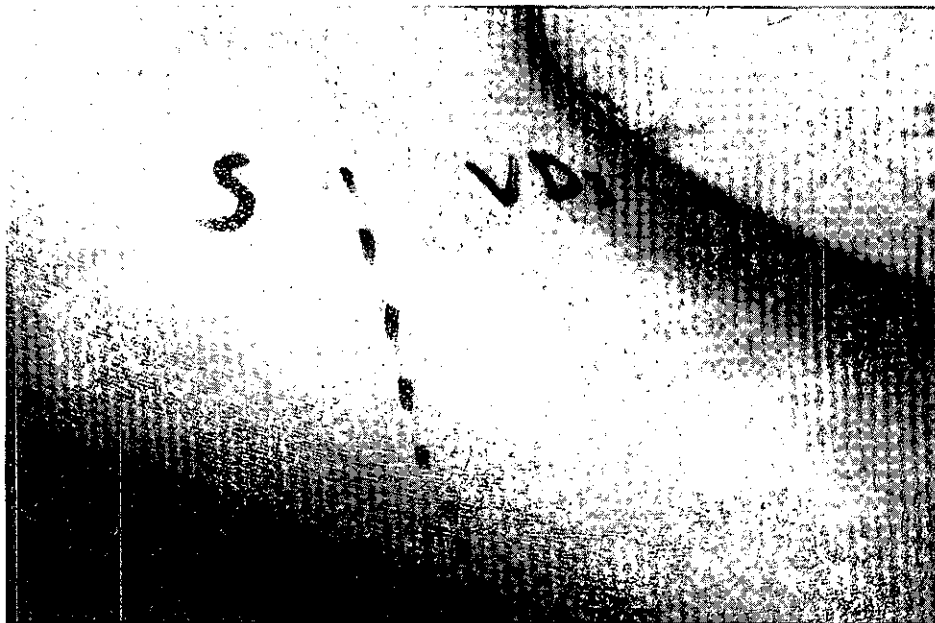


図2

ステロイドとVD₃の外用後の臨床所見。図1と同じ部位の2週間後の所見。Sの部位にステロイド、VD₃の部位にVD₃を外用。ともに紅斑が消褪し、鱗屑も消失している。



図3

治療前の組織像。図1の部位から採取。不全角化、顆粒層の消失、棍棒状の表皮突起延長。著明な炎症性細胞浸潤を認める。HE染色。80x

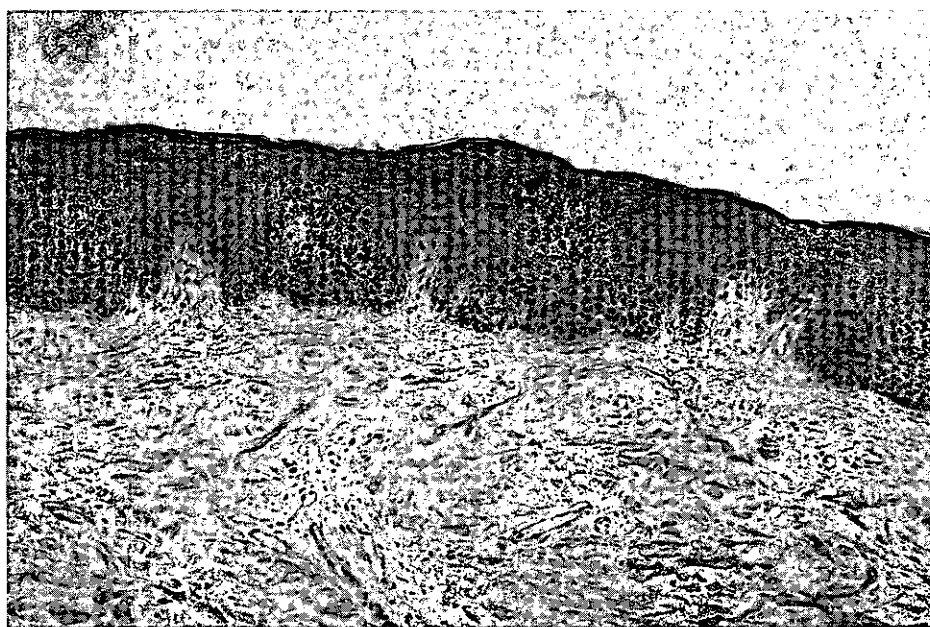


図4

ステロイド外用2週間後の組織像。図3に比べ、過角化の改善、顆粒層の出現、炎症細胞の消失などが認められる。HE染色。80x

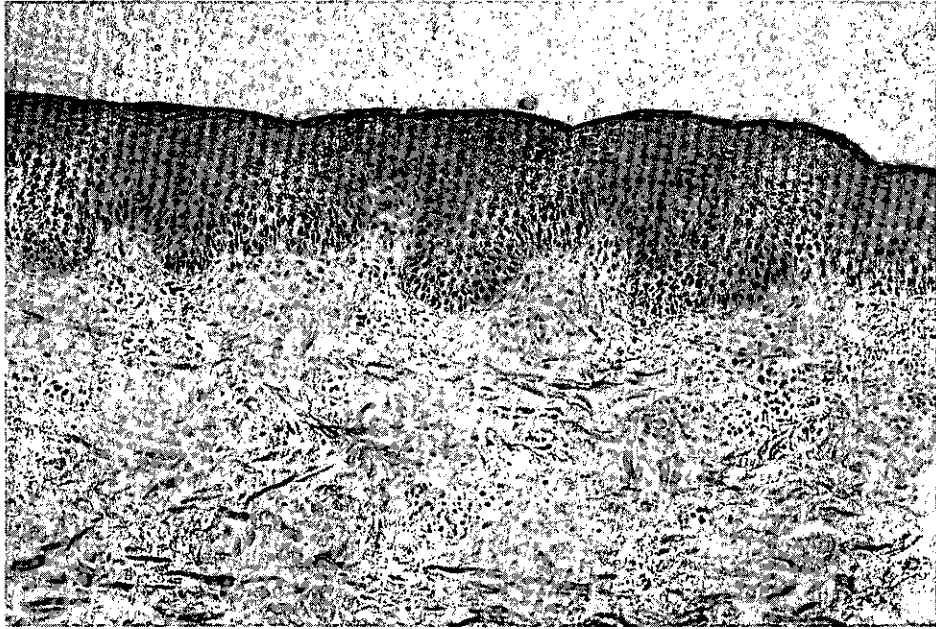


図 5

VD, 外用 2 週間後の組織像。図 4 に比べ、不規則な表皮肥厚を認め、炎症細胞浸潤がまだ残存しているが、過角化の改善や顆粒層の出現はほぼ同様である。HE 染色。80x

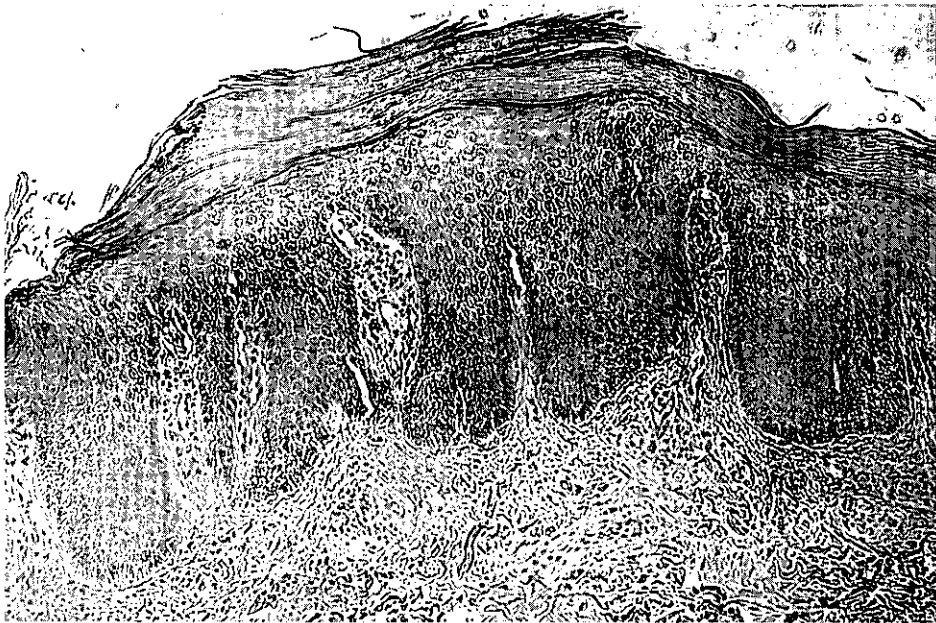


図 6

シクロスポリン内服前の組織像。典型的な尋常性乾癬の組織所見。HE 染色。68x

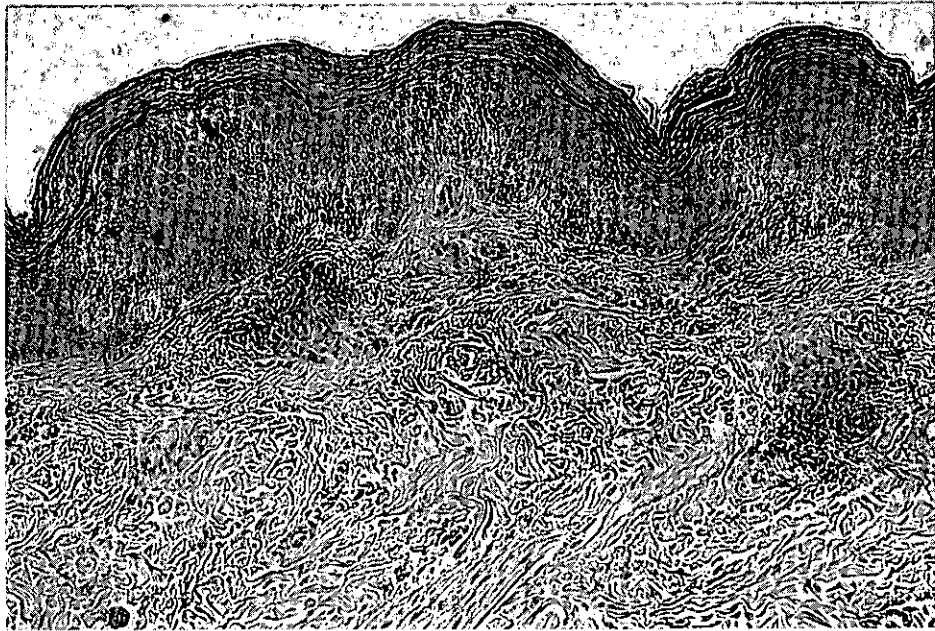


図7

シクロスポリン内服1カ月後の組織像。図6に比べ、表皮突起の延長が改善し、炎症性細胞浸潤が消褪している。不全角化は改善しているが、過角化は残存し、顆粒層の出現もほとんどみられない。HE染色。68x

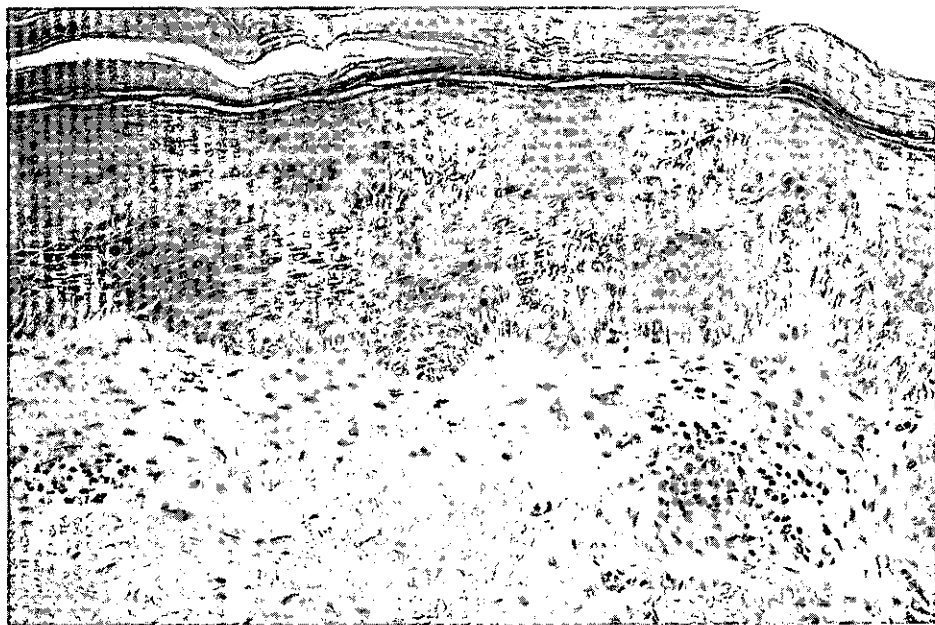


図8

エトレチネート内服中の組織像。表皮は扁平化している。角層の肥厚は残存し、一部に不全角化もみられる。顆粒層から角層にかけて周期的な剥離傾向を認める。HE染色。120x

IV. 天 疱 瘡

1) 尋常性天疱瘡病変部のコンピュータを用いた描出法

分担研究者：西 川 武 二 (慶應大学皮膚科)

共同研究者：田 中 勝、小 林 誠一郎 (慶應大学皮膚科)

要 約

現在、天疱瘡の病勢、治療効果判定は他の多くの皮膚疾患と同様に可成り主観的に評価されている。しかし、画像の病変部面積の算出を行えば、客観化は可能と考えられる。今回は、赤色系の病変部の描出についての我々の試みを報告する。描出における問題点は、①画像中の陰影②多彩な病変③基準色なしおよび④病変部以外のオブジェクトの存在、である。各々以下の如く対処した。①CIE L*a*b*表色系を利用。②病勢の激しい時、最も多い赤色系の皮疹を描出。③皮疹色と周囲皮膚色の相対的な差を利用。④背部の写真のみ対象。色差 (ΔE) は、国際標準化機構により定められ、肉眼的認識度が判明している。色差 6.5 以下は、肉眼的に同一色と認識されるため、色差 7 以上で病変の境界が認識できる。色差 13 以上では強い紅斑とびらんが描出される。赤色系以外の色素沈着部は、描出されず、陰影部の病変も描出可能であった。躯幹辺縁は境界線が描出され、病変部描出が不正確になる傾向があった。

は じ め に

尋常性天疱瘡 は、皮膚ならびに粘膜の水疱・びらんを主徴とする自己免疫性水疱症であり、標的抗原であるデスマグレイン (Dsg) 3 に対する自己抗体が存在する。より鋭敏な抗体検査法として ELISA 法が確立され、抗体価における客観的評価は可能となっている。しかし臨床として実際に認められる病変については未だ主観的評価しかないのが現状である。そこでコンピュータを利用することにより、臨床写真より病変部を算出し、臨床においても客観的評価が可能になると考えられる。すでに、撮影された写真を用いて様々な病変のうち、活動性のあると思われる赤色系の病変部のみに絞り、描出を試みた。

方 法

1) CIE L*a*b*表色系 (図1)

臨床写真は、カメラ、日付、撮影者、その時の光源など一様ではなく、写真にも基準となる情報は含まれていない。そのため、デバイスに左右されず、色と色の差を数値として表される表色系である CIE L*a*b*表色系を利用する。CIE とは国際照明委員会であり、CIE は 1975 年に L*a*b*表色系を推奨した。L は明度指数、a*、b* は色度指数を表す。この表色系では、色と色の差は距離の値として以下の式の如く表される。 ΔE (色差) = $[(\Delta L)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2]^{1/2}$

顔面は、目や鼻、口といった病変以外のパーツが、病変描出時に誤って入ってきてしまうため、病変部のみが得られる背部の臨床写真にしばった。写真は、POLASCAN35 にて 350 dpi 画像で取り込む。さらに、Photoshop® にて RGB モードから L*a*b* に変換する。赤色系の情報は a* 成分に含まれているため、L、a、b のうち a 成分のみを使用する。陰影の情報はほぼ L 成分に残

り、以後は描出法に陰影により左右されることはない。

2) ガウスフィルター (図2)

a成分のみの画像を、グレースケールモードになおし、Image-Pro[®]Plus (画像解析ソフト)により、ガウスフィルター処理を行う。ガウスフィルター処理により原画像より下レベルに起伏の少なくなった滑らかな局面①ができる。原画像の色情報を反転しそれをガウスフィルター処理した後さらに反転すると、原画像より上レベルにやはり滑らかな局面②ができる。①と②を平均することで、原画像にぎりぎりに接した滑らかな画像③ができる。原画像から③を減算することで、周囲から突出した部位のみが得られる④。これが病変部である。

3) 肉眼的色差における認識度

カラー印刷における精度に関して ISO (国際標準化機構) により ΔE は以下の様に規定されている (表)。 ΔE : 1 以下; 人間の目では見分けることができない色差、1.6~3.2; ぴったり付け合わせない限りはほとんど色差がわからない、3.3~6.5; 感覚的には同じ色として判断される色差、6.5~13; 色差は認識できるが同じ系列の色として判断される色差、13~25; 別系統の色と認識される色差。

つまり、病変部と肉眼で識別できるのは少なくとも色差 6.5 以上であり、はっきりとした境界が認識できるのは色差 13 以上である。 ΔE において、 $L=0$ 、 $b=0$ のため、 a の値が色差となる。④において色差を 13 以上で 2 値化すれば病変部が描出される。

結 果

1) 色差 7 以上

病変部以外に赤みのある部位も描出される。

2) 色差 10 以外

淡い紅斑も病変部として描出している。

3) 色差 13 以上

赤色の強い病変部のみ描出される。

1) ~ 3) まで病変部以外に躯幹の辺縁部も誤った描出が時々みられる。しかし、痂皮や色素沈着などではなく赤色系の病変部のみをより肉眼的判断に近く描出できる。

考 案

条件の違う写真を比較するため、同じ 2 値化の条件では病変の描出は不可能であるが、CIE $L^*a^*b^*$ 表色系の色差を使うことで、病変部を描出できた。ガウスフィルター以外に、より原画像にぎりぎりに接する滑らかな局面を作れるならば、さらに病変部描出は精度を増すことができる。今後の課題は、面積算出についてと、背部以外の顔や粘膜部など病変部描出、赤色系病変以外の描出についてである。今後は、写真内に基準となる情報をいれようとし、定量化すること、時系列での病変面積の推移と ELISA との比較を検討している。まだ、手作業の処理が多いが、いずれ自動計算化すれば、診療時に簡便に使えるようになると考える。

参考文献

1. 笹井 亨：より深く理解するためのカラーマネージメント。カラーマネージメント；162-163, IDG ジャパン、1998
2. 財団法人日本色彩研究所 編：色彩科学入門、日本色研事業、2000
3. 白井志郎 他：機器を用いた皮膚色の定量に関する種々の問題点、日皮会誌 105、43-49、1995
4. 滝脇弘嗣：パーソナルコンピューターを用いた皮膚色シミュレーターの開発と皮膚病変解析への応用、臨皮 51、593-596、1997
5. 滝脇弘嗣：皮膚の色を測る、西日皮膚 55、415-419、1993

A method of the extraction of skin lesion for the image analysis of pemphigus vulgaris

Takeji Nishikawa (Keio University School of Medicine)

Summary

The assessment of disease severity in bullous disorders has been performed usually with subjective scoring methods. The purpose of the present study is to evaluate the disease activity in patients with pemphigus vulgaris by use of a computer-assisted method for measurement of the involved area. Patients with pemphigus vulgaris have various types of skin lesions including bulla, crust, erosion and pigmentation. Moreover, because of shadow and various colors, it is not easy to extract lesions with a simple method. We have tried to extract skin lesions using CIE $L^*a^*b^*$ color measurement and Gauss filter with an image analysis program of "Image-PRO plus". Color slides from patients with pemphigus vulgaris at several different times were scanned and digitized using a film scanner. The area of involvement was then extracted using $L^*a^*b^*$ color measurement method. Gauss filter was used to eliminate noise information on the digital images. The extraction of erythema and erosion was quite efficiently completed and seemed to depict active areas of involvement. This method would enable us to assess the disease severity of skin lesions accurately and objectively.

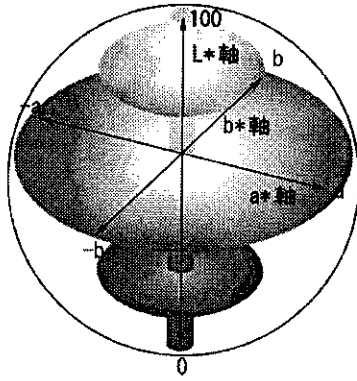


図1 CIE L*a*b*表色系モデル

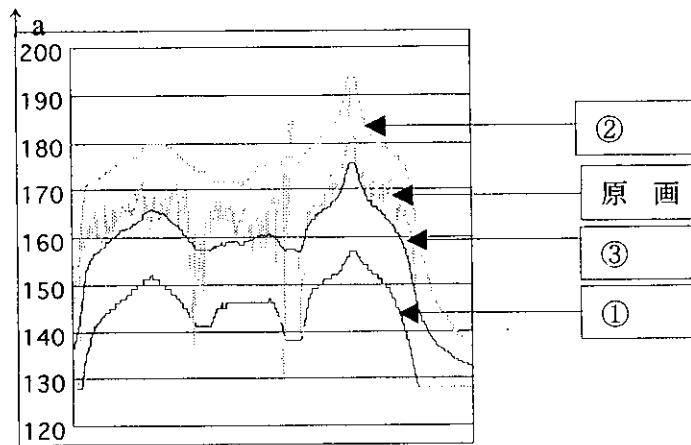


図2 ガウスフィルター処理中の断面図

表 肉眼的色差における認識度

ΔE	認識度
0~1以下	見分けられない
1.6~3.2	同じ色
3.3~6.5	感覚的に同じ色
6.5~13	同系統の色
13~25	別系列の色

2) 尋常性天疱瘡および腫瘍随伴性天疱瘡における デスモグレイン3 三次元エピトープの解析

分担研究者：西 川 武 二 (慶應大学皮膚科)

共同研究者：天 谷 雅 行、布 袋 祐 子 (慶應大学皮膚科)

要 約

腫瘍随伴性天疱瘡 (以下 PNP) 血清にはプラキンファミリーに属する様々な抗原蛋白に対する自己抗体のみならず、デスモグレイン(Dsg)3 に対する自己抗体も存在することが明らかにされ、PNP における水疱形成は、尋常性天疱瘡 (PV) と同様、抗 Dsg3 抗体が重要な役割を担っていることが考えられる。本研究では PNP における Dsg3 の三次元エピトープの解析と IgG サブクラスの分布を検討し、PV の結果と比較検討した。エピトープの解析は、Dsg3 と Dsg1 間でのスワッピング分子 (Dsg3¹⁻⁴⁰³/Dsg1、Dsg3¹⁶³⁻⁵⁶⁶/Dsg1、Dsg3⁴⁰⁵⁻⁵⁶⁶/Dsg1) を competitor とし、Dsg3 細胞外全領域を抗原とした競合的 ELISA を施工した。50%以上の競合を優位とし検討を行ったところ、PV のエピトープはN末の領域に多く認められたが、PNP においては分子全体にエピトープが分布している傾向が認められた。さらに PNP の Dsg3 に対する IgG サブクラスの分布を検討したところ、PV においては IgG4 優位であったが、PNP においては IgG1、IgG2 が優位であることが確認された。PNP においては様々な分子に自己抗体を有するのみならず、Dsg3 分子内においても分子全体にエピトープが認められ、IgG サブクラスの分布も異なることから、自己抗体産生機序が PV と異なることが示唆された。

は じ め に

腫瘍随伴性天疱瘡 (以下 PNP) は重篤な粘膜病変と多彩な皮膚病変を呈し、主として血液系悪性腫瘍を伴う自己免疫性水疱症で、尋常性天疱瘡 (PV) とは異なる確立された疾患である。PNP 血清にはプラキンファミリーに属する様々な抗原蛋白に対する自己抗体が認められ、さらに PV の標的抗原である Dsg3 に対する自己抗体も存在することが明らかにされたことから、PNP および PV との間で認められる共通した症状が説明可能となった。PNP における水疱形成では、PV と同様、抗 Dsg3 抗体が重要な役割を担っていることが考えられるも、両疾患において明らかな違いも認められることから、両疾患の pathogenesis に何らかの相違があることが推測される。今回我々は PNP および PV 両疾患において同じ Dsg3 に対する自己免疫反応の違いがあるかを検討するため、PNP における Dsg3 の三次元エピトープのマッピングと IgG サブクラスの分布の検討を行い、PV と比較した。

方 法

1) スワッピング分子の作成

Dsg3 と Dsg1 を用いて、種々のスワッピング分子をバキュロウイルス発現系を用いて作成した。これらの分子は Dsg3 細胞外領域を N 末 2/3、1/3、C 末 2/3、1/3 に切断し、欠失領域に、対応する Dsg1 を融合させて作成した。これらは Dsg3 細胞外領域の N 末アミノ酸 1-403、N 末アミノ酸 1-161、C 末アミノ酸 163-566、C 末アミノ酸 405-566 の領域を含み、それぞれ

Dsg3¹⁻⁴⁰³/Dsg1-IgHis、Dsg3¹⁻¹⁶¹/Dsg1-Dsg1-IgHis、Dsg1¹⁶³⁻⁵⁶⁶/Dsg1-IgHis、Dsg3⁴⁰⁵⁻⁵⁶⁶/Dsg1-IgHis と命名された。

2) Competition ELISA 法

作成した分子を competitor として用いて、PNP16 例と PV 血清 25 例の competition ELISA 法を施行した。作成したそれぞれの分子を含む培養上清 1 μl と反応させた後 (4 °C、0/N)、組換え Dsg3 固相化プレート (MBL) を用いた ELISA を行った。陰性コントロールとしてはいかなる Dsg3 も含まない昆虫細胞培養液、陽性コントロールとしては細胞外領域の全長を含む Dsg3-IgHis の培養液を用いた。陰性コントロールの OD 値を 0 %、陽性コントロールの OD 値を 100 % としたときの相対値をそれぞれの組換えタンパクの自己抗体吸収率とした。

Competition rate (%) = {1 - (ODcompetior - ODpositive) / (ODnegative - ODpositive)} * 100

3) IgG subclass の ELISA

ELISA は組換え天疱瘡抗原 Dsg1 および Dsg3 が固相化されたプレート (MBL 社) を用いて検討を行った。200 倍に希釈した血清を ELISA プレート上で 1 時間反応させ、洗浄後、1000 倍希釈のマウス抗ヒトモノクローナル抗体 IgG1-IgG4 と室温で 30 分反応、さらに 5000 培希釈のペルオキシダーゼ標識抗マウス IgG 抗体にて室温 30 分で反応させた。洗浄後、tetramethylbenzidine と hydrogen peroxide が等量に混合された溶液にて発色を行った。発色は 4NH₂O にて反応を停止した。いずれにおいて同じ血清希釈液をネガティブ陰性コントロールとして用いた。吸収率は ELISA reader を用いて吸光度 450nm にて測定した。OD 値 0.16 を cut-off 値にして PNP 患者血清 15 例 (当科の症例ならびに国内外から紹介された症例) の検討を行い、PV 血清 16 例 (当科の症例) の分布と比較した。

結 果

1) 三次元エピトープ

まず代表例の結果を示す (図 1)。PV においては Dsg3¹⁻⁴⁰³/Dsg1-IgHis で 96% とほとんどの抗体は吸収されており、Dsg3¹⁻¹⁶¹/Dsg1-IgHis でも 88% とかなりの抗体が吸収されていた。Dsg3¹⁶³⁻⁵⁶⁶/Dsg1-IgHis および Dsg3⁴⁰⁵⁻⁵⁶⁶/Dsg1-IgHis ではいずれにおいても 11% と 7% の吸収しか認められず、主要 epitope は Dsg3 N 末アミノ酸 1-161 に認められていることが分かった。一方、PNP においては Dsg3¹⁻⁴⁰³/Dsg1-IgHis では約 80% の抗体が吸収されている。一方で Dsg3¹⁻¹⁶¹/Dsg1-IgHis では 33% の抗体しか吸収されておらず、さらに Dsg3¹⁶³⁻⁵⁶⁶/Dsg1-IgHis および Dsg3⁴⁰⁵⁻⁵⁶⁶/Dsg1-IgHis において 23% と 32% の吸収を認め、エピトープは細胞外領域全体の広い範囲に存在していることが確認された。

同様の epitope mapping を PNP16 例と PV 血清 25 例を用いて検討し、それぞれのスワッピング分子の自己抗体吸収率をグラフにまとめた (図 2)。50% 以上の吸収率を優位とした場合、Dsg3¹⁻⁴⁰³/Dsg1-IgHis では 25 例中 24 例に、さらに Dsg3¹⁻¹⁶¹/Dsg1-IgHis においても 18 例に優位な吸収を認め、平均吸収率は 87.3% と 64% と高い吸収率は 87.3% と 64% と高い吸収率を示した。Dsg3¹⁶³⁻⁵⁶⁶/Dsg1-IgHis では数例のみに、Dsg3⁴⁰⁵⁻⁵⁶⁶/Dsg1-IgHis では 1 例のみに優位な吸収を認めただけであり、平均吸収率も低く、PV においては Dsg3 の主要エピトープは N 末 1-161 に多く存在する事が考えられた。

一方、PNP16 例においては、Dsg3¹⁻⁴⁰³/Dsg1-IgHis にて 16 例中 14 例に優位な吸収も認めるものの、Dsg3¹⁻¹⁶¹/Dsg1-IgHis にて 5 例のみ、また Dsg3¹⁶³⁻⁵⁶⁶/Dsg1-IgHis にて 4 例、Dsg3⁴⁰⁵⁻⁵⁶⁶

／Dsg1-IgHisにて5例と、どの領域においてもほぼ同数の症例数であった。また、平均吸収率も Dsg3¹⁻⁴⁰³／Dsg1-IgHis では71.1%であったが、Dsg3¹⁻¹⁶¹／Dsg3-IgHis では46.6%、Dsg3¹⁶³⁻⁵⁶⁶／Dsg1-IgHis では39.8%、Dsg3⁴⁰⁵⁻⁵⁶⁶／Dsg1-IgHis でも33.3%とやはりどの領域においても同程度の吸収率を認めた。

従って、PNPにおいてはN末の1-403に多くのエピトープが認められるほか、N末のみならず、C末にもエピトープが存在することが判明し、PVに比較し、Dsg3細胞外領域の比較的広範囲に分布することが分かった。

2) IgG サブクラスの分布 (図3)

PVにおいてはIgG4は100%の15例中全症例にて陽性を認め、またIgG1は80%の15例中12例にて陽性を認めた。一方IgG2においては15例中7例が陽性で、IgG3においては全症例が陰性で、これらの結果によりPVにおいてはIgG4が主要サブクラスであることが確認された。一方PNP血清17例においては、IgG1は88.2%である。15例が陽性、IgG2は64.7にあたる11例で陽性であった。一方IgG3およびIgG4はそれぞれ23.5%の4例と41.1%の7例に陽性であった。すなわち、PNPの血清中のIgGサブクラスはIgG1と、それについてIgG2が主要サブクラスであることが判明し、PVとは異なり、IgG4は比較的少ない頻度でしか認められず、またIgG3も若干ではあるも認められることが判明した。

考 案

PNPにおけるDsg3のエピトープマッピングにあたって、Dsg3及びDsg1との間で作成したスワッピング分子は有用であったといえる。PVにおいては主要エピトープはDsg3N末アミノ酸1-161に認められることが判明したが、PNPのエピトープはN末のみならずC末にも認められ、PVに比較し分子内の広範囲に分布することが判明した。これらのエピトープの違いの意義は未だ不明であるが、臨床にPNPはPVに比較し重症であることから、これら臨床の違いがエピトープの違いから来ている可能性も考えられた。

また、IgGサブクラスの分布はPVにおいてはIgG4が主要サブクラスであったが、PNPにおいては、IgG1についてIgG2が高頻度に認められ、とくにIgG4が多く認められることはなかった。以前Anhaltは間接蛍光抗体法を用い、PNPにおけるIgGサブクラスの分布の検討を行ったが、その結果、IgG1、IgG2、IgG4、IgG3の順に多く認められ、本研究における我々の結果と合致するものであった。天疱瘡におけるこれらIgGサブクラスの意義に関しては推測の域を出ないが、IgG1およびIgG3は補体結合性を有しており、一方、IgG4およびIgG2は補体結合性を欠くとされている。すなわち、IgG1優位であるPNPのpathogenesisにおいては補体系の関与が示唆され、そのためPVに比較し炎症が強く、重症である可能性が考えられた。

今回得られた結果より、PNPは様々な分子に自己抗体を有するのみならず分子内においても分子全体にエピトープがあることが確認された。また、PVと比較し、Dsg3におけるエピトープおよびIgGサブクラスの分布が異なることから、Dsg3に対する自己免疫反応が異なることが示唆された。

参考文献

1. Anhalt GJ, Kim S, Stanley JR, Korman NJ, Jabs DA, Kory M et al. Paraneoplastic pemphigus. An autoimmune mucocutaneous disease associated with neoplasia. *N Engl J Med* 1990; 323: 1729-1735.
2. Futei Y, Amagai M, Sekiguchi M, Nishifuji K, Fujii Y, Nishikawa T. Conformational epitope mapping of desmoglein 3 using domain-swapped molecules in pemphigus vulgaris. *J Invest Dermatol* 2000; 115: 829-834.
3. Futei Y, Amagai M, Ishii K, Kuroda-Kinoshita K, Ohya K, Nishikawa T. Predominant IgG4 subclass in autoantibodies of pemphigus vulgaris and foliaceus. *J Dermatol Sci* 2001; 26: 55-61.
4. Anhalt GJ. Paraneoplastic pemphigus: the role of tumors and drugs. *Br J Dermatol* 2001; 144: 1102-1104

Conformational Epitope Mapping and IgG Subclass Distribution of Desmoglein 3 in Paraneoplastic Pemphigus

Takeji Nishikawa (Keio University School of Medicine)

Summary

Pemphigus vulgaris (PV) shows autoimmune reaction against desmoglein (Dsg)3, while paraneoplastic pemphigus (PNP) shows autoimmune reaction against Dsg3 as well as multiple members of plakin family. Recently, it was demonstrated that in PV, dominant epitopes reside in amino-terminal adhesive regions of Dsg3 and that dominant IgG subclass autoantibodies against Dsg3 is IgG4. In this study, we attempted to map conformational epitopes and analyze IgG subclass distribution against Dsg3 in PNP.

Epitopes on Dsg3 for PNP were studied with competition ELISA using domain-swapped molecules between Dsg3 and Dsg1. IgG subclass distribution was also analyzed in PNP by Dsg3 ELISA. Epitopes in PNP were distributed more broadly throughout the extracellular domain of Dsg3, compared to those in PV. IgG subclass in PNP was IgG1 and IgG2 dominant. Autoimmune response against Dsg3 in PNP is more diversified than that in PV, suggesting different pathophysiological mechanism that triggers the production of antiDsg3 IgG between PNP and PV.

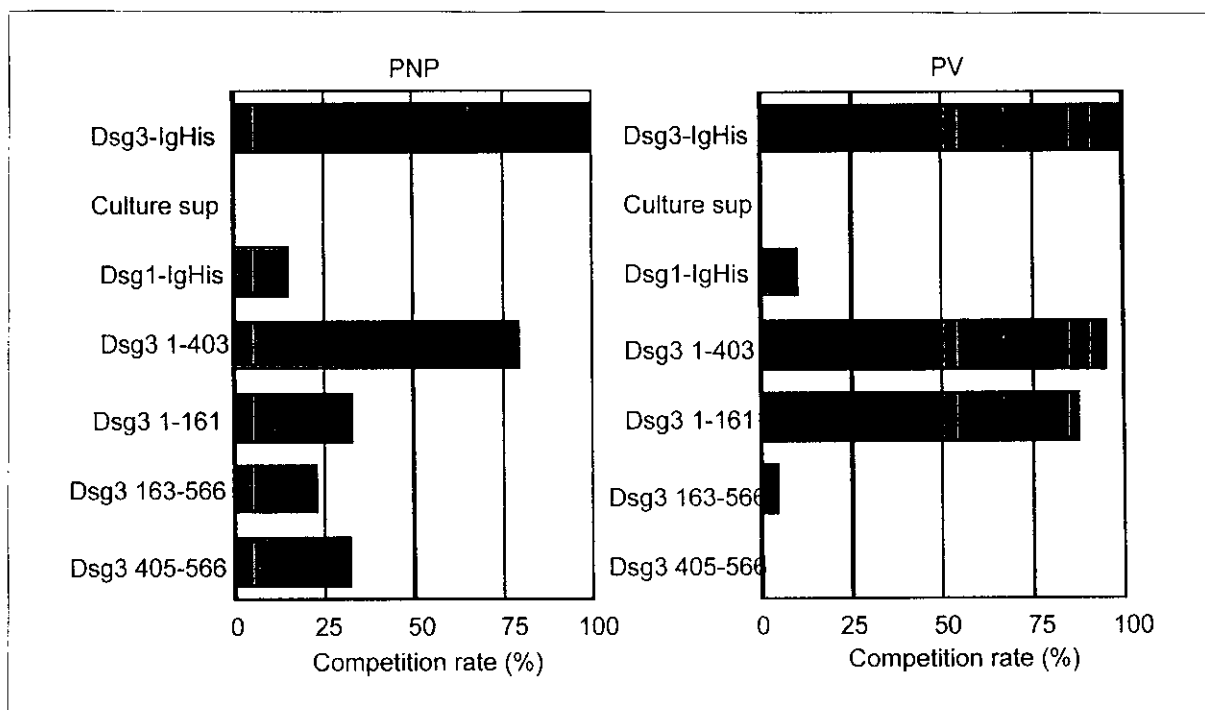


図 1

PV および PNP における吸収率の代表例：PV においては $Dsg3^{1-403}/Dsg1-IgHis$ および $Dsg3^{1-161}$ でかなりの抗体が吸収されていたが、 $Dsg3^{163-566}/Dsg1-IgHis$ および $Dsg3^{405-566}/Dsg1-IgHis$ ではいずれにおいてもごく僅かの吸収しか認められなかった。一方、PNP においては $Dsg3^{1-403}/Dsg1-IgHis$ ではかなりの抗体の吸収されていたが、 $Dsg3^{1-161}/Dsg1-IgHis$ 、 $Dsg3^{163-566}/Dsg1-IgHis$ および $Dsg3^{405-566}/Dsg1-IgHis$ において約 20-30%の同等の吸収を認めた。

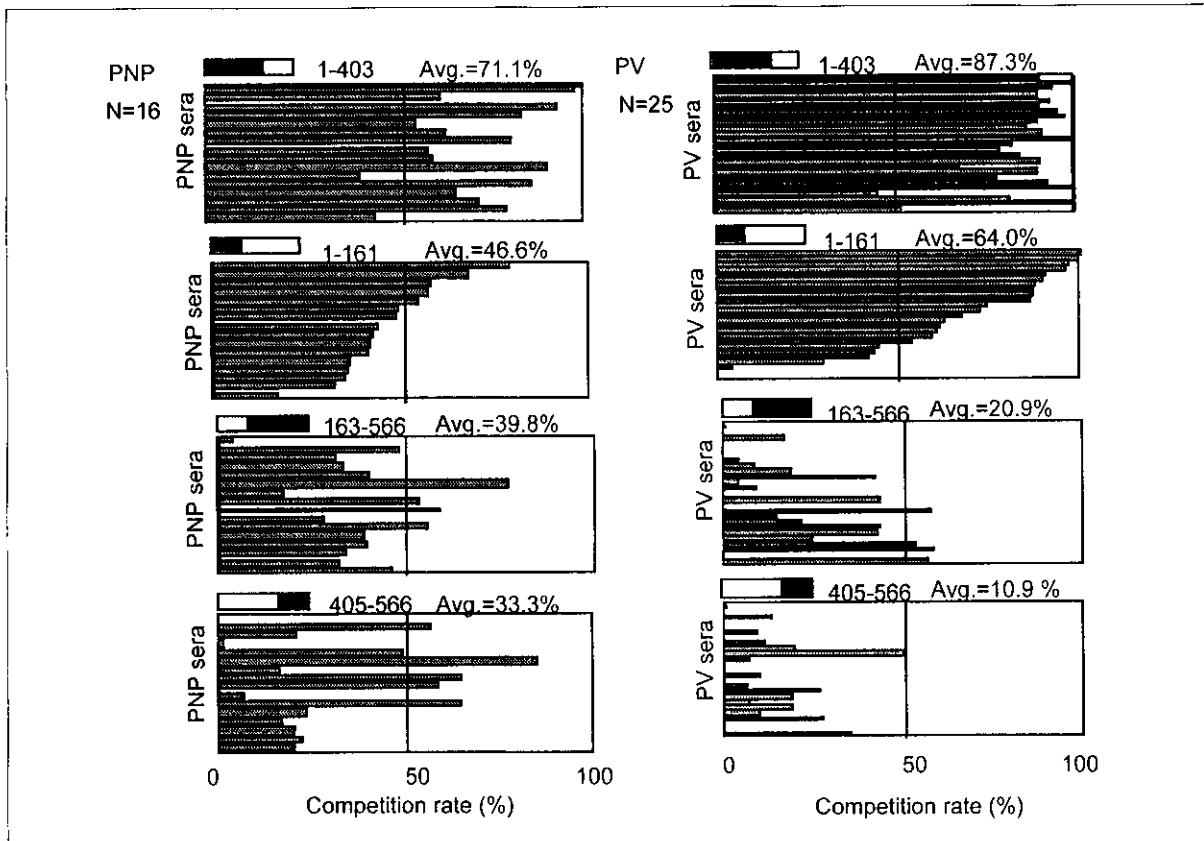


図 2

PV25 例および PNP16 例における三次元エピトープのまとめ：PV においては主要エピトープは N 末 1-161 に多く存在する事が考えられた。一方、PNP においては N 末の 1-403 に多くのエピトープが認められるほか、N 末のみならず、C 末にもエピトープが存在することが判明した。

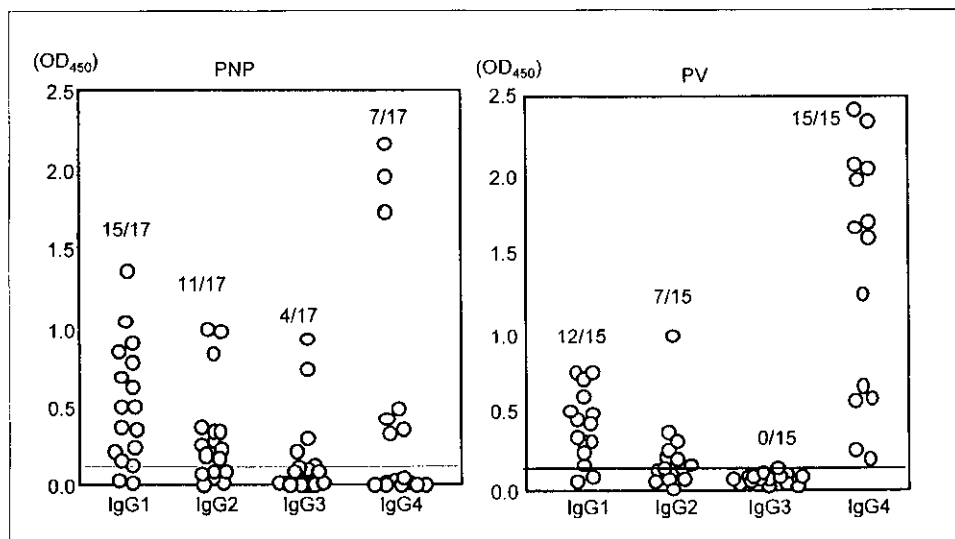


図 3

IgG subclass の分布：PV においては IgG4 が主要 subclass であることが確認されたが、一方 PNP においては IgG1 と、それについて IgG2 が主要 subclass であることが判明した。

3) 組換え BP180NC16a 蛋白を用いた ELISA 法の開発

分担研究者：西 川 武 二 (慶應大学皮膚科)

共同研究者：天 谷 雅 行、小 林 昌 和 (慶應大学皮膚科)

分担研究者：橋 本 隆 (久留米大学皮膚科)

要 約

水疱性類天疱瘡 (BP) は、ヘミデスモームに存在する細胞内蛋白である 230kD の類天疱瘡抗原 (BP230) および膜蛋白である 180kD 類天疱 (BP180) 抗原を標的とする自己免疫性水疱性疾患である。近年 BP 自己抗体の主要な標的抗原は、BP180 の細胞膜に隣接する NC16a という非コラーゲンドメインに存在するといわれている。この研究では、大腸菌を用い組み換え NC16a 蛋白を精製し、この蛋白を用いた enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) を開発し、BP 患者、尋常性天疱瘡 (PV) 患者、落葉状天疱瘡 (PF) 患者、膠原病患者、正常人の血清について ELISA を試行した。活動期の BP 患者 64 人中 54 人 (84.4%)、寛解期の BP 患者 20 人中 9 人 (45%) は陽性を示した。一方 69 人の PV 患者および 42 人の PF 患者はすべて陰性であった。92 人の膠原病患者中 2 人、336 の正常人中 5 人 (1.5%) はわずかに cut-off 値を超えた。本 NC16aELISA 法の感度および特異性はそれぞれ 84.4% (54/64) および 98.7% (531/538) と高値を示した。7 人の BP 患者を使用して ELISA スコアと病勢との関係について検討したところ、ELISA スコアは病勢と並行してよく変動していた。NC16aELISA が BP の患者の診断だけでなく病勢をモニターするための検査法としても有効と思われた。

は じ め に

水疱性類天疱瘡 (BP) は、BP230 および BP180 を標的とする自己免疫性水疱性疾患である。近年 BP 自己抗体の主要な標的抗原は、BP180 の細胞膜に隣接する NC16a という非コラーゲンドメインに存在し^{1)~4)}、この蛋白に対する抗体価は病勢に平行して推移するとされている。これまで NC16a と病勢が平行推移するといういくつかの報告はあったが定まった方法はなかった。今回、NC16a の組み換え蛋白を生成し、ELISA キットを開発し、臨床的有用性に関して検討した。

1. 方法・結果

1.1 血清

この実験で使用したされた血清は、3つの大学病院 (久留米大学、愛媛大学、慶應義塾大学) から集められた。患者血清は臨床時、組織学的ならびに免疫病理学的に確認された BP84 人から得られ、84 人のうち 64 人は活動期にあり 20 人は寛解期であった。コントロール血清は、水疱性疾患としてそれぞれ確認された PV 患者 69 人および PF 患者 42 人、膠原病患者 92 人 (皮膚筋炎 9 人、混合結合組織疾病 11 人、多発性筋炎 10 人、全身性硬化症 12 人、慢性関節リウマチ 13 人、シュエーグレン症候群 20 人、全身性エリテマトーデス 13 人、オーバーラップ症候群 3 人) および 336 の正常人の血清を使用した。

1.2 NC16aELISA

組み換え BP180NC16a 蛋白 (rNC16a) は大腸菌を用い生産された。ELISA プレートに rNC16a をコーティングし、それぞれのプレートに 100 倍希釈した血清を加えた。吸光度計を用いて測定されたインデックス値は次の定式によって定義した：インデックス = (テスト血清の OD-陰性コントロールの OD) / (陽性コントロールの OD-陰性コントロールの OD) × 100。NC16aELISA のための陽性コントロールは活動期の BP の血清を陰性コントロールは正常人の血清を使用した。

NC16aELISA 法の陽性と陰性の境界値である cut-off 値を決定するために活動期の BP64 人および正常人 336 人の血清を使用し ROC 曲線を作成した。特異性 (%) および感度 (%) の合計が最も高い値が得られるように cut-off 値を決定した。本 ELISA 法ではその値は 7.7 であった。

活動期の BP 患者 64 人中 54 人 (84.4%)、寛解期の BP 患者 20 人中 9 人は cut-off 値を超えて陽性を示した (図 1)。一方、69 人の PV および 42 人の PF 血清はすべて陰性であった。92 人の膠原病患者中 2 人、336 の正常人血清のうちの 5 人 (1.5%) はわずかに cut-off 値を超えた。したがって、NC16aELISA 法の感度および特異性はそれぞれ 84.4% (54/64) および 98.7% (531/538) であった。

1.3 免疫蛍光間接法 (IIF)

BP の血清を 1:10 から連続的に 1:40, 1:160, 1:640, 1:2560 および 1:10240 まで希釈した。それぞれの希釈血清について正常人皮膚を基質として IIF は施行した。

1.4 Epidermal extracts および rNC16a による免疫ブロット

NC16aELISA が陰性を示した 1 人の寛解期の BP 患者に rNC16a および epidermal extracts に対する免疫ブロットを施行した。これらの血清はすべて免疫蛍光間接法では陽性所見であった。11 例はすべて NC16a と BP180 に反応しなかった。この結果は ELISA の結果と一致する。11 例うちの 8 例 (72.7%) は 230kD 蛋白に反応した。

2. 病勢モニターとしての ELISA スコア

私たちは、活動期の BP で数カ月以上の経過があり、ELISA が陽性を示した 7 症例を選び、ELISA スコア、IIF 抗体値および病勢を症例ごとに比較した。

1 列目は 58 歳の女性で、プレドニゾロン 6mg/日およびニコチン酸アミドとミノサイクリンの併用療法でよくコントロールされていたが、3 年間の寛解期後に再燃した。プレドニゾロンを 15mg/日に増量し、病勢は徐々に落ち着いた。しかし、プレドニゾロンを 10mg/日に減量した時に広範囲に水疱形成を認めた。プレドニゾロン 20mg/日へ増量で軽快した。2 回の再燃を認めたが、病勢と平行して NC16aELISA スコアは推移した。対照的に、IIF 抗体価は高値を維持し平行推移を示さなかった。

2 列目は 86 歳の女性で、病勢はプレドニゾロンでよくコントロールされていたがプレドニゾロンを 10mg/日まで減量した時再燃した。プレドニゾロンを 40mg/日に増量し軽快した。NC16aELISA スコアは病勢と平行して増加し、治療に反応すると減少を示した。IIF 抗体価は再燃した時に抗体価の増加を示したが、ELISA と比較して反応が鈍かった。

3 列目は 71 歳の女性で、発症後 4 年が経過していた。初診時、プレドニゾロン 5 mg/日内服

中であつたが上肢および体幹に水疱と糜爛を認めた。ミノサイクリンとニコチン酸アミドを加えたが、新しい病変は現われ続けた。プレドニゾロンを 20mg/日に増量したところ、病変は1か月で消えた。病勢の悪化とともに NC16aELISA スコアは徐々の増加を示し、治療に応じて減少した。対照的に、IIF 抗体価は高値を持続し、病勢を反映した変動を認めなかった。この症例では、IIF 抗体価は、病勢のモニターとして信頼し得ないと考えた。

4 例目は 38 歳の男性で、初診時全身に小水疱、小糜爛が多発し、顔面に紅斑を認めた。治療はプレドニゾロン 60mg/日および diaphenylsulfone(DDS)75mg/日で始めたところ、治療に反応し軽快を示した。プレドニゾロンを 8 mg/日まで減量し、DDS を中止時、顔面および四肢に小さな丘疹、糜爛および水疱が新生した。プレドニゾロンを 30mg/日に増加し、アザチオプリン 150mg/日にて軽快を示し、その後プレドニゾロンは 13mg/日まで漸減した。NC16aELISA スコアは、病勢と平行して変動した。この症例で IIF の抗体価も比較的よく病勢を反映した。

5 例目は 80 歳の女性で、初診時プレドニゾロン 10mg/日を内服中であつたが、上肢および体幹に緊満性水疱および糜爛を認めた。ミノサイクリンとニコチン酸アミドを加えたが、新しい水疱は現われ続けた。プレドニゾロンを 20mg/日に増加し、DDS50mg/日を併用した。再燃はなくプレドニゾロンは 8 か月間で 4 mg/日まで徐々に漸減した。NC16aELISA スコアは、病勢とともに漸減を示した。IIF 抗体価も同様に平行して推移した。

6 例目は 62 歳の女性で、初診時、口腔内粘膜と体幹に糜爛および水疱を認めた。治療はミノサイクリンとニコチン酸アミドで始めたが、新しい病変は現れ続けた。プレドニゾロン 15mg/日を追加するも皮疹の新生は続いたため、プレドニゾロンを 30mg/日を増量したところ改善を認めた。その後、プレドニゾロンは 2 年間で 5 mg/日に漸減したが再燃を認めなかった。NC16aELISA は病勢と平行推移し、また IIF も病勢と平行して変動した。しかし、NC16aELISA はわずかな病勢の変動にも反応したが、IIF 抗体価はその時に変動を認めなかった。

7 例目は 49 歳の女性で、初診時口腔粘膜および全身に緊満性水疱および糜爛を認め、治療はプレドニゾロン 80mg/日で始めたがプレドニゾロンが 45mg/日まで漸減した時に再燃を認めた。血漿交換およびメチルプレドニゾロンのパルス療法により臨床の改善を認めた。ELISA スコアは病勢と平行して変動したが、一方、IIF の抗体価は治療前に一度だけ 10 倍陽性を示したが活動期においても陰性であつたため、病勢のモニターとしては不適當であつた。

考 察

BP はヘミデスマゾームに存在する細胞質内の BP230 および膜内外の BP180 蛋白を標的抗原とする自己免疫性水疱性皮膚疾患である。最近では、BP180 の細胞外部分の NC16a と呼ばれる部分が BP の主要な抗原とされている。Zillikens らは、BP180 の抗原部位は NC16a 領域の N 末の 45 アミノ酸配列内に存在するとし ELISA で BP 血清の 94% が陽性との成績を示した¹⁾。Matsumura らは、NC16a 領域の 76 アミノ酸の免疫ブロットが BP 血清の 90% で陽性になったことを示した²⁾。Guidice らは、NC16a 領域の 42 のアミノ酸に対する免疫ブロットで BP 血清の 60% に、ELISA で 53% に陽性になることを示した³⁾。私たちは大腸菌を用いて生成した組換え NC16a 蛋白をコーティングした ELISA キットを開発し、BP 患者、他の水疱性患者、膠原病患者および正常人から得られた多数の血清サンプルを使用して評価した。

今回の NC16aELISA の感度および特異性はそれぞれ 84.4% (54/64) および 98.7% (531/538) と高値であり BP の診断に有用と考えられる。特に特異度は高く ELISA が陽性であれば BP と診断できる。しかし、感度は 84.4% と高いものの NC16a に反応しない BP も存在するため、BP の診断には ELISA とともにいままでと同様に免疫蛍光法も併用して検査すべきと考える。

BP では IIF は病勢と平行して変動しない症例も多く、いままでの病勢のモニターとしてのよい指標がなかった。おそらく、それは IIF が BP180 と BP230 に対する 2 つの抗体量を反映しているのに対し、水疱形成には BP180 が大きな役割を担っているためと考えられる。BP 7 症例において本 ELISA 法は病勢と平行推移しており、本 ELISA 法は病勢のモニタリングにも有用と考えられる。

本 ELISA 法では BP180 の一部である NC16a の組み換え蛋白を使用した。本来なら BP180 の細胞外を全長とした抗原を用いた法が NC16a を抗原とするよりも良いと考えられる。しかし、畑らの報告⁵⁾では NC16a を抗原とした方が BP180 の細胞外を抗原とするよりも成績がよかった。それは、1) BP180 の細胞外の蛋白は NC16a より分子量が大きく安定した組み換え蛋白が生成されにくい、2) BP180 の組み換え蛋白が不溶性の蛋白として発現する、3) 発現された組み換え BP180 蛋白が生物学的に不活性になっている、などが原因として考えられる。

今後、本キットの開発により日常診療において NC16a に対する自己抗体価を ELISA で測定可能となる。BPNC16aELISA は、類天疱瘡の診断のみならず、病勢のモニターとしても価値のある検査法になることを思われる。

参考文献

- 1) Giudice GJ, Emery DJ, Zelickson BD, Anhalt GJ, Liu Z, Dias LA. Bullous pemphigoid and herpes gestationis autoantibodies recognize a common non-collagenous site on the BP180 ectodomain. *J Immunol* 1993; 151: 5742-50.
- 2) Matsumura K, Hashimoto T, Amagai M, Nishikawa T. The majority of bullous pemphigoid and herpes gestationis serum samples react with NC16a domain of the 180kD bullous pemphigoid antigen. *Arch Dermatol Res* 1996; 288: 507-9.
- 3) Murakami H, Amagai M, Higashiyama M, Hashimoto K, Chorzelski TP, Bhogal BS, Jenkins RE, Black MM, Zillikens D, Nishikawa T, Hashimoto T. Analysis of antigens recognized by autoantibodies in herpes gestationis: usefulness of immunoblotting using a fusion protein representing an extracellular domain of the 180 kD bullous pemphigoid antigen. *J Dermatol Sci* 1996; 13: 112-7.
- 4) Zillikens D, Rose PA, Balding SD, et al. Tight clustering of extracellular BP 180 epitopes recognized by bullous pemphigoid autoantibodies. *J Invest Dermatol* 1997; 109: 573-9.
- 5) Hata Y, Fujii Y, Tsunoda K, Amagai M. Production of the entire extracellular domain of BP180 (type collagen) by baculovirus expression. *J Dermatological Sci* 23; 2000: 183-90

BP180ELISA as a diagnostic and monitoring tool for bullous pemphigoid

Takeji Nishikawa (Department of Dermatology, Keio University)

Summary

Bullous pemphigoid (BP) is an acquired autoimmune bullous skin disease against hemidesmosomal cytoplasmic BP230 and transmembrane BP180 proteins. Epitope mapping studies have shown that the membrane-proximal noncollagenous (NC) 16a domain of human BP180 harbors clusters of antigenic sites recognized by the vast majority of BP sera. In this study, we developed an enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) using bacterial recombinant NC16a protein and evaluated its clinical benefit for diagnosis and monitoring disease activity. Fifty four (84.4%) of 64 BP sera were positive, while only two (2.1%) of 91 sera from collagen disease patients and five (1.5%) of 336 sera from normal control barely exceeded the cut-off value. None of 69 pemphigus vulgaris sera and none of 42 pemphigus foliaceus sera exceeded the cut-off value. Thus, the sensitivity and specificity of NC16a ELISA were 84.4% and 98.7, respectively. The correlation between ELISA scores and disease activity along the time course was examined using 7 BP patients. NC16a ELISA scores fluctuated well in parallel with the disease activity along the time course and reflected. These findings suggest that NC16aELISA will be a valuable tool not only for diagnosis of BP but also for monitoring of the disease activity.