

図1 NC16aELISAによる抗体価の測定

## 4) ブラジルとコロンビアの endemic pemphigus foliaceus の 抗原解析による比較

分担研究者：橋 本 隆 (久留米大学皮膚科)

共同研究者：永 田 祥 子 (久留米大学皮膚科)

Ana Maria Abreu-Velez

(Department of Dermatology, University of Antioquia, Colombia)

### 要 約

ブラジル endemic pemphigus foliaceus (EPF) はよく知られているが、最近、コロンビアにも類似の EPF が存在することが判明した。今回、両者の類似性を検討するため、29 例のコロンビア EPF および 20 例のブラジル EPF 血清に対し、各種の生化学的手法を用いて自己抗原を解析し、両疾患間で比較検討した。表皮抽出液の免疫ブロット法で、両疾患とも 30% 程が Dsg1 に反応し、加えて、50% 程が 190kDa ペリプラキンに反応した。各種ペリプラキン融合蛋白にはコロンビア EPF のほうがより高率に反応した。Dsg1/Dsg3 の ELISA で両疾患ともほぼ全例が Dsg1 に反応した。興味深いことにブラジル EPF の 60% が Dsg3 に反応したが Dsg3 に反応するコロンビア EPF はなかった。以上から、Dsg1 に主として反応する点で両疾患は類似しているが、異なった抗原プロファイルもあり、この 2 疾患には多少異なった疾患である可能性が示唆された。

### は じ め に

ブラジルに風土病的に存在する天疱瘡すなわちブラジルト天疱瘡、Brazilian endemic pemphigus foliaceus (EPF) は古くから知られている [1-3]。最近、Abreu-Velez らはコロンビアの El Bagre と呼ばれる地域にも類似の EPF が存在することを発見した [4]。今回、両者の類似性を検討するため、29 例のコロンビア EPF および 20 例のブラジル EPF 血清に対し、各種の生化学的手法を用いて自己抗原を解析し、両疾患間で比較検討した。その結果、Dsg1 に主として反応する点で両疾患は類似しているが、異なった抗原プロファイルもあり、この 2 疾患は多少異なった疾患である可能性が示唆された。

### 方 法

- (1) 血清：29 例のコロンビア EPF および 20 例のブラジル EPF 患者から血清を得た。
- (2) 蛍光抗体間接法：正常ヒト皮膚切片を基質とした蛍光抗体間接法は通常の方法で行った [5]。
- (3) 免疫ブロット法：正常ヒト表皮抽出物を基質とした免疫ブロット法は以前報告した方法で施行した。エンポブラキンとペリプラキンの各種リコンビナント蛋白を用いた免疫ブロット法は以前報告した方法で施行した [6]。BP230 の各種リコンビナント蛋白を用いた免疫ブロット法は以前報告した方法で施行した [7]。
- (4) ELISA：Dsg1 と Dsg3 のバキュロウイルス発現蛋白を用いた ELISA 法 (IgG 抗体) は以前報告した方法で施行した [8]。Dsg1 と Dsg3 の ELISA 法 (IgA 抗体) は以前報告した方法で施行した [9]。Dsc1-3 のバキュロウイルス発現蛋白を用いた ELISA 法は以前報告した方法

で施行した [論文投稿中]。

- (5) Dsc1-3 の c-DNA トランスフェクション法：Dsc1-3 の c-DNA を COS-7 細胞にトランスフェクションして IgA 抗 Dsc1-3 を検出する検索は以前報告した方法で施行した [10]。

## 結 果

- (1) 蛍光抗体間接法：29 例のコロンビア EPF 血清および 20 例のブラジル EPF 血清すべてで IgG 抗表皮細胞間抗体が陽性であった。2 例のコロンビア EPF 血清で IgA 抗表皮細胞間抗体が陽性であった。
- (2) 正常ヒト表皮抽出液を基質とした免疫ブロット法 (図 1)：11 例のコロンビア EPF 血清および 5 例のブラジル EPF 血清の IgG 抗体が 160kDa Dsg1 に反応した。また、コロンビア EPF 血清およびブラジル EPF 血清とも、ほぼ半数が 190kDa ペリプラキンに反応した。210kDa エンポブラキン、BP230、Dsg3 に反応する血清はわずかであった。
- (3) エンポブラキン、ペリプラキンおよび BP230 の各種リコンビナント蛋白を用いた免疫ブロット法 (図 2)：13%–31% のコロンビア EPF 血清がペリプラキンの各種リコンビナント蛋白に特異的に反応した。これに対してブラジル EPF 血清はペリプラキンの各種リコンビナント蛋白にほとんど反応しなかった。コロンビア EPF 血清およびブラジル EPF 血清とも、エンポブラキン、BP230 の各種リコンビナント蛋白に反応する血清はわずかであった。
- (4) Dsg1 と Dsg3 の ELISA 法 (図 3)：コロンビア EPF 血清およびブラジル EPF 血清とも、ほぼ全例が Dsg1 に反応した。興味深いことに、60% のブラジル EPF 血清が Dsg3 に反応したのに対して、すべてのコロンビア EPF 血清は Dsg3 に反応しなかった。
- (5) Dsg1 と Dsg3 の ELISA 法 (IgA 抗体)：数例のブラジル EPF 血清が Dsg1 および Dsg3 に反応する IgA 抗体を示した。
- (6) Dsc1-3 のバキュロウイルス発現蛋白を用いた ELISA 法 (図 4)：3 例のブラジル EPF 血清が Dsc1-3 に反応したのに対して、すべてのコロンビア EPF 血清は Dsc1-3 に反応しなかった。
- (7) Dsc1-3 の c-DNA トランスフェクション法：蛍光抗体法で IgA 抗表皮細胞間抗体陽性の 2 例のコロンビア EPF 血清は Dsc1-3 に反応しなかった。  
すべての結果を Table1 にまとめた。

## 考 案

今回の検討で、コロンビア EPF 血清およびブラジル EPF 血清とも、表皮抽出液の免疫ブロット法において、30%程が Dsg1 に反応した。また、Dsg1 の ELISA でコロンビア EPF 血清およびブラジル EPF 血清とも、ほぼ全例が Dsg1 に反応した。このため、コロンビア EPF とブラジル EPF 血清は、その主要な抗原が落葉状天疱瘡抗原である Dsg1 であることから、両疾患が、本質的には落葉状天疱瘡の亜型であることが示された。

さらに、コロンビア EPF 血清およびブラジル EPF 血清とも、表皮抽出液の免疫ブロット法において、50%程が 190kDa ペリプラキンと考えられる蛋白に反応したが、エンポブラキン、BP230 に反応する血清はわずかであった。各種リコンビナント蛋白を用いた免疫ブロット法で、コロンビア EPF がペリプラキンリコンビナント蛋白に高率に反応したが、ブラジル EPF はほとんど反応しなかった。また、興味深いことに、Dsg3 の ELISA で、ブラジル EPF の 60%が

Dsg3 に反応したのに対して、Dsg3 に反応するコロンビア EPF はなかった。また、Dsc1-3 の ELISA で 3 例のブラジル EPF 血清が Dsc1-3 に反応したが、Dsc1-3 に反応するコロンビア EPF はなかった。このように、コロンビア EPF およびブラジル EPF の抗原に反応には多くの相違が認められた。

## 結 論

コロンビア EPF およびブラジル EPF は主要な抗原が落葉状天疱瘡抗原 (Dsg1) である点で両疾患は類似している。しかし、やや異なった抗原プロフィールもあり、この 2 疾患には多少異なった特徴があることが示唆された。

EPF は他の自己免疫性疾患と異なり、限られた地方のみ生じるという特徴がある。これらの疾患をさらに詳細に検討することにより、自己免疫疾患の発症機序の解明につながる結果が得られることが期待される。

## 参考文献

- [1] Beutner EH, Prigenzi LS, Hale W, Leme CA, Bier OG. Immunofluorescence studies of autoantibodies to intercellular areas of epithelia in Brazilian pemphigus foliaceus. *Proc Soc Exp Biol Med* 1968; 127:81-86.
- [2] Ogawa MM, Hashimoto T, Konohana A, Castro RM, Nishikawa T. Immunoblot analyses of Brazilian Pemphigus foliaceus antigen using different antigen sources. *Arch Dermatol Res* 1990; 282: 84-88.
- [3] Warren SJ, Lin MS, Giudice GJ, Hoffmann RG, Hans-Filho G, Aoki V, Rivitti EA, Santos V, Diaz LA. The prevalence of antibodies against desmoglein 1 in endemic pemphigus foliaceus in Brazil. Cooperative Group on Fogo Selvagem Research. *N Engl J Med* 2000; 343: 23-30.
- [4] Abreu AM, Yepes MM, and Le n, Walter. Pemphigus Abreu-Manu. A lost link in skin autoimmunity in endemic fashion. *J Invest Dermatol* 2000; 114: 846(abstr.).
- [5] Hashimoto T, Amagai M, Watanabe K, Chorzelski PT, Bhogal BS, Black MM, Stevens HP, Boosma DM, Korman NJ, Gamous S, Shimizu N, Nishikawa T: Characterization of paraneoplastic pemphigus autoantigens by immunoblot analysis. *J Invest Dermatol* 104: 829-834, 1995
- [6] Nagata Y, Karashima T, Watt FM, Salmhofer W, Kanzaki T, Hashimoto T: Paraneoplastic pemphigus sera react strongly with multiple epitopes on the various regions of envoplakin and periplakin, except for C-terminal homologous domain of periplakin. *J Invest Dermatol* 116: 556-563, 2001
- [7] Hamada T, Nagata Y, Tomita M, Salmhofer W, Hashimoto T: Bullous pemphigoid sera react specifically with various domains of BP230, most frequently with C-terminal domain, by immunoblot analyses using bacterial recombinant proteins covering the entire molecule, *Exp Dermatol* 10: 256-263, 2001
- [8] Ishii K, Amagai M, Hall RP, Hashimoto T, Takayanagi A, Gamou S, Shimizu N, Nishikawa T: Characterization of autoantibodies in pemphigus using antigen-specific enzyme-linked immunosorbent assays with baculovirus-expressed recombinant desmogleins, *J Immunol* 159: 2010-2017, 1997
- [9] Hashimoto T, Komai A, Futei Y, Nishikawa T, Amagai M: Detection of IgA autoantibodies to desmogleins by an enzyme-lined immunosorbent assay-The presence of new minor subtypes of IgA pemphigus, *Arch Dermatol* 137: 735-738, 2001
- [10] Hashimoto T, Kiyokawa C, Mori O, Miyasato M, Chidgey MAJ, Garrod DR, Kobayashi Y, Komori K, Ishii K, Amagai M, Nishikawa T: Human desmocollin 1 (Dsc1) is an autoantigen for subcorneal pustular dermatosis type of IgA pemphigus. *J Invest Dermatol* 109: 127-131, 1997

## **Comparative study of antigen analysis between Colombian type and Brazilian type of endemic pemphigus foliaceus.**

Takahashi Hahimoto, Yoshiko Nagata (Kurume University School of Medicine)

Ana Maria Abreu Velez (Department of Dermatology, University of Antioquia, Colombia)

Although Brazilian endemic pemphigus foliaceus (EPF) is well known, a new focus of EPF has been identified in Colombia. In the present study, in order to compare these two types of EPF, we examined antigen profile for 29 Colombian EPF sera and 20 Brazilian EPF sera by various biochemical and molecular biological techniques. By immunoblotting of epidermal extracts, about 30% sera reacted with the 160 kDa desmoglein 1 (Dsg1) and 50% sera reacted with the 190 kDa periplakin in both types of EPF. By immunoblotting of various recombinant proteins of envoplakin, periplakin and BP230 (all plakin family proteins), Colombian EPF sera reacted with recombinant proteins of periplakin significantly more frequently than Brazilian EPF sera. By ELISA of Dsg1, almost all the sera of both types of EPF reacted with Dsg1. Interestingly, about half of the Brazilian EPF sera reacted with Dsg3 by ELISA, while no Colombian EPF sera reacted with Dsg3. These results indicated that both types of EPF are similar in terms of the positive reactivity with Dsg1, pemphigus foliaceus antigen. However, the differences of various antigen profiles seen between the two types of EPF also indicated that there may be some differences between two EPF.

Table I. Summary of the results of all experiments

	Colombian EPF	Brazilian EPF
Immunoblotting of epidermal extracts		
230 kDa BP230	2/29(7%)	1/20(5%)
210 kDa envoplakin	2/29(7%)	5/20(25%)
190 kDa periplakin	14/29(48%)	10/20(50%)
160 kDa Dsg1	11/29(38%)	5/20(25%)
130 kDa Dsg3	0/29(0%)	1/20(5%)
Immunoblotting of recombinant proteins		
EPL-N	2/29(7%)	0/29(0%)
EPL-M	4/29(13%)	3/20(15%)
EPL-C	0/29(0%)	0/20(0%)
PPL-N	9/29(31%)	1/20(5%)
PPL-M	4/29(13%)	1/20(5%)
PPL-C	8/29(27%)	3/20(15%)
BP230-N	1/29(3%)	0/20(0%)
BP230N	0/29(0%)	1/20(5%)
BP230N	0/29(0%)	1/20(5%)
ELISA		
Dsg1(IgG)	27/29(93%)	20/20(100%)
Dsg3(IgG)	0/29(0%)	12/20(60%)
Dsg1(IgA)	0/2(0%)*	3/20(15%)
Dsg3(IgA)	0/2(0%)*	1/20(5%)
Dsc1(IgG)	0/29(0%)	3/20(15%)
Dsc2(IgG)	0/29(0%)	3/20(15%)
Dsc3(IgG)	0/29(0%)	3/20(15%)
cDNA transfection to COS-7 cells		
Dsc1(IgA)	0/2(0%)*	not done
Dsc2(IgA)	0/2(0%)*	not done
Dsc3(IgA)	0/2(0%)*	not done

\*Two cases with IgA anti-cell surface antibodies

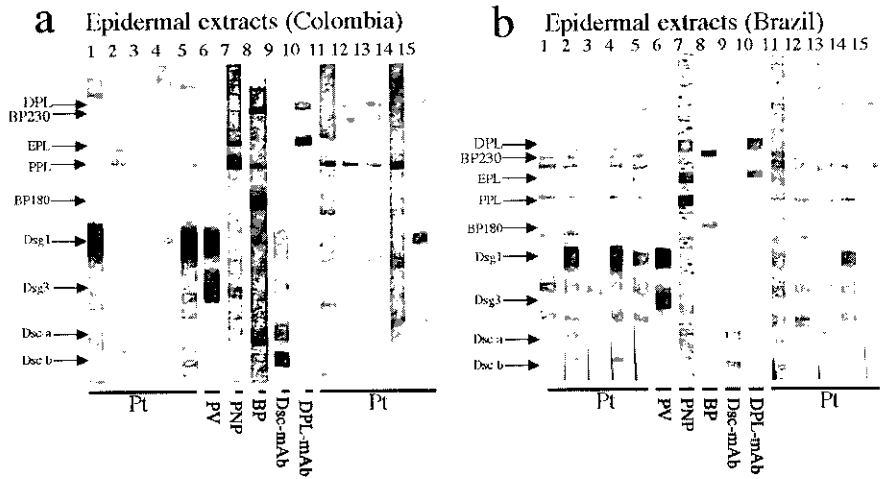


図 1

正常ヒト表皮抽出物を基質とした免疫ブロット法：(a)コロンビア EPF 血清。(b)ブラジル EPF 血清。左右に患者血清 (Pt)の反応、中央に各種のコントロール血清および抗体の反応を示す。それぞれの抗原のバンドの位置を左に示す。

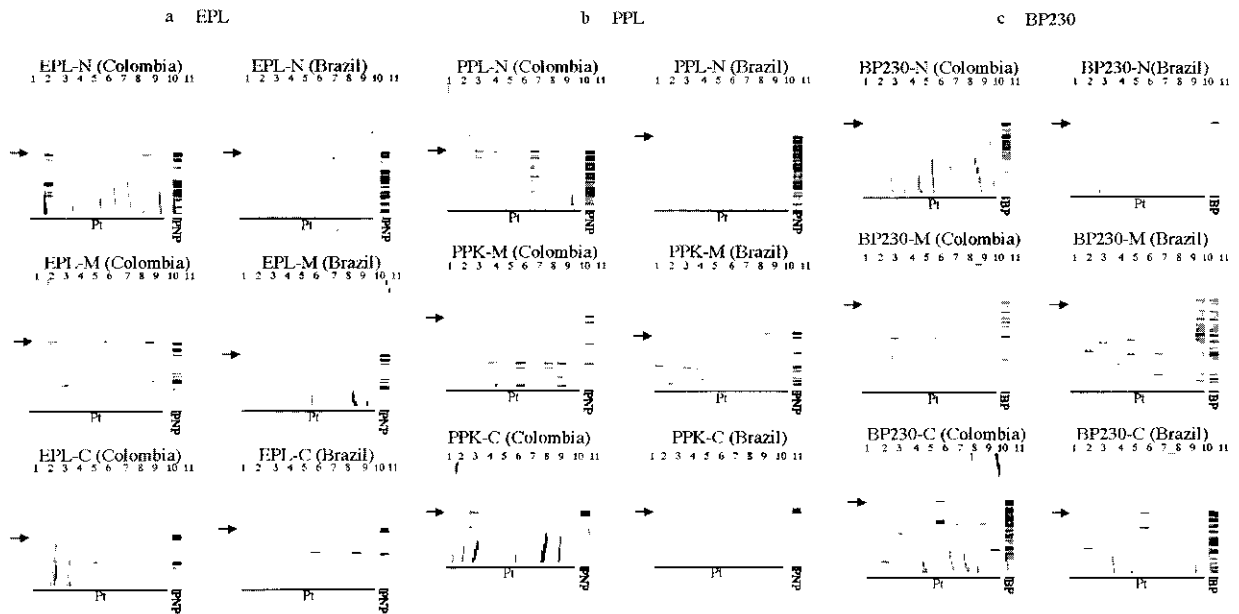


図 2

エンポブラキン、ペリプラキンおよび BP230 の各種リコンビナント蛋白を用いた免疫ブロット法：エンポブラキン (左)、ペリプラキン (中央) および BP230 (右) の各種リコンビナント蛋白の反応を示す。それぞれのパネルで、左にコロンビア EPF 血清の反応を右にブラジル EPF 血清の反応を示す。それぞれのパネルで上は N 末端部位、中央は中央線状部位、下は C 末端部位のリコンビナント蛋白の反応を示す。

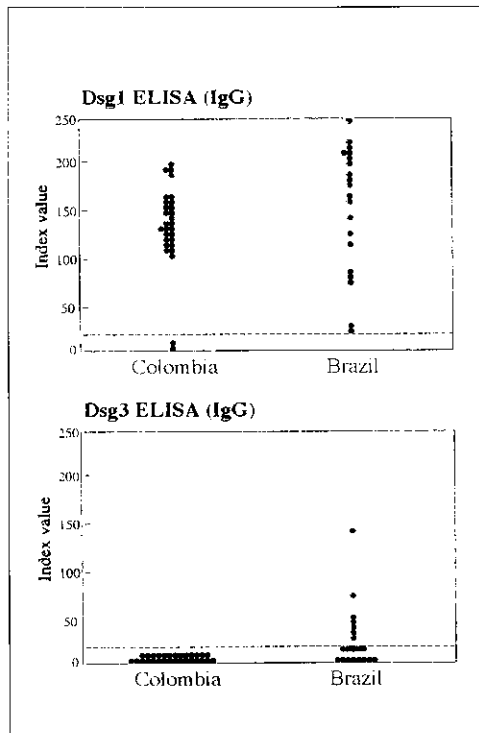


図 3

Dsg1 と Dsg3 の ELISA 法 (IgG) : Dsg1 (上) と Dsg3 (下) の反応を示す。左にコロンビア EPF 血清の反応を、右にブラジル EPF 血清の反応を示す。

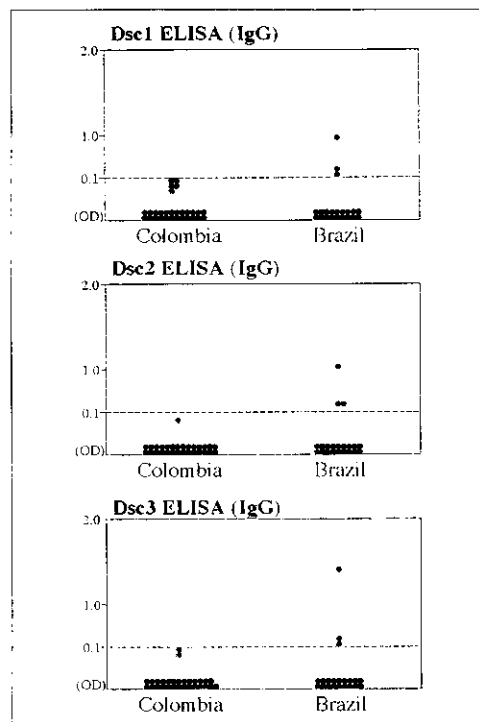


図 4

Dsc1-3 の ELISA 法 (IgG) : Dsc1 (上)、Dsc2 (中央) と Dsc3 (下) の反応を示す。左にコロンビア EPF 血清の反応を、右にブラジル EPF 血清の反応を示す。



## 5) ELISA 法による IgA 抗 Dsg1/Dsg3 自己抗体の検出

分担研究者：橋 本 隆（久留米大学皮膚科）

共同研究者：永 田 祥 子、駒 井 礼 子（久留米大学皮膚科）

天 谷 雅 行、布 袋 祐 子、西 川 武 二（慶應大学皮膚科）

### 要 約

デスマグレイン 1(Dsg1)/Dsg3 のパキュロ蛋白を用いた IgG 抗体用の ELISA 法を応用して、IgA 抗 Dsg1/Dsg3 自己抗体を検出する ELISA 法を確立し、25 名の IgA 天疱瘡の血清を検討した。IgA 天疱瘡は SPD 型 10 例、IEN 型 9 例、落葉状天疱瘡様 3 例、非典型例 3 例に分けられた。この内、3 例が IgA 抗 Dsg1 抗体陽性であり、1 例のみが IgA 抗 Dsg3 抗体陽性であった。特に落葉状天疱瘡様 IgA 天疱瘡の 3 例中 2 例に IgA 抗 Dsg1 抗体が検出された。これらの反応は Dsg1/Dsg3 パキュロ蛋白により完全に吸収されたため、それ以外の表皮細胞間蛋白に対する IgA 抗体は含まれていないと考えられた。また、SPD 型は全例 cDNA トランスフェクション法で Dsc1 に対する IgA 抗体が検出されたが IgA 抗 Dsg 抗体は陰性であった。IgA 抗 Dsg 抗体が一部の IgA 天疱瘡に検出されたことは新しい病型の IgA 天疱瘡の存在を示唆した。

### は じ め に

表皮細胞間接着にはデスモソームが最も重要であり、すべての天疱瘡の抗原物質はデスモソームに局在している。デスモソームにおける細胞間接着に直接関与している細胞膜蛋白にはデスマグレイン (Dsg) 群とデスモコリン (Dsc) 群があり、デスモソームカドヘリンとよばれる[1]。いずれの群にも 3 種の蛋白が存在し、Dsg1-3、Dsc1-3 とよばれる。IgG 抗表皮細胞膜自己抗体を示す疾患の代表は古典的天疱瘡で、落葉状天疱瘡と尋常性天疱瘡と大別される。前者の抗原は Dsg1 であり、後者の抗原は Dsg3 である[2]。

最近になり、IgA 抗表皮細胞膜自己抗体を示す IgA 天疱瘡も知られるようになった[3]。IgA 天疱瘡にも 2 種の亜型が存在し、一つは角層下膿疱症 (subcorneal pustular dermatosis: SPD) 様の皮疹を示し組織学的に角層下膿疱を呈する SPD 型であり、この患者血清は表皮上層にのみ反応する[3]。もう一つは異型な膿疱性皮疹を示し組織学的に皮疹全層の膿疱を示す intraepidermal neutrophilic IgA dermatosis (IEN) 型であり、この患者血清は表皮全層に反応する[3]。

この IgA 天疱瘡血清中の IgA 抗表皮細胞膜抗体が反応する抗原物質は長く明らかではなかった。これを証明するために、私共は新しい cDNA トランスフェクション法を開発し、すべての SPD 型の血清が Dsc1 に反応する事を示したがすべての IEN 型の血清は陰性であった[4]。以上から、SPD 型の抗原は Dsc1 であることが確認されたが、IEN 型の抗原は現在まだ不明である。

今回の研究では、Dsg1/Dsg3 のパキュロ蛋白を用いた IgG 抗体用の ELISA 法を応用して IgA 抗 Dsg1/Dsg3 自己抗体を検出する ELISA 法を確立し、IgA 天疱瘡の血清中に IgA 抗 Dsg1/Dsg3 自己抗体が存在するかどうかを検討した。その結果、一部の IgA 天疱瘡に IgA 抗 Dsg1/Dsg3 自己抗体検出された。この事実は新しい病型の IgA 天疱瘡の存在を示唆する。

## 方 法

- (1) 血清：25名のIgA天疱瘡の血清を検討した。IgA天疱瘡はSPD型10例、IEN型9例、落葉状天疱瘡様3例、およびこのどれにも分類されない非典型例3例に分けられた(表1)。
- (2) IgA抗Dsg1/Dsg3自己抗体検出用のDsg1/Dsg3ELISA法の確立：Dsg1/Dsg3のパキュロ蛋白は以前報告した方法に従って作成した[5,6]。このDsg1/Dsg3のパキュロ蛋白を用いたIgG抗体用のELISA法[5,6]を応用して、IgA抗Dsg1/Dsg3自己抗体を検出するELISA法を確立した。すなわち、2次抗体としてペルオキシダーゼ標識抗ヒトIgAモノクローナル抗体を用いた。
- (3) Dsg1/Dsg3のパキュロ蛋白を用いた吸収試験：Dsg1/Dsg3のパキュロ蛋白を用いた吸収試験は、以前報告した方法に従って施行した[7]。
- (4) cDNAトランスフェクション法：cDNAトランスフェクション法は以前報告した方法に従って施行した[4]。すなわち、ヒトDsc1-3の有核細胞発現ベクターを、COS-7細胞にトランスフェクトして、細胞膜上に発現させたそれぞれの蛋白に対する患者血清の反応を蛍光抗体法で検出した。

## 結 果

- (1) IgG抗体検出用のDsg1/Dsg3ELISA法：IgA天疱瘡の検討では、全例が抗Dsg1抗体、抗Dsg3抗体ともに陰性であった(図1)。
- (2) IgA抗体検出用のDsg1/Dsg3ELISA法：まず、正常人50例のIgA抗体の検討から、Dsg1/Dsg3とも、カットオフ値をOD0.15に設定した。すべての正常人のIgA抗体はOD0.15以下を示した。  
IgA天疱瘡の検討では、3例がIgA抗Dsg1抗体陽性であり、1例のみがIgA抗Dsg3抗体陽性であった(図1)。特に落葉状天疱瘡様IgA天疱瘡の3例中2例にIgA抗Dsg1抗体が検出された。
- (3) Dsg1/Dsg3のパキュロ蛋白を用いた吸収試験：これらのIgA抗Dsg抗体陽性の4例のIgA天疱瘡の蛍光抗体法の反応は、Dsg1/Dsg3パキュロ蛋白により完全に吸収された(図2)。この事実は、IgA抗Dsg抗体の存在を確認すると共に、これらのIgA天疱瘡血清中には、それ以外の表皮細胞間蛋白に対するIgA抗体は含まれていないことを示唆した。
- (4) cDNAトランスフェクション法：10例すべてのSPD型の血清がDsc1を発現した細胞に反応したが、そのほかすべてのIgA天疱瘡血清は陰性であった。Dsc2, Dsc3を発現した細胞にはいずれの血清のIgA抗体も反応しなかった。  
すべての結果を表1に示す。

## 考 案

本研究では、Dsg1/Dsg3のパキュロ蛋白を用いたIgG抗体用のELISA法を応用して、新たに、IgA抗Dsg1/Dsg3自己抗体を検出するELISA法を確立した。正常人50名の血清の検討から、このIgA Dsg1/Dsg3ELISA法の特異性が確認された。

25名のIgA天疱瘡の血清を検討した結果、3例がIgA抗Dsg1抗体陽性であり、1例のみが

IgA 抗 Dsg3 抗体陽性であった。特に落葉状天疱瘡様 IgA 天疱瘡の 3 例中 2 例に IgA 抗 Dsg1 抗体が検出された。これらの反応は Dsg1/Dsg3 バキュロ蛋白吸収実験によりさらに確認された。この結果はこれらの 4 例の IgA 抗 Dsg 抗体陽性の IgA 天疱瘡血清中にはそれ以外の表皮細胞間蛋白に対する IgA 抗体は含まれていないことも示唆した。

また、SPD 型 IgA 天疱瘡は全 10 例では cDNA トランスフェクション法で IgA 抗 Dsc1 抗体が検出されたが、IgA 抗 Dsg 抗体は陰性であった。この事実は、SPD 型 IgA 天疱瘡の IgA 抗体が、Dsc1 に特異的に反応することをさらに確認した。

古典的な天疱瘡がすべて Dsg1 に対する IgG 抗体を示す。これに対して、今回の研究から、IgA 天疱瘡の最も主要な抗原は Dsc1 であり、ごく一部の IgA 天疱瘡に Dsg に対する IgA 抗体が見られることが示された。IgA 抗 Dsg 抗体が一部の IgA 天疱瘡に検出されたことは新しい病型の IgA 天疱瘡の存在を示唆する。今後、IgA 天疱瘡の抗原をさらに解析することは、様々な自己免疫水疱症ならびに各種の他領域の自己免疫疾患の原因の解明につながると考える。

#### 参考文献

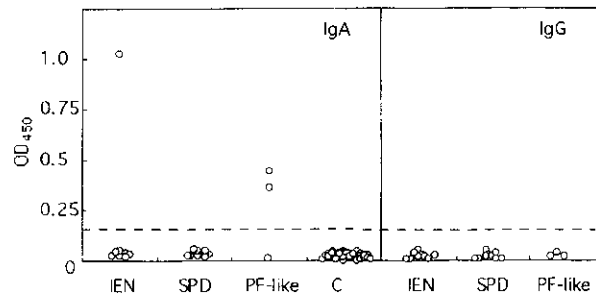
- [1] Buxton RS, Cowin P, Franke WW, Garrod DR, Green KJ, King IA, Koch PJ, Magee AI, Rees DA, Stanley JR, Steinberg MS. Nomenclature of the desmosomal cadherins. *J Cell Biol* 1993; 121: 481-483.
- [2] Hashimoto T, Ogawa MM, Konohana A, Nishikawa T. Detection of pemphigus vulgaris and pemphigus foliaceus antigens by immunoblot analysis using different antigen sources. *J Invest Dermatol* 1990; 94: 327-331.
- [3] Iwatsuki K, Hashimoto T, Ebihara T, Teraki Y, Nishikawa T, Kaneko F. Intercellular IgA vesiculopustular dermatosis and related disorders; diversity of IgA anti-intercellular autoantibodies. *Eur J Dermatol* 1991; 3: 7-11.
- [4] Hashimoto T, Kiyokawa C, Mori O, Miyasato M, Chidgey MAJ, Garrod DR, Kobayashi Y, Komori K, Ishii K, Amagai M, Nishikawa T. Human desmocollin 1 (Dsc1) is an autoantigen for subcorneal pustular dermatosis type of IgA pemphigus. *J Invest Dermatol* 1997; 109: 127-131.
- [5] Ishii K, Amagai M, Hall RP, Hashimoto T, Takayanagi A, Gamou S, Shimizu N, Nishikawa T. Characterization of autoantibodies in pemphigus using antigen-specific enzyme-linked immunosorbent assays with baculovirus-expressed recombinant desmogleins. *J Immunol* 1997; 159: 2010-2017.
- [6] Amagai M, Hashimoto T, Komai A, Hashimoto K, Kitajima Y, Ohya K, Iwanami H, Nishikawa T. Usefulness of enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) using recombinant desmogleins 1 and 3 for serodiagnosis of pemphigus. *Br J Dermatol* 1999; 140: 351-357.
- [7] Amagai M, Hashimoto T, Shimizu T, Nishikawa T. Absorption of pathogenic autoantibodies by the extracellular domain of pemphigus vulgaris antigen (Dsg3) produced by baculovirus. *J Clin Invest* 1994; 94: 59-67.

表 1 The results of ELISA and cDNA transfection studies on IgA pemphigus and others

Types	No	Dsg1-IgA	Dsg3-IgA	Dsg1-IgG	Dsg3-IgG	Dsc1-COS
IEN type IgA pemphigus	9	1	1	0	0	0
SPD type IgA pemphigus	10	0	0	0	0	10
PF-like IgA pemphigus	3	2	0	0	0	0
Atypical IgA pemphigus	3	0	0	0	0	0
Total of IgA pemphigus	25	3	1	0	0	10

Dsc-COS; cDNA transfection study for human Dsc1

A. Dsg1 ELISA



B. Dsg3 ELISA

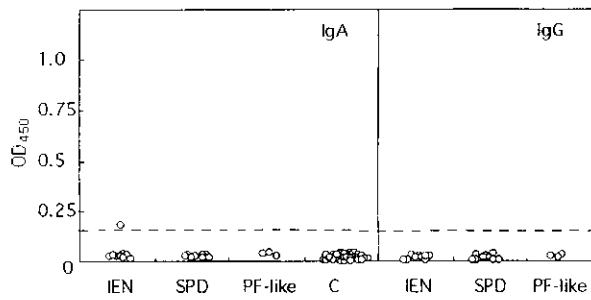


図 1

IgA および IgG の抗体検出用の Dsg1/Dsg3 ELISA 法の結果：上 (A) は Dsg1 ELISA 法、下 (B) は Dsg3 ELISA 法の結果を示す。それぞれのパネルで、左に IgA 抗体、右に IgG 抗体の結果を示す。カットオフ値 (OD 0.15) は点線で示した。すべての正常人の IgA 抗体は OD 0.15 以下を示した。IEN 型 (IEN)、SPD 型 (SPD)、落葉状天疱瘡様 IgA (PF-like)、正常人 (C)。

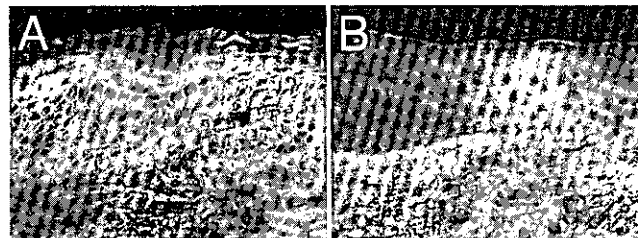


図 2

Dsg1 バキュロ蛋白を用いた吸収試験：1 例の IgA 抗 Dsg1 抗体陽性反応の IgA 天疱瘡の蛍光抗体法の反応は、Dsg1 バキュロ蛋白により完全に吸収された (B)。Dsg1 バキュロ蛋白を含まない培養上清では吸収されない (A)。

## 6) 天疱瘡・類天疱瘡の病因抗体価と理論的治療法：

### 1. 天疱瘡においてDsg1,3-ELISA 値の消失無くして水疱は消失する

分担研究者：北 島 康 雄（岐阜大学医学部・皮膚科学教室）

共同研究者：江 崎 智香子（岐阜大学医学部・皮膚科学教室）

#### 要 約

落葉状天疱瘡、尋常性天疱瘡、類天疱瘡の病因自己抗体の抗原であるリコンビナントデスモグレイン（Dsg）1,3 および BP180-NC16a 領域を用いた ELISA 法によって患者における病因抗体価を測定できるようになった。今回は天疱瘡患者において治療法と臨床症状の軽減（新生水疱の消失、びらんの消失）と Dsg1,3-ELISA による病因抗体価推移との関連性を詳細に解析した。その結果、治療の基本は病因抗体の水疱形成能の即時的抑制と長期的な病因抗体価の減弱の 2 点にあることが明示された。さらに、ステロイドは病因抗体の水疱形成能を阻害すること、およびプレドニン® 30 mg/日以上の量ではそれに加えて病因抗体産生抑制効果があることを示した。プレドニン® 30mg/日以下の量では、イムラン®、ブレディニン®あるいはネオーラル®等により病因抗体を下げる治療が必要になり、免疫抑制剤とのコンビネーション療法をすることの重要性が示唆された。

#### は じ め に

天疱瘡および類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。病理組織学的に前者は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モゾーム構成分子のデスモグレイン 1（Dsg1：分子量 160kDa）、Dsg3（分子量 130kDa）が同定されている（総説）<sup>1-3)</sup>。一方後者は、基底細胞と基底膜の間で細胞基質間接着が阻害され表皮下水疱を形成し、自己抗体の標的抗原はヘミデスモソーム構成分子の類天疱瘡抗原 2（BP180 または BPAG2：分子量 180kDa）である。最近これらの抗原のエピトープを含む部分のリコンビナント蛋白を用いた ELISA が天谷らによって開発された（我々も共同研究者として Dsg1,3-ELISA 開発に関与している）ので<sup>4, 5)</sup>、これを用いて病勢と経過を詳細に観察し治療法の改良、開発を試みた。まず本報では天疱瘡について臨床研究を行った。

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<sup>4,5)</sup>。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、昨年度は、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 を超える症例では、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を明らかにした。今回は天疱瘡患者 10 例において治療法と抗体価の減少、および臨床症状の軽減（新生水疱の消失、びらんの消失）の関連性を検討したところ、治療薬によっては抗体価減少前に水疱が消失する例と抗体価と比例する傾向が見られた。そこで、ここではこれらの結果から治療方略の理論性を高めるべく検討した。

## 方法と材料

### 症例

尋常性天疱瘡、落葉状天疱瘡それぞれ10例ずつ、経過をELISA法で経過を見ているが、詳細な臨床経過検討には、尋常性天疱瘡血清1例と落葉状天疱瘡1例を用いた。

### ELISAに関する方法

Dsg3ELISA kit および Dsg1ELISA kit (MBL, Nagoya, Japan) を用いた<sup>4,5)</sup>。

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応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、酸素気質液 (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。

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

## 結果と考案

### 1. 臨床経過と ELISA 値が平行した例

症例は54歳女性で、臨床所見、病理組織学的所見、蛍光抗体直接法、免疫プロットの結果から落葉状天疱瘡と診断した患者である (図1)。初診数ヶ月前から体幹、四肢および手指、足跡皮膚に爪甲大から貨幣大までの水疱と浅いびらんの出没に気づいていた。1999年5月初診時の Dsg1-ELISA 値は95、Dsg3-ELISA 値は正常域であった。

この症例では、グルココルチコイド (ステロイド) の使用を拒絶されたため、イムラン<sup>®</sup>のみで治療を行った。投与量は100mg/日で開始したところ、約3ヶ月ほどで水疱の新生が半減し効果が見られた。そのときの Dsg1-ELISA 値は45まで減少していた。5ヵ月日からは水疱は新生するものの日常生活に困ることは無くなったので、イムラン<sup>®</sup>を50mg/日に減量した。初診から6ヵ月後の Dsg1-ELISA 値は正常域 (15) にまで減少した。そのころからは新生の水疱は見られなくなった。この症例では病因抗体である抗 Dsg1-抗体がイムラン<sup>®</sup>による効果によって消失することにより治癒状態になったと推察される。

その後、この患者は1年間再発は無かったので、イムラン<sup>®</sup>を中止したところ7日から10日後には水疱の新生が生じた。患者が水疱新生に気づいた時点でイムラン<sup>®</sup>を内服したところ数日で水疱は見られなくなった。Dsg1-ELISA は23と若干正常域を超えるのみであった。現在はイムラン 25mg/日で Dsg1-ELISA 値も正常域で水疱も見られない。

以上の経過は病因抗体価は病勢と比例し、その病因抗体価を減少させれば治療効果が得られることを示している。

### 2. 臨床経過と ELISA 値がステロイド内服中は平行しない例

症例2は45歳女性で、Dsg1-ELISA、Dsg3-ELISA 共に陽性で、臨床所見、病理組織所見、

蛍光抗体直接法、免疫ブロットの結果から尋常性天疱瘡と診断した患者である。初診の数ヶ月前から口腔内びらん気づいていた、口腔内びらんが重症化すると共に体幹にも水疱が生じたため来科した。

図2は初期3カ月の治療と症状およびELISA値の変移を示す病歴のまとめである。初診時水疱の新生も著しく（臨床図2-A）、Dsg1-ELISA値は100以上、Dsg3-ELISA値は250以上と高かったので、プレドニン<sup>®</sup>（プレドニゾロン）で60mg（12錠）/日で治療を開始したところ、1週間後も全く軽快する兆候が見られなかった。そこで、ソルメドロール<sup>®</sup>1000mg/日・パルス療法を3回（1クール）行った。若干の効果が1～2日見られたがほとんど効果なく、プレドニン<sup>®</sup>をメドロール<sup>®</sup>（メルプレドニゾロン）48mg（12錠）に変更し2週間待ったがDsg1,3-ELISA値も下がらず、臨床も不変であった。

そこで、二重膜濾過血漿交換法（DEPP）を週2回、4週間行った。その結果、血漿交換3回目（10日後）には水疱の形成が無くなったので、Dsg1,3-ELISA値は高いまま（それぞれ200,100以上）であったが、メドロールを48mg/日から40mg/日まで下げた。ところが40mg/日に下げた3日後には再び新生水疱が見られた。そのまま血漿交換を続けつつ、経過を観察したところ4日後には新生水疱は無くなった。その1週間後にはDsg1,3-ELISA値も30以下になり、血漿交換開始後3週間ではほぼ正常値になった。血漿交換4週間後では水疱糜爛も全くなかった（臨床図2-B）。図に示すようにステロイドも漸減したところ28mg/日（7T/日）までに減量後急に水疱が多発してきたので再びソルメドロール<sup>®</sup>1000mg/日・パルス療法を3回（1クール）行った。その結果、数日後にはいったん水疱形成は2～3個/日まで減少したが再び、4～5日後には水疱が著しく新生し、Dsg1,3-ELISA値も上昇した。

この経過中、血漿交換を3回行った時点で病因抗体価が高いまま（Dsg1,3-ELISA値はそれぞれ200,100以上でプラトーに達している。従って血漿交換で抗体価の減少はあるものここでは検出できていない）でもステロイド（12錠）に表皮細胞が反応して治療効果を示したと推察される。あるいは、血漿交換によって水疱形成に必要な抗Dsg抗体以外の何らかの因子が排出されたことも否定できない。一方、いったん抗体が正常域（B点、臨床図2-B）になり臨床も治療状態であったが、再びわずかに抗体価が上昇しただけで水疱形成が顕著になった（C点、臨床図2-C）ことは抗体価の絶対値よりその変化率の方が病勢に影響するかもしれない。

図3は、図2の患者のその後の6ヶ月の経過である。その後イムラン<sup>®</sup>100mg/日リンデロン<sup>®</sup>を10錠に増加したが、治療の効果が見られないため（臨床図3-A）、二重膜濾過血漿交換を開始するためにイムラン<sup>®</sup>を半減しリンデロン<sup>®</sup>を7錠に減量した。前回血漿交換後2週間で血清IgGの上昇率により高くDsg1,3-ELISA値が急上昇したので、今回は血漿交換後γグロブリン製剤を点滴した。抗体価の上昇を正常ヒトγグロブリンによるフィードバック抑制を期待して加えた。3回目の血漿交換の後敗血症の疑いが生じたので中止したが、水疱の新生は全くなかった。この方法では抗体価は残存するが、血漿交換中止後の抗体価の上昇もなく、漸減した。リンデロン<sup>®</sup>を3錠に減量し、抗体価の抑制のためにネオオーラル<sup>®</sup>（シクロスポリン）を加えたところ約2ヶ月で抗体価は3分の1（Dsg1,3ELISA値50以下）になった。この時点でも水疱はまったく見られなくなった（臨床図3-B）。

このことは病因抗体価の減少期には抗体価が正常域に下がって無くてもステロイドの水疱抑制効果が見られることを示している。また同様な現象を落葉状天疱瘡でも一例報告している<sup>6)</sup>。

しかしながら、口腔内糜爛のみが悪化し、改善ないため、3クール目の2重膜濾過血漿交換療



法を行った。今回も敗血症疑いが生じたため3回で中止し、しかもγグロブリン製剤も充分点滴できなかつたため、血漿交換中止後急速に病因抗体価が上昇した。そのために口腔内糜爛が重症化したためソルメドール<sup>®</sup>1000mg/日・パルス療法を3回(1クール)行い、さらに抗体価を下げる目的でプレディニン<sup>®</sup>(150mg/日)を投与したところ、2ヶ月かかって抗体価は正常値に下がり、口腔内糜爛も治癒した。

ここで注目されることは、前回2回のステロイドパルス療法では治癒効果が全く見られなかったが、3度目はパルス後、プレディニン<sup>®</sup>を用いたものの極めて良く治療効果が見られたことである。このことは、このコンビネーションが良かったことか、あるいは患者の薬剤(ステロイド)に対する感受性が変動的であることを示唆している。

## ま と め

今回のDsg1,3-ELISAによる病因抗体価推移を詳細に解析しながら治療した結果から、治療の基本は病因抗体価の減弱と、病因抗体の水疱形成能の抑制の2点にあたることが示唆された。さらに、ステロイドは病因抗体の水疱形成能を阻害すること、そしてプレドニゾロン換算30mg/日以上以上の量ではそれに加えて病因抗体産生抑制抗体効果があることを示した。30mg/日以下の量では、イムラン<sup>®</sup>、プレディニン<sup>®</sup>あるいはシクロスポリン等により病因抗体を下げる治療が必要になり、免疫抑制剤とコンビネーション療法をすることが重要であることが示唆された。

## 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: 137-144, 1999
- 2) Kitajima, Y.: Adhesion molecules in the pathophysiology of bullous disease. Eur. J. Dermatol., 6: 399-405, 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.87-116.
- 4) 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: 351-357, 1999
- 5) 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: 2010-2017, 1997
- 6) 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: 18-21, 2000

### デスマグレインELISAと臨床経過

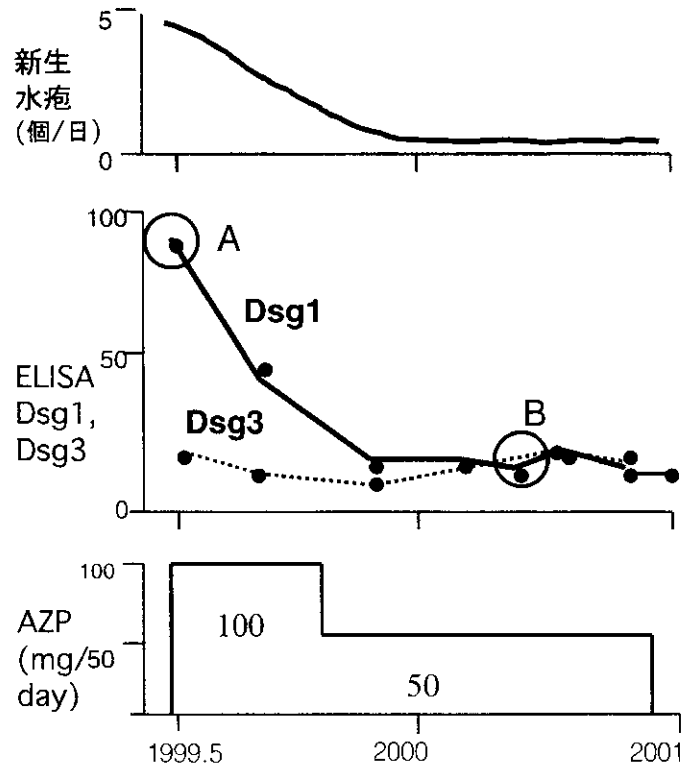


図 1

臨床経過と ELISA 値が平行した例。落葉状天疱瘡の 54 歳女性例のデスマグレイン ELISA と臨床経過。



図 1-A

治療前の手背の糜爛と水疱。



図 1-B

治療後の手背。糜爛は見られない。

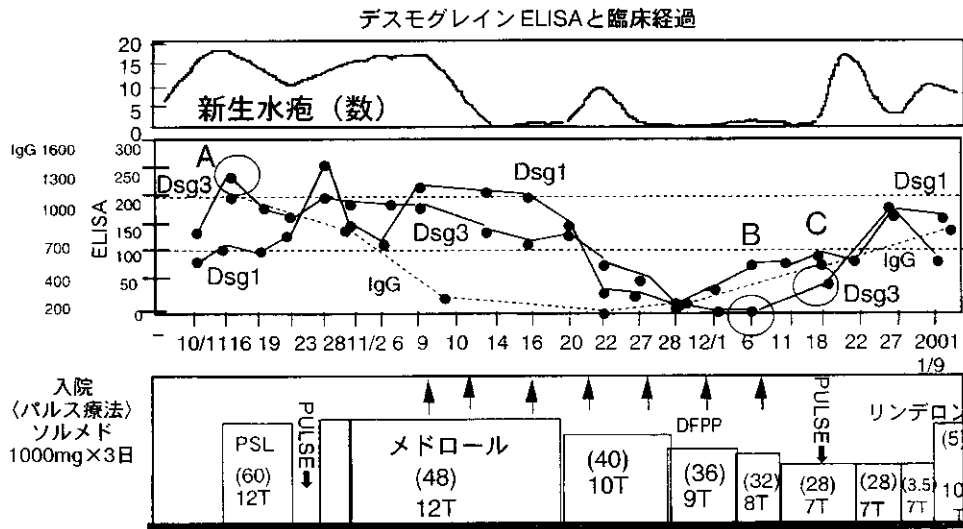


図 2

臨床経過と ELISA 値がステロイド内服中は平行しない例の治療前半。尋常性天疱瘡の 45 歳女性のデスマグレイン ELISA と臨床経過。

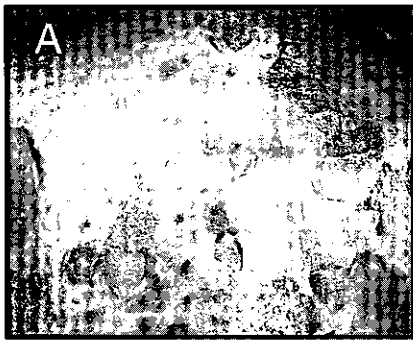


図 2-A

未治療時の背部の糜爛・水疱。

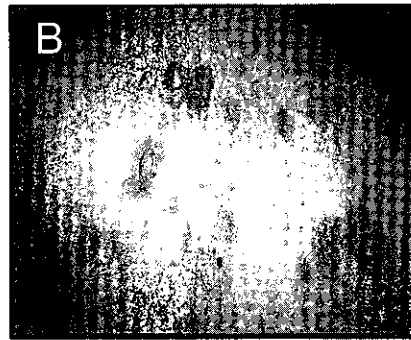


図 2-B

抗体価も正常域になり臨床も治癒した状態時。

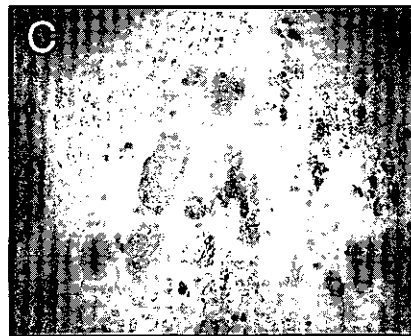


図 2-C

いったん治癒したが再び悪化した時の臨床。病因抗体価はわずかに上昇しただけであるが臨床は顕著に悪化した。11 月 16 日時点では病因抗体価は遥かに高いが水疱新生は無い。

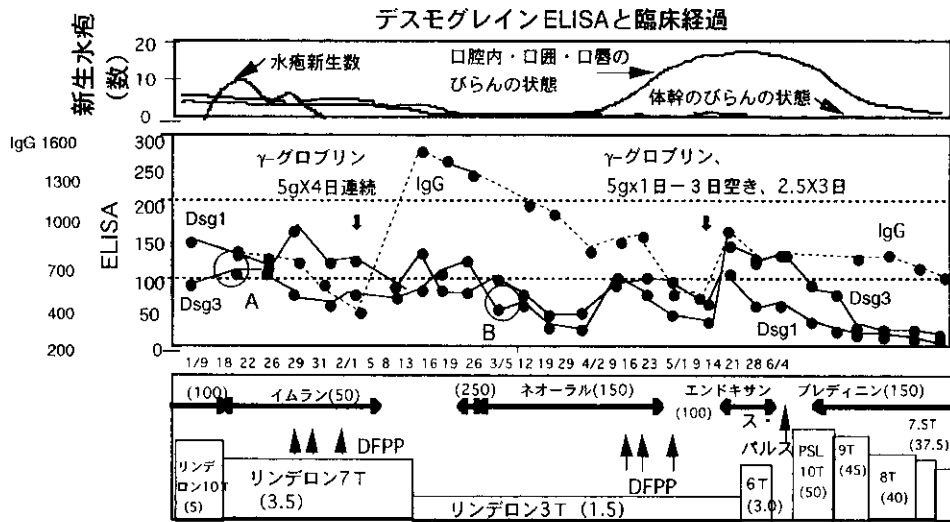


図 3

臨床経過と ELISA 値がステロイド内服中は平行しない例の治療前半。



図 3-A

再発悪化時の背部の爛・水疱。

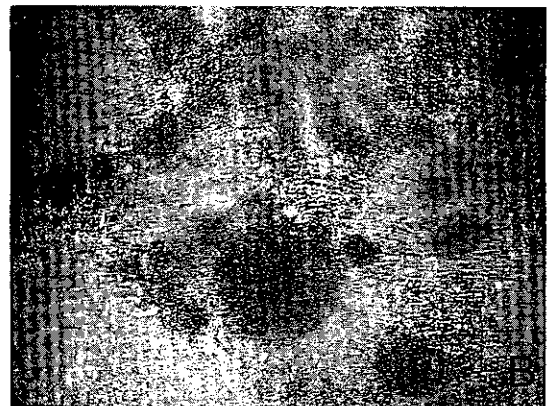


図 3-B

略治時の臨床。抗体価はA点よりは半減しているが、正常域には達していないが、水疱形成は無い。この時の ELISA 値は図 2-C の時と同じであるが、臨床は全く逆である。