

図とその説明

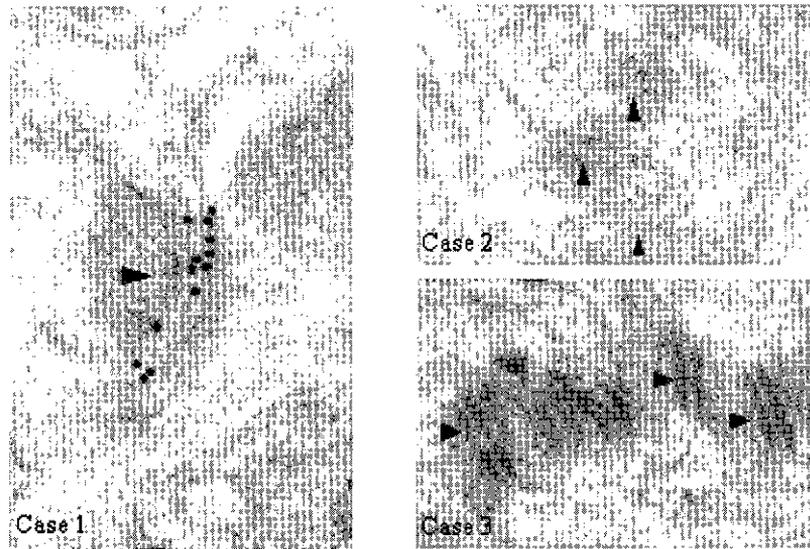


図1 post-embedding免疫電顕法：SPD型IgA天疱瘡
10nmまたは5nmの金粒子は主にデスモゾーム領域に沈着を認めた。
(矢印 デスモゾーム)

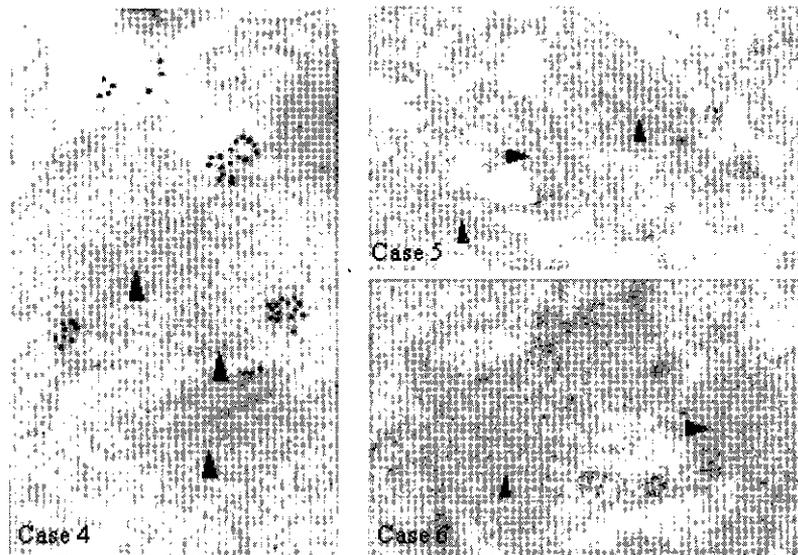


図2 post-embedding免疫電顕法：IEN型IgA天疱瘡
10nmまたは5nmの金粒子は主にデスモゾーム領域以外の細胞間に沈着
を認めた。(矢印 デスモゾーム)

厚生労働科学研究費補助金（特定疾患対策研究事業）
分担研究報告書

Dsg1-/Dsg3+尋常性天疱瘡抗体結合直後のデスモソーム構成分子の動態：
デスモグレイン3欠損デスモソーム形成過程に関する新しい実験的成績

主任研究者 北島康雄 岐阜大学医学部免疫アレルギー内分分泌講座・皮膚病態学 教授

研究要旨 我々はこれまでに、培養表皮細胞において尋常性天疱瘡抗体が細胞表面のデスモグレイン3 (Dsg3) に結合すると、細胞内シグナル伝達が活性化されDsg3分子のリン酸化、プラコグロビンのDsg3からの遊離とデスモグレイン3 Dsg3が形成されることを報告してきた。今回は、これをさらに証明するために、培養DJM-1細胞を用いて、Dsg1-/Dsg3+天疱瘡抗体がDsg3に結合した直後から5時間まで経時的に、免疫複合体とデスモソーム構成分子であるデスモコリン3とデスモプラキンの動態を観察した。その結果、30秒から2分間で天疱瘡抗体で刺激した時のみDsg3・天疱瘡抗体による免疫複合体が顕微鏡で観察できる点状構造を形成した。2分間天疱瘡抗体で刺激し免疫複合体を形成させ、その後天疱瘡抗体フリーの培地で30分及び5時間培養し、天疱瘡抗体・Dsg3免疫複合体の運命を抗ヒトIgG、抗Dsg3抗体、抗デスモプラキン抗体で観察したところ、5時間後にはデスモソームはデスモプラキン、デスモコリン3によって点状に細胞間に観察されるが、二重染色で同じ点状ラインに天疱瘡抗体とDsg3はほとんど消失し一部の細胞間のみ濃く残存していた。これは天疱瘡抗体結合によってデスモソームからDsg3がスクイズド・アウトされたことを示唆する。これらはDsg3欠損デスモソームの形成過程の初期の変化である事を示唆する。

共同研究者

山本ゆかり 岐阜大学医学部皮膚科研究員

A. 研究目的

我々はこれまでに、培養表皮細胞において天疱瘡抗体が細胞表面のデスモグレイン3に結合すると、細胞内シグナル伝達が活性化されデスモグレイン3分子のリン酸化、プラコグロビンのデスモグレイン3からの遊離とデスモグレイン3の分解が30分以内に生じ、30時間以内にデスモグレイン3欠損デスモソームが形成されることを報告してきた^{1,2)}。今回は、このデスモグレイン3欠損デスモソームの形成過程について、抗体結合後直後から5時間までのデスモソーム構成分子の分布動態の変化を追跡し、デスモグレイン3欠損デスモソーム形成の証明とその初期の形成過程を明らかにすることを目的とした。

B. 研究方法

1) 細胞の培養；

ヒト扁平上皮癌細胞から分離したDJM-1細胞を、Eagle's essential medium(MEM), 0.09 mM Ca²⁺, 0.4 ug/mlハイドロコチゾン、10ng/ml EGF, 84 ng/mlコレラトキシン、100 units/ml ペニシリン、100 mg/ml ストレプトマイシン、10% FCSを含む培地中で10mm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カルシウム濃度のみを上昇させて、1.24 mM Ca²⁺培地で120時間培養した後実験に用いた。

2) 天疱瘡抗体刺激と免疫複合体の追跡

尋常性天疱瘡抗体はデスモグレイン3+ (Dsg3+) デスモグレイン1- (Dsg1-)であることをDsg3-ELISA、Dsg1-ELISAと表皮抽出液を基質にした免疫ブロット法によって確認した尋常性天疱瘡患者3名の

血清から (Dsg1-/Dsg3+) PV-IgG を精製し、個別に用いた。あるいはこれらの血清を56°C、30分加熱した血清を用いた。最初に精製した (Dsg1-/Dsg3+) PV-IgG で実験を行い繰り返し実験では (Dsg1-/Dsg3+) PV 血清を用いた。

培養 DJM-1 細胞に Dsg1-/Dsg3+ 尋常性天疱瘡抗体を結合させるために患者血清を10%になるようにまたは (Dsg1-/Dsg3+) PV-IgG (全 IgG で 0.2-0.3 mg/ml) を添加し、30秒、あるいは2分間刺激し、直ちに30秒以内で PBS で洗浄し、-20°C アセトンで2分間、あるいは3%パラホルムアルデヒドで固定し、蛍光抗体法で接着分子の動態を観察した。一方、免疫複合体追跡実験では、培養細胞を (Dsg1-/Dsg3+) PV-IgG または (Dsg1-/Dsg3+) 尋常性天疱瘡血清で2分間刺激し、免疫複合体を細胞膜表面で形成させ、ついで PBS で洗浄後、天疱瘡抗体を含まない培地で、30分間あるいは5時間培養し、先と同様に-20°C アセトンで2分間、あるいは3%パラホルムアルデヒドで固定し、免疫複合体及びデスモソーム構成蛋白分子の運命をそれぞれに対するモノクローナル抗体を用いた蛍光抗体法によって追った。

3) 接着分子の蛍光抗体方による観察

カバーガラス上に培養した細胞を上述のように固定した後、抗デスモグレイン3抗体 (モノクローナル; 5G11 またはポリクローナル・アフィニティ精製; AHP319)、抗デスモコリン3抗体 (モノクローナル; Dsc3-U114)、抗デスモプラキン抗体 (モノクローナル; DP2.17)、抗デスモグレイン3抗体 (ポリクローナル・アフィニティ精製; AHP319) とそれぞれに対する FITC ラベルあるいはローダミンラベル2次抗体を用いて染色した。

C. 研究結果

1) 30秒~2分間で蛍光顕微鏡下で観察可能な免疫複合体を細胞膜表面で形成する

(Dsg1-/Dsg3+) 尋常性天疱瘡抗体を培地に添加後、30秒及び2分間インキュベーションして固定し、抗ヒト IgG-FITC またはローダミンラベル抗体および抗デスモグレイン3抗体+抗マウス IgG-FITC の単独あるいは二重染色の結果、すでに、30秒間の天疱瘡抗体刺激によって蛍光抗体顕微鏡下で天疱瘡抗体及びデスモグレイン3は観察可能な細胞表面あるいは細胞内に点状分布として観察されるようになった (図1)。すなわち、これらはデスモグレイン3と尋常性天疱瘡抗体との免疫複合体 (PV-IgG/Dsg3 免疫複合体) である。細胞間は、ディフューズに連続した線として染色された。コントロール IgG あるいはコントロール正常ヒト血清刺激では、抗デスモグレイン3抗体染色でのみ細胞表面あるいは細胞間にディフューズ線状に染色され、細胞表面、細胞内には点状構造は観察されなかった (図2)。

デスモコリン3はコントロール、(Dsg1-/Dsg3+) 尋常性天疱瘡抗体処理共に同様にほとんど全ての細胞間に点線状配列が見られ、両者に差がなかった (図2)。

デスモプラキンはコントロールと差がなく、共に、細胞間、細胞室内に点状に見られた (図示せず)。

2) 2分間で形成されたPV-IgG/Dsg3免疫複合体とデスモソームの運命: 30分後

2分間 (Dsg1-/Dsg3+) 尋常性天疱瘡抗体刺激後、抗体無添加培地で免疫複合体の運命を30分間追ったところ、細胞間のディフューズな線状の蛍光が点状、点線状により明瞭になったこと、細胞質内あるいは細胞表面の点状凝集がバックが黒くなってきてより明瞭になったことである。デスモソームを示す細胞間の点線状配列は細胞コロニーの辺縁まで明瞭に見られ、ほとんど全ての細胞間に見られた (図1)。

デスモコリン3、デスモプラキンはコントロール、(Dsg1-/Dsg3+) 尋常性天疱瘡

抗体処理共に同様に、前者ではほとんど全ての細胞間に点線状配列が見られ、後者ではコ細胞間、細胞室内に点状に見られ、天疱瘡抗体の影響はなかった(図2)。

3) 2分間で形成された PV-IgG/Dsg3 免疫複合体とデスモソーム分子の運命: 5時間後

2分間(Dsg1-/Dsg3+) 尋常性天疱瘡抗体刺激後、抗体無添加培地で免疫複合体の運命を抗ヒト IgG、抗デスモグレイン3抗体で5時間追ったところ、30分間追跡時に見られた全ての細胞間の点線状蛍光が大部分のところで消失し、所々により大きく凝集した点状配列が残存したように見られた。しかし細胞間は淡いバックグランド蛍光でデスモソームの分布は変化を受けず残っているように見られた(図3)。

そこで、抗ヒト IgG-ローダミン抗体と抗デスモコリン3抗体、抗デスモプラキン抗体(二次抗体は FITC) で二重染色したところ、先に述べたデスモソームはあるが PV-IgG/Dsg3 免疫複合体の消失したところにも明らかにデスモコリン3(図3)、デスモプラキン(図4)共に点状に明瞭に見え、PV-IgG/Dsg3 免疫複合体がデスモソームから消失したように観察された。

D. 考察

我々は先に Dsg1-/Dsg3+PV-IgG 処理によって20分間で細胞膜からデスモグレイン3が消失し、30時間後には細胞骨格、デスモソームからも消失すること、この時、デスモプラキン、デスモグレイン1は残存することから、デスモグレイン3欠損デスモソームの形成されることを報告した^{2,3)}。今回はさらにこの現象を2分間で精製された PV-IgG/Dsg3 免疫複合体を追跡するという別の方法で検討した。

その結果、30秒間で蛍光抗体顕微鏡法で点状蛍光として観察可能な PV-IgG/Dsg3 免疫複合体凝集塊がデスモソーム上及び細

胞表面あるいは細胞内に形成されることが明らかになった。また、この点状構造は、細胞内にエンドソームとして取り込まれていると言うことはすでに我々は免疫電顕で報告している⁴⁾。その後このデスモソーム上に形成された複合体は30分間は少なくともデスモソーム内に存在するが、5時間後にはデスモコリン3、デスモプラキンはデスモソームに残存するが、デスモグレイン3を含む免疫複合体はデスモソームから消失することが明らかになった。

このことは、デスモソーム内から免疫複合体が圧出されることを示唆している。これに関して、蛍光蛋白である GFP を結合したデスモグレイン2分子を発現した細胞において蛍光を時間的に追跡するという実験結果から、デスモソーム構造は安定で少なくとも3時間は同じ位置に存在するが、一方ではデスモソーム外のデスモソームカドヘリン分子は30分間でデスモソーム内に新たに侵入することができるほど流動的であることがすでに報告されている⁵⁾。このことから、デスモソーム内のデスモグレイン3分子に結合した尋常性天疱瘡抗体はデスモグレイン3分子を免疫複合体としてデスモソーム内から排除することになり、結果としてデスモソーム欠損デスモソームを形成することになる。このことは、デスモグレイン3ノックアウトマウスに見られるように尋常性天疱瘡発症機序に深く関わっていると推察される。

E. 結論

培養 DJM-1 細胞を用いて、Dsg1-/Dsg3+ 天疱瘡抗体が Dsg3 に結合した直後から5時間まで経時的に、免疫複合体とデスモソーム構成分子であるデスモコリン3とデスモプラキンの動態を観察した。その結果、30秒から2分間で天疱瘡抗体で刺激したのみで Dsg3・天疱瘡抗体による免疫複合体が顕微鏡で観察できる点状構造を形成した。2分間天疱瘡抗体で刺激し免

疫複合体を形成させ、その後天疱瘡抗体フリーの培地で30分及び5時間培養し、天疱瘡抗体・Dsg3免疫複合体の運命を抗ヒトIgG, 抗Dsg3抗体、抗デスモプラキン抗体で観察したところ、5時間後にはデスモソームはデスモプラキン、デスモコリン3によって点状に細胞間に観察されるが、二重染色で同じ点状ラインに天疱瘡抗体とDsg3はほとんど消失し一部の細胞間のみ濃く残存していた。これは天疱瘡抗体結合によってデスモソームからDsg3がスクイズド・アウトされたことを示唆する。これらはDsg3欠損デスモソームの形成過程の初期の変化である事を示唆する。

引用文献

- 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. **J Invest Dermatol Symp Proc** 4: 137-144, 1999
- 2) Kitajima Y. Mechanisms of desmosome assembly and disassembly. **Clin Exp Dermatol** 27: 684-690, 2002
- 3) Aoyama Y, Kitajima Y. Pemphigus vulgaris-IgG causes a rapid depletion of desmoglein 3 (Dsg3) from the triton X-100 soluble pools, leading to the formation of Dsg3-depleted desmosomes in a human squamous carcinoma cell line, DJM-1 cells. **J Invest Dermatol** 112: 67-71, 1999
- 4) Aoyama Y, Owada MK, Kitajima Y, A pathogenic autoantibody, pemphigus IgG, induces phosphorylation of desmoglein 3, and its dissociation from plakoglobin in cultured lkeratinocytes. **Eur J Immunol** 29: 2233-2240, 1999
- 5) Sato M, Aoyama Y, Kitajima Y. Assembly pathway of desmoglein 3 to desmosomes and its perturbation by pemphigus vulgaris-IgG in cultured keratinocytes, as revealed by time-lapsed labeling immunoelectron microscopy. **Lab Invest** 80: 1583-1592, 2000
- 6) Windoffer R, Borchert-Stltrager B, Leube RE. Desmosomes: interconnected calcium-dependent structures of remarkable stability with significant integral membrane protein turnover. **J Cell Sci** 115:1717-1732, 2002

F. 健康危険情報

該当なし。

G. 研究発表 (平成14年度)

1. 論文発表

英語論文

1. Gu LH, Ichiki Y, Sato M, Kitajima Y. A novel nonsense mutation at E106 of the 2B rod domain of keratin 14 causes dominant epidermolysis bullosa simplex. **J Dermatol** 29: 136-145, 2002
2. Gu LH, Ichiki Y, Kitajima Y. A aberrant expression of p16 and RB protein in eccrine porocarcinoma. **J Cutan Pathol** 29: 473-479, 2002
3. Kitajima Y. Mechanisms of desmosome assembly and disassembly. **Clin Exp Dermatol** 27: 684-690, 2002
4. Nguyen VT, Arredondo J, Chernyavsky AI, Kitajima Y,

Grando SA. Keratinocyte acetylcholine receptors regulate cell adhesion. *Life Sciences* 72: 2081-2085, 2003

5. Kitajima Y. Current and prospective understanding of clinical classification, pathomechanisms and therapy in pemphigus. *Arch Dermatol Res* : in press
6. 北島康雄. 水疱症自己抗体とシグナル伝達. *現代医療*34: 1111-1117, 2002
7. 北島康雄. 先天性表皮水疱症. *小児科診療*: in press
8. 北島康雄. 角化過程におけるケラチノサイトの上方移行・Positioning Differentiation と細胞間接着制御とその異常. 第17回角化症研究会記録集: in press

日本語著書

1. 北島康雄. 魚鱗癬. 亀山正邦, 高久史磨編. 今日の治療指針第5版 東京: 医学書院; 1439-1440, 2002
2. 北島康雄. レチノイド. 斎田俊明, 塩原哲夫, 宮地良樹, 渡辺晋一編. 今日の治療指針第3版 東京: 医学書院; 203-204, 2002
3. 北島康雄. 掌蹠膿疱症. 新村真人, 瀧川雅浩編. 皮膚疾患最新の治療2001-2002 東京: 南江堂; 105-106, 2002
4. 北島康雄. 単純型表皮水疱症. 玉置邦彦編. 最新皮膚科学大系6 水疱症 膿疱症 東京: 中山書店; 166, 2002
5. 北島康雄. 角層下膿疱症. 新村真人, 瀧川雅浩編. 皮膚疾患最新の治療2003-2004 東京: 南江堂; in press, 2003
6. 北島康雄. 炎症のない角化性病変. 岩月啓氏, 宮地良樹編. カラーアトラス皮膚を診ると全身が見える 東京: 診断と治療社; in press, 2003
7. 北島康雄. 角化の生化学・分子生物学. 図解・皮膚科学テキスト2 皮膚

の生物学 東京: 中外医学社; in press, 2003

2. 学会発表

1. Grando SA, Arredondo J, Chernyavsky A, Kitajima Y., Nguyen VT. Mechanisms of pharmacologic regulation of keratinocyte adhesion by cholinergic drugs. 63rd Annual Meeting of the Society for Investigative Dermatology, 2002
2. Nguyen VT, Arredondo J, Chernyavsky A, Pittelkow MR, Kitajima Y., Grando SA. Pemphigus vulgaris IgG and a corticosteroid exhibit reciprocal effects on keratinocyte adhesion molecules. 63rd Annual Meeting of the Society for Investigative Dermatology, 2002
3. Kitajima Y. Relationship between dermatology and industry. The 20th World Congress of Dermatology: Congress Mondial Dermatologie Paris, 2002
4. Kitajima Y. Mechanisms of desmosome assembly and disassembly. International Meeting on Bullous Diseases, 2002
5. Ichiki Y, Gu LH, Kim SC, Park J, Sato M, Kitajima Y. A novel mutation, frameshift and delayed stop codon, in tail domain of keratin 5 causes a novel type of epidermolysis bullosa simplex with migratory circinate erythema. International Meeting on Bullous Diseases, 2002
6. Nagai-Sato M, Yamamoto Y, Kitajima Y. Binding of bullous pemphigoid autoantibodies to

BPAG2 causes internalization of $\alpha 6$ -integrin in cultured keratinocytes. 4th Joint Meeting of the Society for Cutaneous Ultrastructure Research and the Japanese Society for Ultrastructural Cutaneous Biology, 2002

7. 北島康雄. シグナル伝達異常と細胞接着障害. 第92回日本麻酔科学会東海地方会, 2002
8. 市來善郎, 江崎智香子, 和泉智子, 北島康雄. 水疱症: ELISA値を参考にして—自己免疫疾患の治療指針—. 第53回日本皮膚科学会中部支部学会, 2002

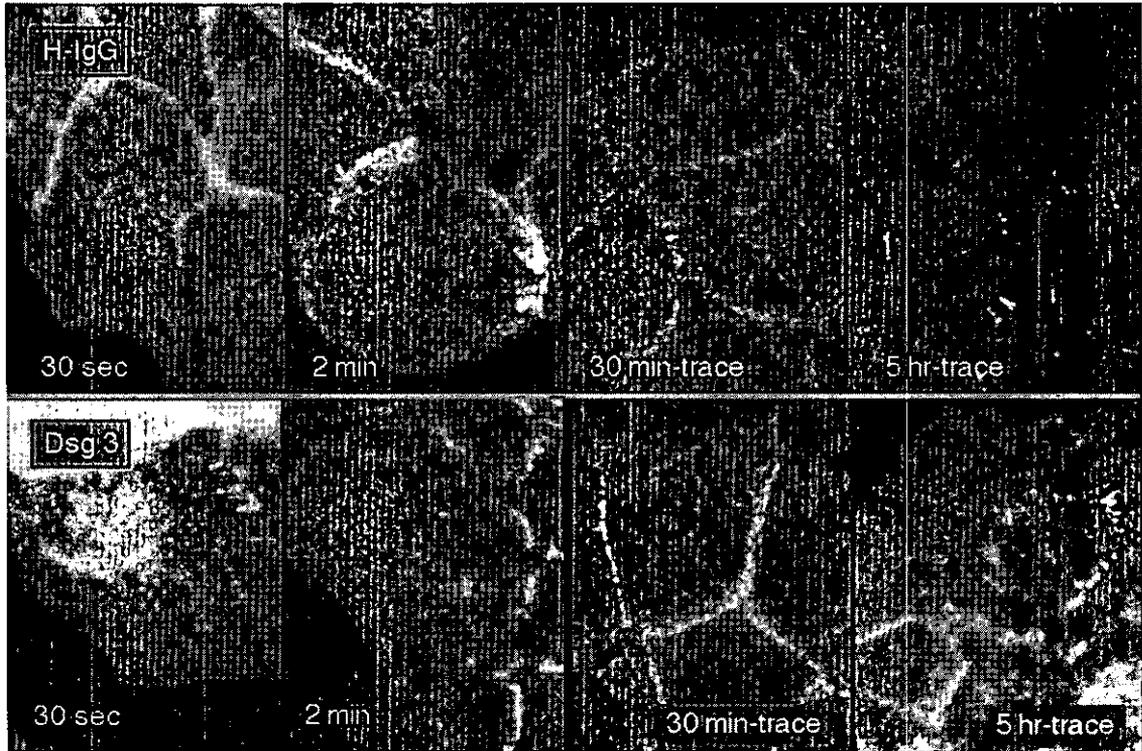


図1 尋常性天疱瘡抗体添加後の H-IgG/Dsg3 免疫複合体の分布変化。上段；抗ヒト IgG-FITC, 下段；抗 Dsg3/ 抗マウス IgG-FITC 染色。2分までは細胞間にディフューズな線として、30分後は点線上に見られ、5時間後は一部に残るのみである。細胞内の点状分布は30分までは明瞭であった。

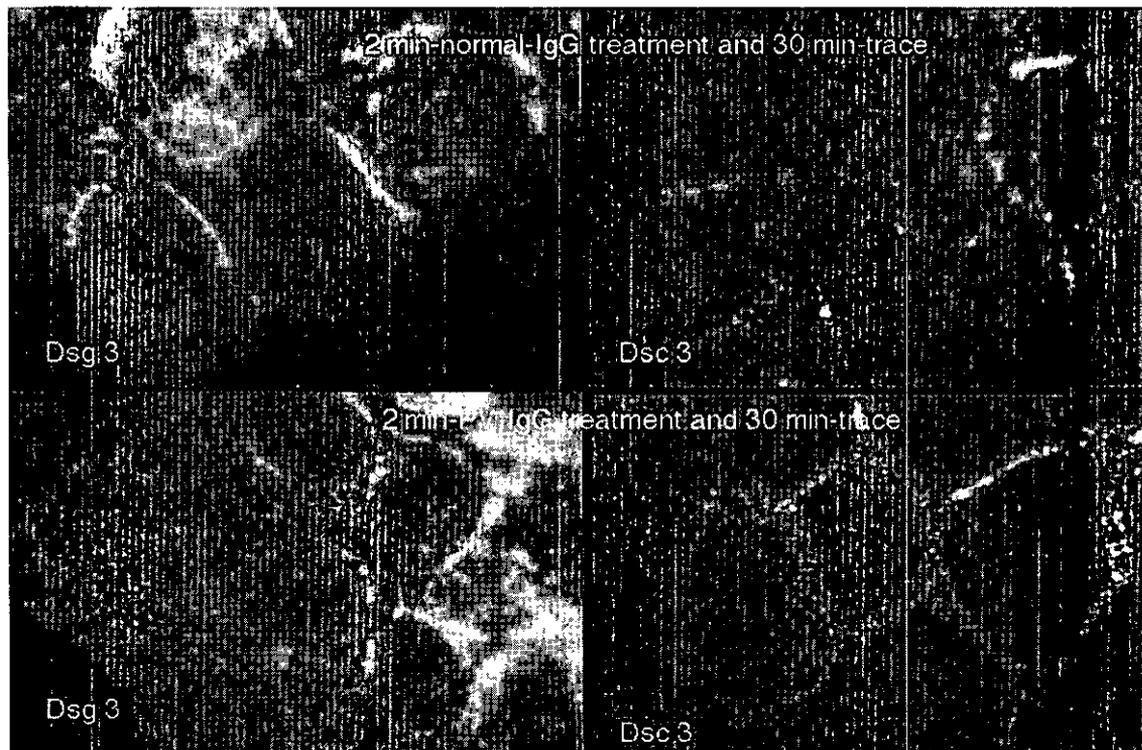


図2 尋常性天疱瘡抗体添加2分間、洗浄後30分後のデスモグレイン3 (Dsg3), デスモコリン3 (Dsc3) の分布。上段；コントロール血清処理、下段；保抗体処理。Dsg3 は細胞内に点状に取り込まれているが、Dsc3 は変化ない。

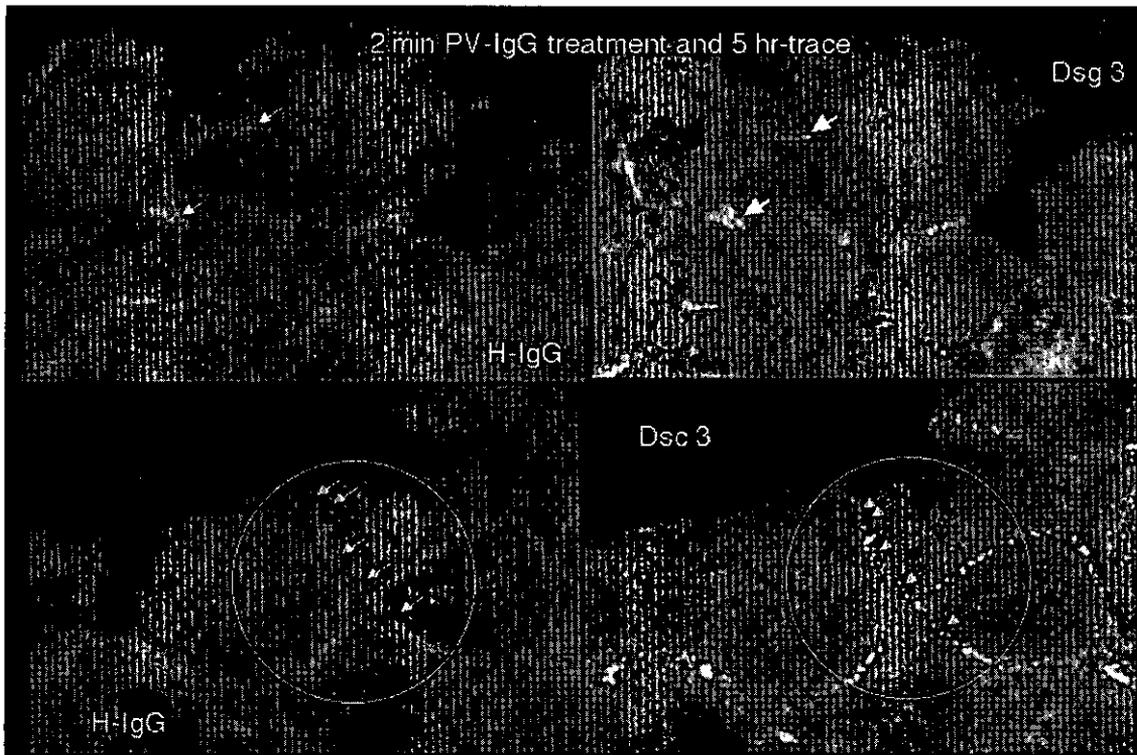


図3 尋常性天疱瘡抗体添加2分間、洗浄後5時間後のデスモグレイン3 (Dsg3), デスモコリン3 (Dsc3) の分布。左側；抗ヒト IgGローダミン (H-IgG)、右側上；抗デスモグレイン3 (Dsg3)-FITC, 右側下；抗デスモコリン3 (Dsc3)-FITC。H-IgG/Dsg3の存在しない細胞間に Dsc3 が点状に見られ、Dsg3欠損デスモソームの存在を示す。

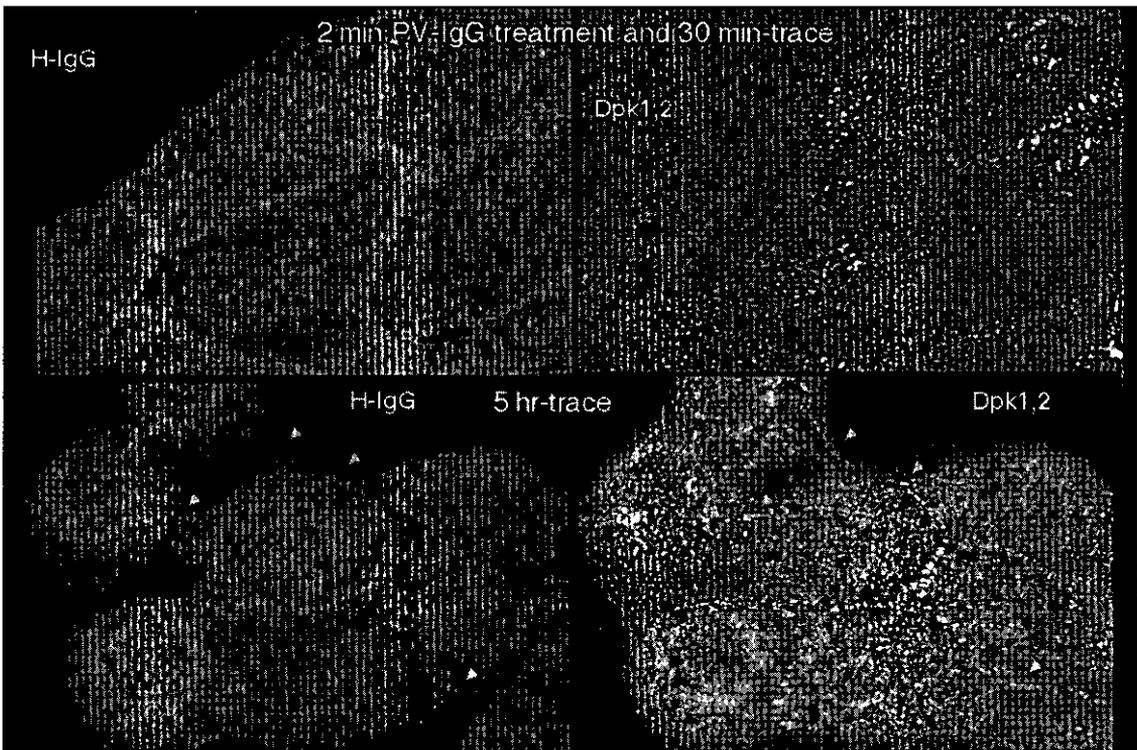


図4 尋常性天疱瘡抗体添加2分間、洗浄後5時間後のデスモプラキン (DPK), の分布。左側；抗ヒト IgGローダミン (H-IgG)、右側；DPK-FITC。H-IgGの存在しない細胞間にDPKが点状に見られ、Dsg3欠損デスモソームの存在を示す。

厚生労働科学研究費補助金（特定疾患対策研究事業）
分担研究報告書

血漿交換療法後の治療法による抗体価上昇抑制効果の検討

主任研究者 北島康雄 岐阜大学医学部免疫アレルギー内分泌講座・皮膚病態学 教授

研究要旨 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マグレイン（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り、これを用いて病勢と経過を詳細に観察し、理論的な治療法の確立に取り組んできた。治療の基本は、病因抗体自体の減量・消失と、病因抗体により惹起される水疱形成反応の抑制の2点にあると考えられる。今回は前者について抗体の除去を物理的にはかる治療としての代表である血漿交換療法に着目し、血漿交換療法後の抗体価上昇の抑制をいかに効果的にはかるかをテーマに、ELISA法による抗体価を指標として治療法を比較検討した。その中でも特に免疫グロブリン大量療法の意義について解析した。その結果、免疫グロブリン大量療法は血漿交換療法後の抗体価上昇を抑制することが明示された。しかしその効果は血清IgG値が正常値レベルに減少する時期までに限定され、抗体価の上昇は避けるためには、抗体の産生を抑制することにより抗体価の減量・消失をはかるための、免疫抑制剤の併用が必要であり、この治療法の指標として抗体価と臨床症状の両者の重要性が示唆された。

共同研究者
江崎 智香子
岐阜大学医学部皮膚科 助手

A. 研究目的

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マグレイン構成分子のデスマグレイン1（Dsg1：分子量160kDa）、Dsg3（分子量130kDa）が同定されている（総説）¹⁻³⁾。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マグレイン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法が天谷らによって開発され（我々も共同研究者としてDsg1,3-ELISA開発に関与している）^{4,5)}、これを用いて病勢と経過を詳細に観察し、治療法の論理性を高めるべく検討してきた⁶⁾。これまでに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き、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を越える症例では、稀釈倍率を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。さらに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を明らかにし、治療の基本は、病因抗体自体の減量・消失と、病因抗体により

惹起される水疱形成反応の抑制の2点にあることを示した。抗体自体の減量・消失を目的とした治療については、抗体の除去を物理的にはかる治療としての代表が血漿交換療法であり、現在普及しその効果は認識されるに至っている。しかし、抗体の絶対量を減ずることにより、急速に臨床症状の改善がみられるものの、その効果を長期に持続することは、血漿交換療法単独ではできない。すなわち、抗体の産生を抑制することにより、抗体価の減量・消失をはかる治療の併用が必要である。そこで今回は血漿交換療法を施行した症例について、ELISA法による抗体価を指標として、治療法による血漿交換療法後の抗体価上昇の抑制効果についての比較検討を試みた。

B. 研究方法

症例

血漿交換療法を施行した尋常性天疱瘡4例について、ELISA法による抗体価と臨床経過を検討し血漿交換療法後の抗体価上昇の抑制効果について、比較検討した。治療法による抗体価上昇の抑制効果の検討には、大量免疫グロブリン療法を施行した1例を用いた。

ELISAに関する方法

Dsg3 ELISA kit および Dsg1 kit (MBL, Nagoya, Japan) を用いた^{4,5)}。バキュロウイルスによって生産された組み換え Dsg1 および Dsg3 を固相化したマイクロカップに、目的に応じて反作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。

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

C. 研究結果

症例は62歳男性。初診2ヶ月前より皮膚病変が先行し発症。初診時、体幹、上肢に痂皮を伴う糜爛、紅斑が多発し、背部では癒合し、巨大な局面を形成、口腔内は硬口蓋、頬粘膜、および下口唇に糜爛を認め、疼痛を強く訴えた。検査所見では、IgEの上昇とHbA1Cの上昇がみられた。抗Dsg1抗体、抗Dsg3抗体のELISA Indexは84.3、201.4と両者とも陽性を示した。水疱部の病理組織では、基底細胞直上に裂隙形成がみられたが、一部ではそれよりも上層に裂隙が移行する像がみられた。免疫蛍光直接法では、基底層直上から全層にわたって表皮細胞間にIgGの沈着がみられた。以上の所見より、尋常性天疱瘡と診断した。

臨床症状を皮膚病変の面積を指標にした治療経過を図1, 2に示す。糖尿病の合併があったため、ステロイドを投与せず、二重膜濾過血漿交換療法 (以下DFPP) のみで治療を開始した。水疱の新生の消失と糜爛面の減少、併せてELISA値の低下を確認し、DFPP1クール目は4回で終了し、免疫グロブリンを4日間で通常量17.5gを投与した。さらに抗体産生の抑制を目的にアザチオプリンを追加して維持した。しかし、皮疹、ELISA値ともにリバウンドと考えられる悪化を起こし、再度DFPPを開始したが、糜爛面でのカテーテル刺入部確保となったため、MRSAによる敗血症となり、DFPPを1回で中止せざるを得なかった。抗生剤投与で全身状態の改善を待つ間に、第48病日より、プレドニゾロン

を1日あたり50mg投与したが、ELISA値の上昇に並行して糜爛は増加し、体幹の15%以上に至った。第64病日よりDFPP 2クール目を再開し、8回施行後、免疫抑制剤をミゾリピンに変更し、さらに即効性の抗体産生抑制を目的に免疫グロブリンの大量療法を施行した。1日あたり20g、すなわち体重1kgあたり0.4gを5日間、totalで100gを1クールとして投与した。経過中、免疫グロブリン大量療法に起因すると考えられる副作用は、自覚症状ともに特に認めなかった。免疫グロブリン大量療法により血清IgG値の急速な上昇がみられたのとは対照的に、抗Dsg抗体は低値を持続し、糜爛面も著明に改善し色素沈着を残すのみとなった。プレドニゾロンも短期間で1日あたり25mgまで減量が可能であった。

しかし、免疫グロブリン大量療法1クール目終了後、3週間経過しIgG値が正常範囲内まで低下した時期に、再び水疱の新生がみられた。免疫グロブリン大量療法単独で2クール目を追加し、免疫抑制剤をミゾリピンからミコフェノール酸モフェチルに変更した。免疫グロブリン大量療法単独で行った2クール目は、効果乏しく皮膚病変の再燃と抗Dsg3抗体価の上昇がみられ、3クール目は再度DFPP終了直後に併用した。その後の経過は経過良好であったが、肝機能障害によりアザチオプリン中止後約2週間で抗体価の上昇、皮疹が再燃、現在DFPPと免疫グロブリン大量療法4クール目を施行中である。

当初粘膜皮膚型の臨床症状であったが、途中より口腔粘膜病変は消失し、皮膚のみに症状が残った。一方、抗体価はほぼ全経過を通してむしろ粘膜病変に影響する抗Dsg3抗体が高値で、抗Dsg3抗体は途中より陰性化した。抗Dsg3抗体の推移に皮膚病変のみが並行した(図3)。

3回のDFPPの各クールについて、最終日をday0の基準としてその後の抗体価の上昇を比較した(図4)。左側には

DFPP中の治療、右側にはDFPP後の治療を示した。1回目ではステロイドを投与せず、初めは通常量の免疫グロブリンと免疫抑制剤アザチオプリンのみで効果をみた。抗体価の上昇を抑制できなかった。2回目、3回目では抗体産生抑制を期待し、免疫グロブリン大量療法を施行した。1回目と比較すると明らかに、2回目、3回目はDFPP後の抗体価の上昇が抑制されていることが示された。しかし、その効果は持続せず、血清IgG値が正常値レベルに減少する時期に、抗体価の上昇は避けられなかった。

D. 考察

血漿交換療法を施行した症例について、ELISA法による抗体価を指標として、治療法による血漿交換療法後の抗体価上昇の抑制効果を検討した。DFPPの各クールの最終日をday0の基準として、治療法、特に免疫グロブリン大量療法の効果を比較検討した。ステロイドを投与せず通常量の免疫グロブリンと免疫抑制剤の併用のみでの効果をみた1回目では、抗体価の上昇を抑制できなかった。抗体産生抑制を期待し免疫グロブリン大量療法を施行した2回目、3回目では1回目と比較すると明らかに、DFPP後の抗体価の上昇が抑制されていることが示された。しかし、その効果は持続せず、血清IgG値が正常値レベルに減少した時期に、抗体価の上昇は避けられなかった。これらの経過より、やはり、抗体の産生を抑制することにより抗体価の減量・消失をはかる治療である、免疫抑制剤の併用が必要であると考えられた。免疫抑制剤については、アザチオプリン、ミゾリピン、ミコフェノール酸モフェチルを使用しているが、この症例ではミコフェノール酸モフェチルの効果は弱かったという印象である。本症例は当初は粘膜皮膚型の臨床症状であったが、途中より口腔粘膜病変は消失し、皮膚のみに症状が残り、一方、抗体価はほぼ

全経過を通してむしろ粘膜病変に影響する抗 Dsg3 抗体が高値で、抗 Dsg1 抗体は途中より陰性化したという、抗 Dsg3 抗体の推移に皮膚病変のみが並行した、抗体価と臨床症状の推移の観点からも、極めて興味深い経過を示した症例でもある。さらに治療効果を判定していく上での指標として、ELISA 法抗体価と並ぶもう 1 つの指標である臨床症状の観点からみると、本症例は抗体価の上昇がそれほどではない時期に臨床症状の悪化がみられたり、また逆に、抗体価の上昇にもかかわらず臨床症状が比較的落ち着いていた時期がみられた。これらは、同じ ELISA 法で検出される抗体ではあるものの、その病原性に差のある抗体の存在に起因する可能性が示唆された。このことから、治療の指標には、抗体価と臨床症状の両者が必要であり、また治療には、抗体産生を抑制することを目的としたものと、抗体に惹起される反応の抑制を目的とした両者の併用がやはり必要であると考えられた。

免疫グロブリン投与については、今回の症例においては、血漿交換後に、免疫グロブリン投与を通常量投与方法と大量投与方法で行っている。その効果を比較検討すると、プレドニゾン、免疫抑制剤の併用による、条件の差の影響を除外して単純に論じるわけにはいかないが、通常量投与時は血清 IgG 値の上昇が軽度で、抗 Dsg 抗体価の増加を抑制できなかったのに対し、大量療法時では血清 IgG 値の急速な上昇がみられるのとは対照的に抗 Dsg 抗体は低値を持続でき、大量療法の効果が確認された。

免疫グロブリン大量療法は1985年に類天疱瘡で使用されて以来、他の自己免疫性水疱症でも使用され、その有効性が報告されている。用量は1クールにつき体重あたり2gで、約3～4週ごとに繰り返す報告が多く、自験例も1日体重あたり0.4kgに分割し、1日20gを5日間投与した。作用機序については、Fc受容体の阻害、補体系

の不活化、サイトカインを介するリンパ球活性化の阻害、Fas 抗原を介したリンパ球アポトーシスの誘導、IgG 分解亢進による病因抗体の減少などが推察されているが、未だ詳細は不明である。今回の自験例からは免疫グロブリンの産生能の抑制が主な作用であると推察している。副作用は血液製剤としての感染症の問題以外に、頭痛、発熱、塞栓症や溶血、腎不全などいわれているが、頻度は低く、重篤なものも少ないようである。文献的な統計でも80%以上の症例で有効性が報告されていることより試みてもよい治療法ではあるが、最大の問題点はやはり、高額な費用を要するという点で、多くの症例で積極的に行うというのは困難であるのが現状であろう。免疫グロブリン大量療法単独でも有効とする報告⁷⁾もあるが、効果発現に平均4.5クールを必要とすることは、費用の面からも免疫抑制剤の併用は必要であり、一方免疫グロブリン大量療法を併用することにより免疫抑制剤やステロイド剤の累積投与量を減じ、致死的な合併症を回避する意義から考えれば、お互いの治療法のデメリットを補うもので、今後の治療法として、期待されるべきである。最近では後天性表皮水疱症などでこれまでの10分の1の低容量の免疫グロブリン療法が有効であったという報告もあり、今後用量の検討も含め、症例の蓄積がもたらされる治療法であると考えられた。

E. 結論

今回は血漿交換療法を施行した症例について、ELISA 法による抗体価を指標として、治療法による血漿交換療法後の抗体価上昇の抑制効果を詳細に解析した結果、免疫グロブリン大量療法は血漿交換療法後の抗体価上昇を抑制することが明示された。しかしその効果は血清 IgG 値が正常値レベルに減少する時期までに限定され、抗体価の上昇は避けるためには、抗体の産生を抑制することにより抗体価の減量・消失を

はかるために、免疫抑制剤の併用が必要であり、治療の指標として抗体価と臨床症状の両者の重要性が示唆された。

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, 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, 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 auto-antibodies in pemphigus using antigen-specific ELISAs with baculovirus expressed recombinant desmogleins. **J Immunol** 159:2010, 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
7. A. Razzaque Ahmed:Intravenous immunoglobulin therapy in the treatment of patients with pemphigus vulgaris unresponsive to conventional immunosuppressive treatment. **J Am Acad Dermatol** 45:679-690, 2001

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表 (平成14年度)

1. 論文発表

英語論文

1. Gu LH, Ichiki Y, Sato M, Kitajima Y. A novel nonsense mutation at E106 of the 2B rod domain of keratin 14 cases dominant epidermolysis bullosa simplex. **J Dermatol** 29: 136-145, 2002
2. Gu LH, Ichiki Y, Kitajima Y. A aberrant expression of p16 and RB protein in eccrine porocarcinoma. **J Cutan Pathol** 29: 473-479, 2002
3. Kitajima Y. Mechanisms of desmosome assembly and disassembly. **Clin Exp Dermatol** 27: 684-690, 2002
4. Nguyen VT, Arredondo J, Chernyavsky AI, Kitajima Y, Grando SA. Keratinocyte acetylcholine receptors regulate cell adhesion. **Life Sciences** 72: 2081-2085, 2003
5. Kitajima Y. Current and prospective understanding of clinical classification, pathomechanisms and therapy in pemphigus. **Arch Dermatol**

Res : in press

6. 北島康雄. 水疱症自己抗体とシグナル伝達. 現代医療34: 1111-1117, 2002
7. 北島康雄. 先天性表皮水疱症. 小児科診療: in press
8. 北島康雄. 角化過程におけるケラチノサイトの上方移行・Positioning Differentiationと細胞間接着制御とその異常. 第17回角化症研究会記録集: in press

2. 日本語著書

1. 北島康雄. 魚鱗癬. 亀山正邦, 高久史磨編. 今日の治療指針第5版 東京: 医学書院; 1439-1440, 2002
2. 北島康雄. レチノイド. 斎田俊明, 塩原哲夫, 宮地良樹, 渡辺晋一編. 今日の皮膚疾患治療指針第3版 東京: 医学書院; 203-204, 2002
3. 北島康雄. 掌蹠膿疱症. 新村真人, 瀧川雅浩編. 皮膚疾患最新の治療2001-2002 東京: 南江堂; 105-106, 2002
4. 北島康雄. 単純型表皮水疱症. 玉置邦彦編. 最新皮膚科学大系6 水疱症 膿疱症 東京: 中山書店; 166, 2002
5. 北島康雄. 角層下膿疱症. 新村真人, 瀧川雅浩編. 皮膚疾患最新の治療2003-2004 東京: 南江堂; in press, 2003
6. 北島康雄. 炎症のない角化性病変. 岩月啓氏, 宮地良樹編. カラーアトラス皮膚を診ると全身が見える 東京: 診断と治療社; in press, 2003
7. 北島康雄. 角化の生化学・分子生物学. 図解・皮膚科学テキスト2 皮膚の生物学 東京: 中外医学社; in press, 2003

2. 学会発表

1. Grando SA, Arredondo J, Chernyavsky A, Kitajima Y, Nguyen VT. Mechanisms of pharmacologic regulation of

keratinocyte adhesion by cholinergic drugs. 63rd Annual Meeting of the Society for Investigative Dermatology, 2002

2. Nguyen VT, Arredondo J, Chernyavsky A, Pittelkow MR, Kitajima Y, Grando SA. Pemphigus vulgaris IgG and a corticosteroid exhibit reciprocal effects on keratinocyte adhesion molecules. 63rd Annual Meeting of the Society for Investigative Dermatology, 2002
3. Kitajima Y. Relationship between dermatology and industry. The 20th World Congress of Dermatology: Congress Mondial Dermatologie Paris, 2002
4. Kitajima Y. Mechanisms of desmosome assembly and disassembly. International Meeting on Bullous Diseases, 2002
5. Ichiki Y, Gu LH, Kim SC, Park J, Sato M, Kitajima Y. A novel mutation, frameshift and delayed stop codon, in tail domain of keratin 5 causes a novel type of epidermolysis bullosa simplex with migratory circinate erythema. International Meeting on Bullous Diseases, 2002
6. Nagai-Sato M, Yamamoto Y, Kitajima Y. Binding of bullous pemphigoid autoantibodies to BPAG2 causes internalization of α 6-integrin in cultured keratinocytes. 4th Joint Meeting of the Society for Cutaneous Ultrastructure Research and the Japanese Society for Ultrastructural Cutaneous Biology, 2002
7. 北島康雄. シグナル伝達異常と細胞接

着障害. 第92回日本麻酔科学会東海地方会, 2002

8. 市來善郎, 江崎智香子, 和泉智子, 北島康雄. 水疱症: ELISA 値を参考にして—自己免疫疾患の治療指針—. 第53回日本皮膚科学会中部支部学会, 2002

H. 知的所有権の出願・登録状況 (予定を含む)

なし

図とその説明

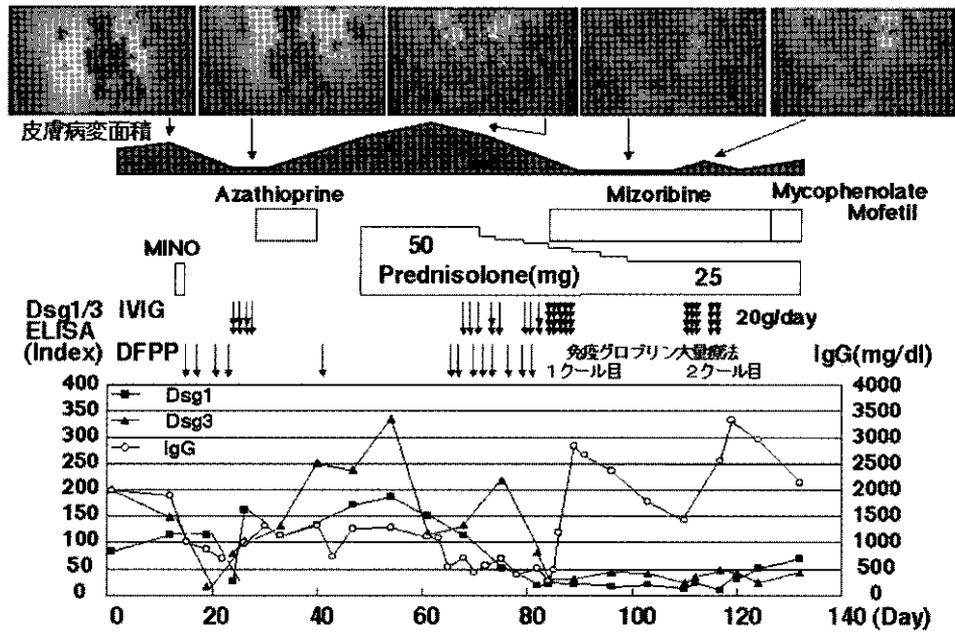


図1 治療および経過（前半）

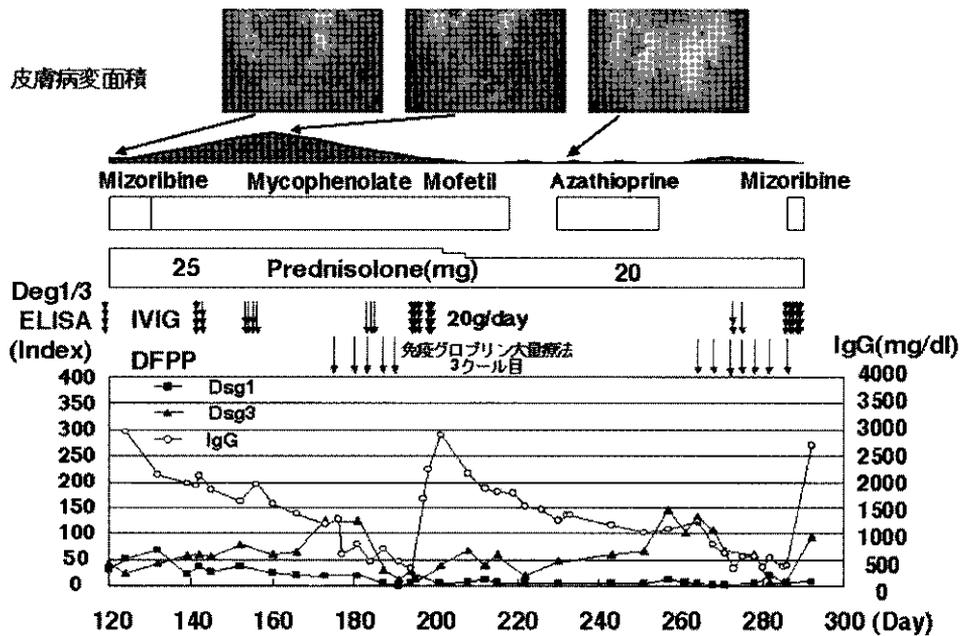


図2 治療および経過（後半）

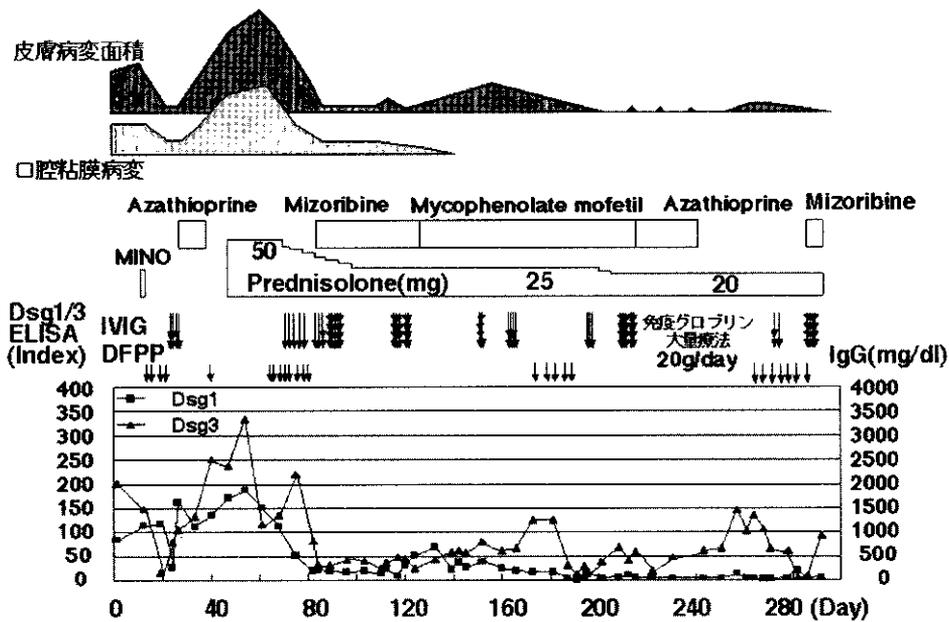


図3 治療および経過。当初は粘膜皮膚型の臨床症状であったが、途中より口腔粘膜病変は消失し、皮膚病変のみが残った。一方、抗体価はほぼ全経過を通して粘膜病変に影響する抗 Dsg3 抗体が高値で、抗 Dsg1 抗体は途中より陰性化した。

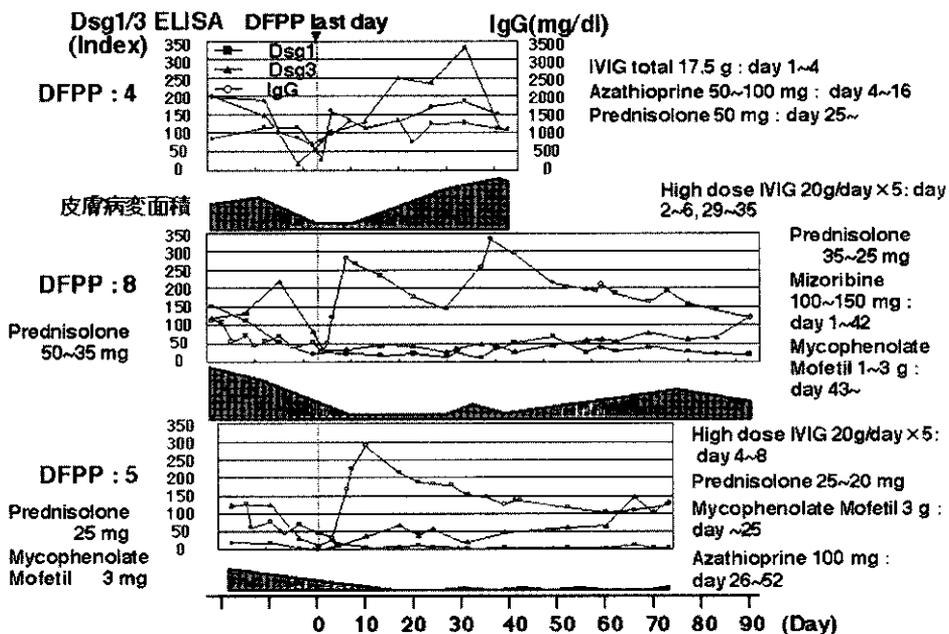


図4 血漿交換療法後の抗体価上昇の比較。DFPP の各クールについて、最終日を day 0 の基準とした抗体価の推移を比較した。左側には DFPP 中の治療を、右側には DFPP 後の治療を示した。←：免疫グロブリン大量療法により抗体価の上昇が抑制されている。

厚生労働科学研究費補助金(特定疾患対策研究事業)
分担研究報告書

重症度分類診断基準を用いた膿疱性乾癬患者の重症度階層化の試み

分担研究者 岩月啓氏 岡山大学大学院医歯学総合研究科
皮膚・粘膜・結合織学分野 教授

研究要旨 膿疱性乾癬は、急激な発熱とともに、全身皮膚の潮紅と無菌性膿疱の多発を認める原因不明の疾患である。これに対する治療としてはエトレチナート全身投与が第一選択で高い有効性が報告されているが、その病像は多彩であり、治療の有効性の判定やより適切な治療のために、個々の症例について重症度を客観的に評価する方法が必要と考えられている。これまでの調査研究班の成果として重症度分類診断基準が提案されているがこの基準となった標本数が小さいため、今回我々は、この重症度分類診断基準に準じた場合、過去の膿疱性乾癬患者がどのような頻度分布をとるのかを検討した。まず、前回の全国調査のデータをもとに重症度分類診断基準の項目を満たす症例を抽出した。次に皮膚症状である紅斑、膿疱の程度を独自の方法で評価した方法を第1の方法とし、紅斑および膿疱を形成する面積を推定値として、重症度分類診断基準にあてはめた方法でスコア化する方法を第2の方法とした。これら2つの方法で症例の得点分布を調べた。登録された330症例のうち抽出できた症例は118例であった。第1の方法では、最高スコアを21点とした場合、(0-6点)；34例(28.8%)、(7-14点)；67例(56.8%)、(15-21点)；17例(14.4%)のような得点分布が得られた。第2の方法で重症度分類基準にあてはめた場合、軽症(0-2点)；21例(17.8%)、中等症(3-6点)；79例(66.9%)、重症(7-10点)；18例(15.3%)の得点分布を得た。これら両方法においては、欠落している項目を推定値で置き換え、また皮膚症状の程度も推定により評価しているため、実際の重症度分類診断基準との得点とは異なるが、スコア化によって膿疱性乾癬患者を大まかに階層化することは可能と考えられた。ただ、現時点での重症度、治療後の重症度を把握することはできないため、汎発性膿疱性乾癬治療ガイドラインの内容を反映した改訂調査票で全国調査の必要があると思われた。

研究協力者

小澤 明 東海大学医学部医学科感覚系
皮膚科学部門 教授

共同研究者

梅澤慶紀 東海大学医学部医学科感覚系
皮膚科学部門 講師

松浦浩徳 岡山大学医学部附属病院
皮膚科助手

大藤玲子 岡山大学医学部附属病院
皮膚科医員

全身皮膚の潮紅と無菌性膿疱の多発を認める原因不明の疾患である。治療としてはエトレチナートの全身投与が第一選択で高い有効性を示すが、繰り返し膿疱を形成する症例、尋常性乾癬に移行する症例や、稀に死亡例も報告されているように、本疾患の病像は個々の症例により多彩であり、治療の有効性を判定し、またより適切な治療のために個々の症例について重症度を客観的に評価する方法が必要と考えられている。膿疱性乾癬に関する全国疫学調査はこれまでに二回実施され、診断基準、重症度判定基準、治療指針として汎発性膿疱性乾癬治療ガイドラインの作成につながり、成果を

A. 研究目的

膿疱性乾癬は、急激な発熱とともに、全

げている。今回、汎発性膿疱性乾癬治療ガイドライン中の重症度分類診断基準に準じた場合、過去の膿疱性乾癬患者がどのような頻度分布をとるのか検討した。

B. 研究方法

前回の個人調査票のデータをもとに重症度分類診断基準の項目を満たす118症例を抽出し解析の対象とした。個人調査票の中で38度以上の発熱はすべて重症度分類のスコア1に含めた。個人調査票の中では血清アルブミン値が欠落していたため、血清蛋白値の6割をその推測値として用いた。赤沈、白血球数、血清Ca値はそのまま重症度分類診断基準のスコアにあてはめた。次に皮膚症状の評価を行ったが、個人調査票の中では紅斑および膿疱形成の項目は、頭頸部、四肢、体幹、間擦部、掌蹠、指趾の6部位の部位別による症状の有無で調査されていたため、面積で評価する重症度分類診断基準に直接当てはめることはできなかった。これを補うために、以下の2つの方法を用いた。第1の方法として、その記載に準じ部位別症状の有無をそれぞれスコア1および0として算出した（最高点12点）。これに重症度診断基準の膿海および粘膜のスコアを加え皮膚症状を最高点14点としその他の項目を最高点7点（合計の最高得点21点）として解析した。

次に第2の方法として、皮膚症状をより重症度分類基準に近い方法であてはめて評価した。すなわち、個人調査票の中の紅斑および膿疱形成について、体幹+四肢、あるいは体幹+四肢+その他の部位（頭頸部、間擦部、掌蹠、指趾を含む）を重症度判定基準の“ほぼ全身におよぶ”とし、体幹ないしは四肢、あるいは体幹+その他の部位、四肢+その他の部位を“体表面積の50%前後”に、その他の部位のみに認めるものを“一部の皮膚”に相当すると考えてスコア化した。

C. 研究結果

330症例のうち抽出できた症例は118例であった。第1の方法により解析した結果、スコア（0-6点）；34例（28.8%）、（7-14点）；67例（56.8%）、（15-21点）；17例（14.4%）のように分布した（図1）。第2の方法では重症度分類診断基準にあてはめて、軽症（0-2点）；21例（17.8%）、中等症（3-6点）；79例（66.9%）、重症（7-10点）；18例（15.3%）のような得点分布を得た（図2）。

D. 考察

過去の膿疱性乾癬患者を重症度診断基準に準じてあてはめた場合にどのような分布をとるのかを2つの方法により検討した。第1の方法では、（7-14点）を中等症と仮定すると、症例の56.8%が分布した。第2の方法では中等症である（3-6点）に症例の66.9%が分布しており、いずれの方法においても大半の症例は中等症に該当しているといえる。両方法は欠落している項目を推定値で置き換えており、皮膚症状の程度も推定により評価しているため、実際の重症度分類診断基準との得点は異なる。また、皮膚の症状を過大評価しやすいと思われるが、スコア化によって大まかに症例を階層化することは可能と考えられた。ただ、真の重症度を初診時の全身症状で評価するのか、治療に対する反応性で評価するのか、予後で評価するのか結論はまだ出ていない。さらに現時点での重症度、治療後の重症度を把握することはできないため、的確な重症度分類のためには、汎発性膿疱性乾癬治療ガイドラインの内容を反映した改訂調査票で再度全国調査の必要があると思われる。

E. 結論

前回の個人調査票のデータをもとに重症度分類診断基準を用いて膿疱性乾癬患者の重症度階層化を試みた。発熱、赤沈、白血