

現型が出現した個体に関して ELISA を行い、抗 Dsg3 抗体産生を確認した。

PV モデルマウスの抗体価の推移は移植 2 週間後にピークを認めるため、その際に表現型が重症な固体では死亡するケースが多く、発症後すぐの治療投与で MR1 の効果を検討するのは困難である。したがって表現型が出現してからさらに一週間の観察期間をもうけ、病勢が激しく重症なために死亡する個体は投与の対象から除外し、症状および抗体産生が安定した PV モデルマウスを選別した。選別した PV モデルマウスに対して、1 mg の MR1 あるいは Hamster IgG を週 2 回計 12 回投与した。各群のマウスは MR1 投与開始後 56 日まで観察し、血中抗体価および表現型の変化によって MR1 の治療効果を検討した。

C. 研究結果

1. 抗 CD40L 抗体予防的投与

各群のマウスにおいて、血中抗 Dsg3 抗体産生を ELISA 法により確認した。免疫した脾細胞を移植した場合、レシピエントマウスにおいては通常 2 週間で明らかな抗 Dsg3 抗体産生および体重減少などの表現型が認められる。Hamster IgG を投与したコントロールマウスにおいては移植後 14 日目において明らかな抗 Dsg3 抗体産生が認められ、これらのマウスではその後も観察期間を通じて持続的な抗体産生が認められた。対照的に MR1 を投与した全てのマウスにおいて、抗 Dsg3 抗体産生は著明に抑制された。さらに MR1 投与による抗体産生抑制は、投与終了後から 2 ヶ月経過しても維持されていた (図 1 a)。PV モデルマウスにおいては口腔内びらんによる摂食障害から、抗 Dsg3 抗体産生とともに体重減少が認められるのが特徴である。コントロールマウスにおいては、移植後 14 日から明らかな体重減少が認められたが、MR1 を投与したマウスにおいては、体重減少は全く認められず、観察期間を通じて

正常な体重増加が観察された (図 1 b)。移植後 28 日で行った DIF で *in vivo* における IgG 沈着を評価したところ、コントロールマウスではケラチノサイト表面への著明な IgG 沈着が認められたのに対し、MR1 投与マウスにおいては明らかな IgG 沈着は認められなかった (図 2 a、b)。また、コントロールマウスにおいては、病理組織学的に PV モデルマウスに特徴的な粘膜上皮における基底層直上での水疱形成が認められたのに対し、MR1 投与マウスにおいては明らかな水疱形成は認めなかった (図 2 c、d)。また、コントロールマウスでは、移植後 14 日から PV モデルマウスに特徴的な休止期脱毛、口周囲のびらん、痂皮形成および体重減少などの表現型が明らかに認められたのに対し、MR1 投与マウスにおいてはこれらの表現型は観察期間を通じて全く認めなかった (図 2 e)。移植後 28 日において、脾臓、骨髄およびリンパ節から単核球を分離し、ELISPOT 法を行った。コントロールマウスにおいて、単核球 105 個あたり脾臓で 157.3 ± 21.3 個、リンパ節で 63.1 ± 12.9 個および骨髄で 9.2 ± 4.0 個の抗 Dsg3 抗体産生 B 細胞が検出されたのに対し、MR1 投与マウスにおいて抗 Dsg3 抗体産生 B 細胞はどの臓器においてもほとんど検出されなかった。

2. 抗 CD40L 抗体治療的投与

免疫した脾細胞を移植後、抗 Dsg3 抗体産生および明らかな PV の表現型を示した PV モデルマウスに MR1 (n=11) と Hamster IgG (n=8) を 1 mg ずつ週 2 回計 12 回投与した。投与開始後 2 週間ごとに採血および表現型の観察を行った。血中抗 Dsg3 抗体価は、MR1 投与群および Hamster IgG 投与群の両群において投与開始から減少傾向が認められ、両群において有意差は認められなかった (図 3 a)。PV 表現型の推移を PV スコアによって検討した。Hamster IgG 投与群においては、投与期

間を通じて著明な改善は認めず、MR1 投与群においては、投与開始後42日に PV スコア値の低下が認められたが、コントロール群との間に有意差は認めなかった (図 3 b)。

D. 考察

MR1 は、抗原提示が行われる時点で T 細胞上の CD40L に結合して、機能を阻害することから、予防投与では著明に抗体産生を抑制する効果が認められた。しかし、今回の結果から、一度抗原刺激による抗体産生が開始した時点での治療投与では著明な効果は認められなかった。MR1 は、CD40/CD40L 相互作用を阻害することで B 細胞のプラズマ細胞への分化を阻害し、抗体産生を抑制する。一度プラズマ細胞に分化すると、その後の抗体産生には CD40/CD40L 相互作用は不要であり、MR1 の効果は期待できない。そのために高い抗 Dsg3 抗体産生を示す PV モデルマウスにおいて治療効果が認められなかったのではないかと考えられた。骨髄に存在するプラズマ細胞には long-lived のものがあり、抗原刺激なしに長期間抗体産生を維持している可能性を最近指摘されてきている。PV モデルマウスにおいてもこのような長期間抗体産生を維持するプラズマ細胞が存在するために、MR1 の長期投与によっても著明な効果が認められなかった可能性が示唆された。したがって、抗 CD40L 抗体は寛解期からの再発を抑制する効果が期待できるのではないかと考えられた。

E. 結論

PV モデルマウスに対する CD40/CD40L 相互作用の阻害による治療的投与において著明な抗体産生抑制効果は認められなかった。しかし、予防投与の結果から T-B 相互作用阻害による抗体産生抑制効果は著明であること、MR1 投与群において抗体価が投与前よりも低く推移し、一部では表現

型の改善が認められたことから、CD40-CD40L 相互作用阻害による治療法は、病初期に投与することにより、その効果を期待できる可能性が示唆された。また、天疱瘡モデルマウスは、CD40L 抗体療法の効果の評価に有用であった。

F. 研究発表 (平成16年度)

1. 論文発表

1. Hanakawa Y, Schechter NM, Lin C, Nishifuji K, Amagai M, and Stanley JR. Enzymatic and molecular characteristics of the efficiency and specificity of exfoliative toxin cleavage of desmoglein 1. **J Biol Chem** 279:5268-5277, 2004.
2. Shimizu A, Ishiko A, Ota T, Tsunoda K, Amagai M, and Nishikawa T. IgG binds to desmoglein 3 in desmosomes and causes a desmosomal split without keratin retraction in a pemphigus mouse model. **J Invest Dermatol** 122:1145-1153, 2004.
3. Aoki-Ota M, Tsunoda K, Ota T, Iwasaki T, Koyasu S, Amagai M, and Nishikawa T. A mouse model of pemphigus vulgaris by adoptive transfer of naive splenocytes from desmoglein 3 knockout mice. **Br J Dermatol** 151:346-354, 2004.
4. Payne AS, Hanakawa Y, Amagai M, and Stanley JR. Desmosomes and diseases: Pemphigus and bullous impetigo. **Curr Opin Cell Biol** 16:536-543, 2004.
5. Ota T, Aoki-Ota M, Tsunoda K, Simoda K, Nishikawa T, Amagai M, and Koyasu S. Auto-reactive B cells against peripheral antigen, desmoglein 3, escape from tolerance mechanism. **Int Immunol**

- 16:1487-1495, 2004.
6. Anzai H, Fujii Y, Nishifuji K, Aoki-Ota M, Ota T, Amagai M, and Nishikawa T. Conformational epitope mapping of antibodies against desmoglein 3 in experimental murine pemphigus vulgaris. **J Dermatol Sci** 35:133-142, 2004.
 7. Hisamatsu Y, Amagai M, Garrod DR, Kanzaki T, and Hashimoto T. The detection of IgG and IgA autoantibodies to desmocollins 1-3 by enzyme-linked immunosorbent assays using baculovirus-expressed proteins, in atypical pemphigus but not in typical pemphigus. **Br J Dermatol** 151:73-83, 2004.
 8. Nagasaka T, Nishifuji K, Ota T, Whittock NV, and Amagai M. Defining the pathogenic involvement of desmoglein 4 in pemphigus and staphylococcal scalded skin syndrome. **J Clin Invest** 114:1484-1492, 2004.

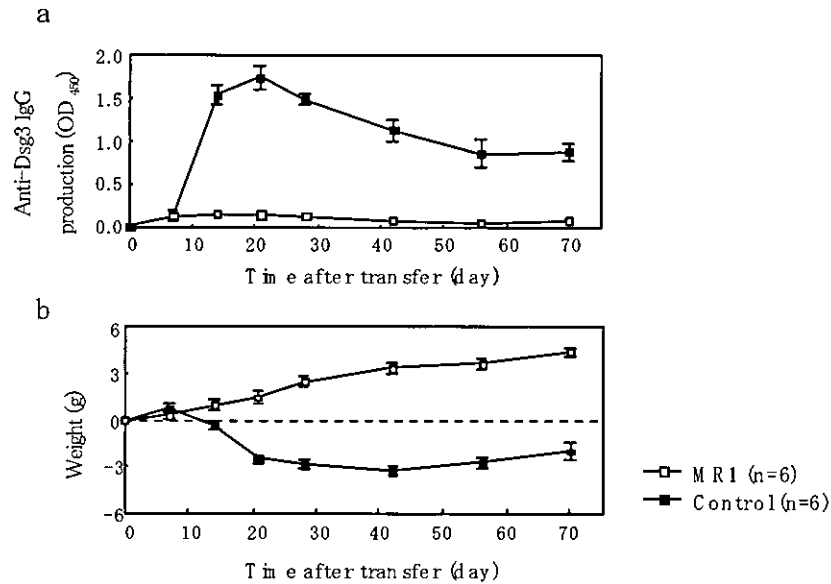


図1. MR1 予防投与による抗Dsg3 抗体産生の抑制

(a)コントロール群(■、n=6)においては移植後14日には明らかな抗Dsg3抗体産生を認めましたが、MR1群(□、n=6)では移植後70日においても抗Dsg3抗体産生は著明に抑制された。(b)コントロール群では体重減少が認められたが、MR1投与群では体重減少は全く認められなかった。

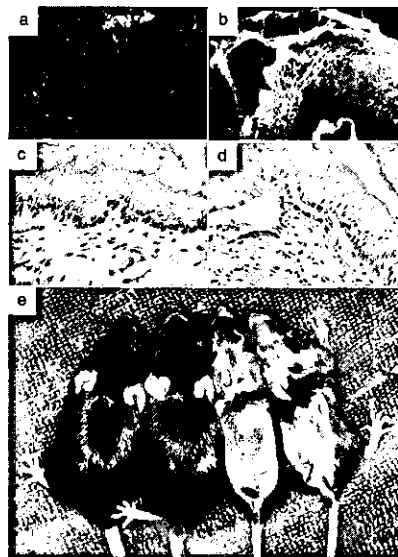


図2. MR1 予防投与によるPV 表現型出現の抑制

コントロールにおいては、移植後28日においてケラチノサイト表面へのIgG沈着を認め(口蓋;b)、病理組織学的に基底層直上での棘融解を認めた(口蓋;d)が、MR1投与マウスにおいて明らかなIgGの沈着および水疱形成は認めなかった(口蓋;a、c)。コントロールマウスにおいては、PVモデルマウスに特徴的な体重減少および休止期脱毛などの表現型が認められた(e、右)が、MR1投与マウスではこれらの表現型は移植後65日においても認められなかった(e、左)。

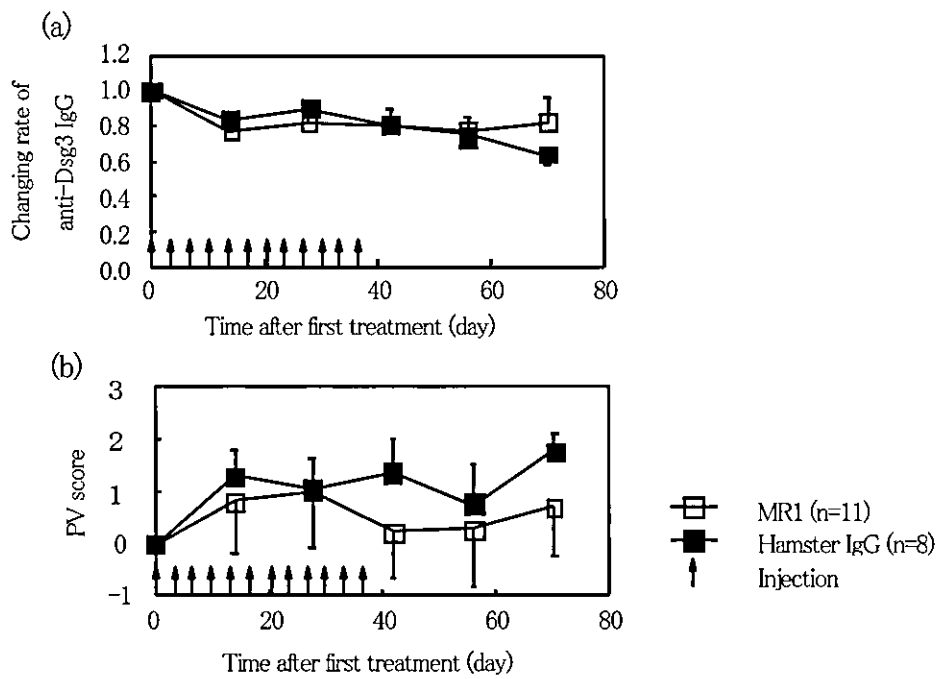


図3. 免疫した脾細胞を移植したPVモデルマウスにおけるMR1治療投与効果
 (a) MR1投与による抗Dsg3抗体産生抑制効果はコントロール群(■、n=8)およびMR1群(□、n=11)の両群において認めなかった。(b)MR1投与開始後42日においてMR1投与群ではPVスコア値の低下が認められたが、コントロール群との間に有意差は認めなかった。

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
分担研究報告書

天疱瘡モデルマウスを用いた免疫抑制療法の評価Ⅱ

分担研究者 天谷雅行 慶應義塾大学医学部皮膚科学 講師

研究要旨 Pemphigus vulgaris (PV) の治療は、各施設の経験に依存しているところが大きく、客観的な治療評価系の確立が望まれている。PV モデルマウスは、デスマグレイン 3(Dsg3) に対する自己抗体の産生が 6 カ月以上に渡って持続的に認められ、PV に特徴的な病理所見を有する水疱、びらんを形成する。本研究では、現在ヒト PV の治療に用いられている薬剤の効果を PV モデルマウスを用いて評価した。薬剤は、dexamethasone (DEX)、methylprednisolone (m-PSL)、azathioprine (AZP)、cyclophosphamide (CPA)、cyclosporine A (CYA)、tacrolimus hydrate (FK506) and mycophenolate mofetil (MMF) の 7 種類を選択した。検討した薬剤の中では、CPA は最も強い抗体産生抑制効果を認め、また他薬剤も有意な抑制効果を認めた。天疱瘡モデルマウスは、種々の免疫抑制療法の前臨床試験として、有用な評価系を提供する。

共同研究者

高江雄二郎 慶應義塾大学医学部助手

西川武二 慶應義塾大学医学部教授

A. 研究目的

本研究の目的は、PVモデルマウスを用いてヒトPVの治療に用いられている種々の薬剤の治療効果を評価することにある。

B. 研究方法

a) PVモデルマウスの作成

Dsg3^{-/-} マウスを、10 μ g の精製したマウス rDsg3 蛋白を含む complete Freund's adjuvant にて免疫した。その 1 週後、同量の抗原蛋白をふくむ incomplete Freund's adjuvant にて免疫し、これを 2 回行い、その後、抗原蛋白のみにて 2 回免疫を行った。抗 mDsg3 抗体産生の確認は、マウスケラチノサイトである PAM212cell を用いた Living keratinocyte staining で行った。抗原産生の確認後、Dsg3^{-/-} マウスの脾細胞を 1 匹あたり 1.5x10⁷ 個、Rag2^{-/-} マウスに経静脈的に移植した。

モデルマウスの発症の確認は、臨床症状

すなわちびらん・脱毛の出現と体重減少、および rDsg3 蛋白を抗原として用いた enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) による抗 mDsg3 に対する抗体価にて行った。

b) 投薬

使用薬剤は、dexamethasone (DEX)、methylprednisolone (m-PSL)、azathioprine (AZP)、cyclophosphamide (CPA)、cyclosporine A (CYA)、tacrolimus hydrate (FK506) and mycophenolate mofetil (MMF) の計 7 種類を用いた。投与は脾細胞移植の 2 日前から始め、投与経路は DEX、m-PSL、CPA、CYA、FK 506 は腹腔内投与で、AZP、MMF は経口投与とした。投与量は以下の通りに行った。

- DEX : 10mg/kg/日
- m-PSL : 100mg/kg/日
- AZP : 30mg/kg/日
- CPA : 40mg/kg/週 3 日
- CYA : 40mg/kg/日
- FK506 : 5mg/kg/日

・MMF：80mg/kg/日

薬剤投与は基本的に28日までとし、投与中止後更に28日観察を行った。コントロール群への投薬は、腹腔内投与薬剤（DEX、mPSL、CPA、CYA、FK506）を投与した群はPBSを等量投与し、AZP投与した群は等量の0.5%CMC-Na溶液、MMFを投与した群は等量の蒸留水を経口投与した。ただし、口腔内びらんに伴う摂食不良からくる衰弱による死亡が見られるため、マウスが経過中に死亡した場合は、死亡時の体重と抗体価がその後持続していたと仮定し、データに組み入れた。

c) 効果判定

投薬開始より、週1回の採血と週2回の臨床症状の観察、即ち、びらんおよび脱毛の局在のスケッチと体重測定、デジタルカメラでの背部からの全体像と顔面側方2方向と下顎1方向の写真の記録を行った。

C. 研究結果

a) DEX 投与群

ELISA scoreは対照群に比して低値を示し、また体重減少も軽度であり、抑制効果を認めるが、表現型に明かな差は認めなかった。

b) CPA

CPA投与群のELISAの結果および体重減少のグラフ、表現型の写真をそれぞれ図1-3に示す。CPAの投与は脾細胞移植後35日目まで行ったが、薬物投与中は、ELISA scoreは有意差をもって完全に抑制され、また体重減少も認めず表現型の出現も認められなかった。

CPA投与中止後およそ2週間後に、CPA投与群はELISA scoreの上昇と体重減少を認め、また表現型の出現も認められた。

以上、同様に他、m-PSL、AZP、CYA、

FK506、MMFの投与を行った。脾細胞移植14日目のELISA scoreと体重減少を比較すると、CPAのみが有意差をもって抑制効果が見られた。

D. 考察

PVモデルマウスの表現型の観察から、発症したモデルマウスのびらんの改善の評価が難しいことを実感していた。そこで今年度は、移植前からの薬剤投与により発症抑制が可能かどうかでその免疫抑制効果を評価した。

治療評価に先立ち、使用した7種類の薬剤につき、次のような予測を立てた。細胞傷害性の強いCPAやAZPは抑制効果が強く、それに次いでT、B細胞のDNA合成阻害剤であるMMFおよびステロイド剤であるm-PSL、DEX、そしてT細胞に対してのみ抑制効果のある、CYA、FK506は抑制効果が弱いと考えた。

結果、CPAはELISA scoreおよび表現型ともに完全な発症抑制効果を認めた。AZPも抑制効果を認めたが副作用として貧血が見られ、投与量の問題があったかもしれない。MMFは予想に反して効果が弱かった。CYAの抑制効果はCPAに次いで強かったが、同系統薬剤であるFK506は抑制効果が弱かった。ステロイド剤はある程度の効果はあったものの、7割程度の抑制効果であった。

またCPA投与群は投与中止後2～3週間で症状の出現をみた。このことは、CPAによる免疫抑制効果が可逆的であることを示しており、ヒトのPVの症状を正確に反映しているものと捉えることができる。

以上まとめると、

- CPAは薬剤投与中は完全に抗体産生抑制作用を認め、中止後約2週間で症状の出現を認めた。
- AZPは抑制効果を認めたが、副作用を認め、投与量を再考する必要があると思われた。

- MMF は効果が弱かった。
- T細胞特異的な薬剤である CYA と FK506 は、予想に反して、CYA のみに抑制効果を認めた。作用点は同じであるにも関わらず相反する結果の理由は不明である。
- DEX、m-PSL は共に 7 割程度の効果を認めたが、完全に抑制効果は認めなかった。

E. 結論

今回、ヒトの PV に対して使用されている主な薬剤の評価を行った。完全にヒトと同じ抑制効果を示したとは言いがたいが、一定の抑制効果を示した。今後新しい免疫抑制療法の前臨床試験としてとして、有用な評価系になりうると考えられる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

- 論文発表
- Hanakawa Y, Schechter NM, Lin C, Nishifuji K, Amagai M, and Stanley JR. Enzymatic and molecular characteristics of the efficiency and specificity of exfoliative toxin cleavage of desmoglein 1. **J Biol Chem** 279:5268-5277, 2004.
- Shimizu A, Ishiko A, Ota T, Tsunoda K, Amagai M, and Nishikawa T. IgG binds to desmoglein 3 in desmosomes and causes a desmosomal split without keratin retraction in a pemphigus mouse model. **J Invest Dermatol** 122:1145-1153, 2004.
- Aoki-Ota M, Tsunoda K, Ota T, Iwasaki T, Koyasu S, Amagai M, and Nishikawa T. A mouse model of pemphigus vulgaris by adoptive transfer of naive splenocytes from desmoglein 3 knockout mice. **Br J Dermatol** 151:346-354, 2004.
- Payne AS, Hanakawa Y, Amagai M, and Stanley JR. Desmosomes and diseases: Pemphigus and bullous impetigo. **Curr Opin Cell Biol** 16:536-543, 2004.
- Ota T, Aoki-Ota M, Tsunoda K, Simoda K, Nishikawa T, Amagai M, and Koyasu S. Auto-reactive B cells against peripheral antigen, desmoglein 3, escape from tolerance mechanism. **Int Immunol** 16:1487-1495, 2004.
- Anzai H, Fujii Y, Nishifuji K, Aoki-Ota M, Ota T, Amagai M, and Nishikawa T. Conformational epitope mapping of antibodies against desmoglein 3 in experimental murine pemphigus vulgaris. **J Dermatol Sci** 35:133-142, 2004.
- Hisamatsu Y, Amagai M, Garrod DR, Kanzaki T, and Hashimoto T. The detection of IgG and IgA autoantibodies to desmocollins 1-3 by enzyme-linked immunosorbent assays using baculovirus-expressed proteins, in atypical pemphigus but not in typical pemphigus. **Br J Dermatol** 151:73-83, 2004.
- Nagasaka T, Nishifuji K, Ota T, Whittock NV, and Amagai M. Defining the pathogenic involvement of desmoglein 4 in pemphigus and staphylococcal scalded skin syndrome. **J Clin Invest** 114:1484-1492, 2004.

H. 知的所有権の出願・登録状況 (予定を含む)

なし

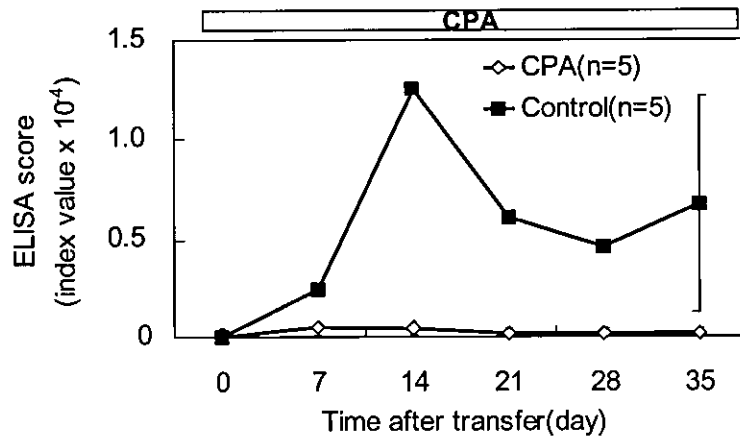


図1 CPA を投与したマウスの ELISA score(35 日目まで) CPA 投与群の抗体産生は完全に抑制された。

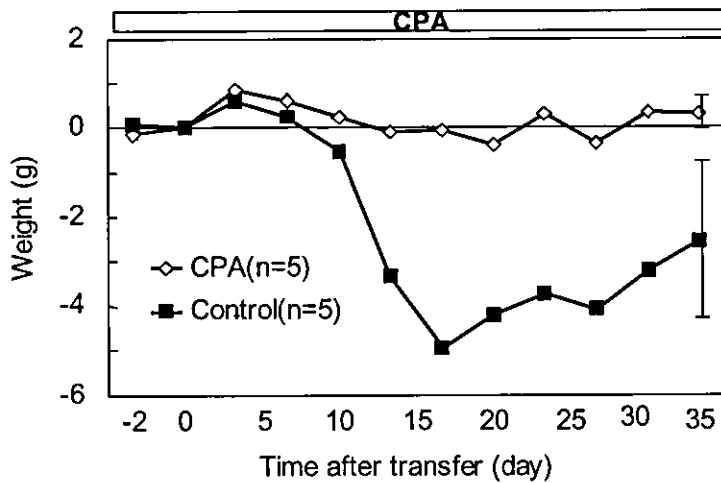


図2 CPA 投与したマウスの体重減少のグラフ(35 日目まで) CPA 投与群は体重減少を認めなかった。

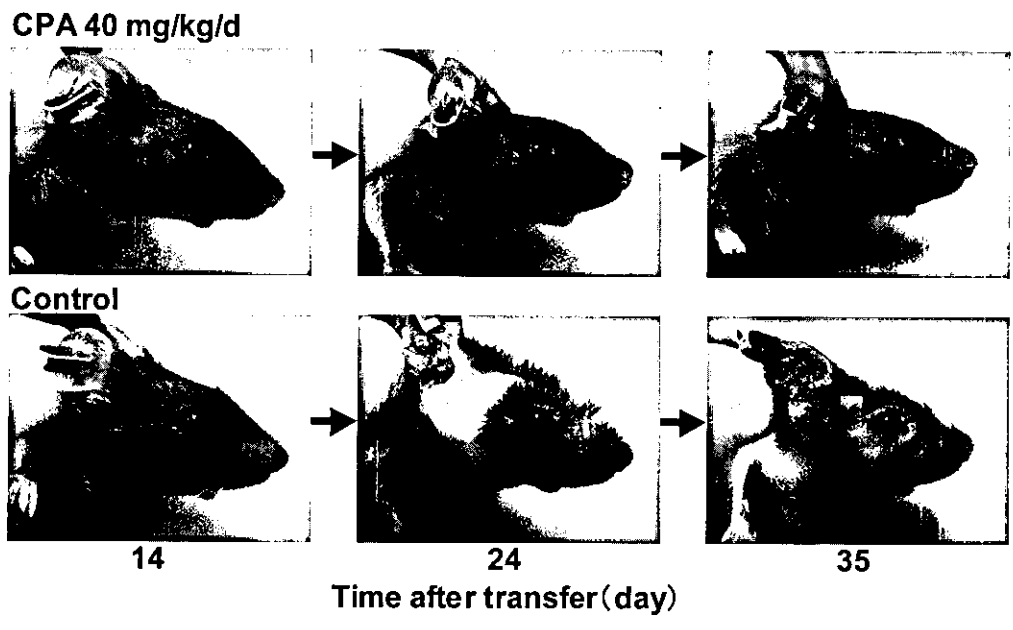


図3 CPAを投与したマウスの表現型の写真(35日目まで)
CPA投与により、表現型の出現は完全に抑制された。

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
分担研究報告書

天疱瘡における二重濾過血漿交換療法の有用性

分担研究者 橋本公二 愛媛大学医学部皮膚科 教授

研究要旨 天疱瘡の病勢判定において ELISA 法の開発は大きな進歩をもたらした。ELISA 法は鋭敏に臨床症状の重症度や変化を反映するといえる。我々は難治性天疱瘡においてステロイドと併用してしばしば二重濾過血漿交換療法 (DFPP) を試行するが、ELISA 法の評価を臨床症状と組み合わせることにより、より適切に DFPP の試行が可能になった。また糖尿病などでステロイドの減量が望ましいが、ELISA 法による抗体価 index の低下がない場合 DFPP を併用することで速やかにステロイド減量が出来た症例を経験した。DFPP は重症期だけでなく安定期に試行し他の投与薬の合併症をさける目的においても有用と考える。

共同研究者
花川 靖
愛媛大学医学部皮膚科助手

A. 研究目的

難治性天疱瘡において二重濾過血漿交換療法 (DFPP) の有用性を ELISA 法による抗体価 index の推移を用いることにより検討する。

B. 研究方法

難治性尋常性天疱瘡および糖尿病の合併によりステロイド減量の望ましい患者 4 例につき臨床経過と ELISA 法による抗体価 index を測定した。

C. 研究結果

4 例とも DFPP を併用する事により抗体価の減少を認めステロイドの速やかな減量が可能であった (図 1)。

D. 考察

ELISA 法は鋭敏に症状の重症度や変化を反映する。難治性天疱瘡において ELISA 法の評価を臨床症状と組み合わせることにより、より適切に DFPP の試行が可能に

なった。糖尿病などでステロイドの減量が望ましいが、ELISA 法による抗体価 index の低下がない場合 DFPP を併用することで速やかにステロイド減量が出来ると考えた。

E. 結論

DFPP は重症期だけでなく安定期に試行し他の投与薬の合併症をさける目的においても有用と考える。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表 (平成16年度)

1. 論文発表

英語論文

日本語論文

2. 学会発表

第56回日本皮膚科学会西部支部学術大会
シンポジウム

H. 知的所有権の出願・登録状況 (予定を含む)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録
なし

3. その他
なし

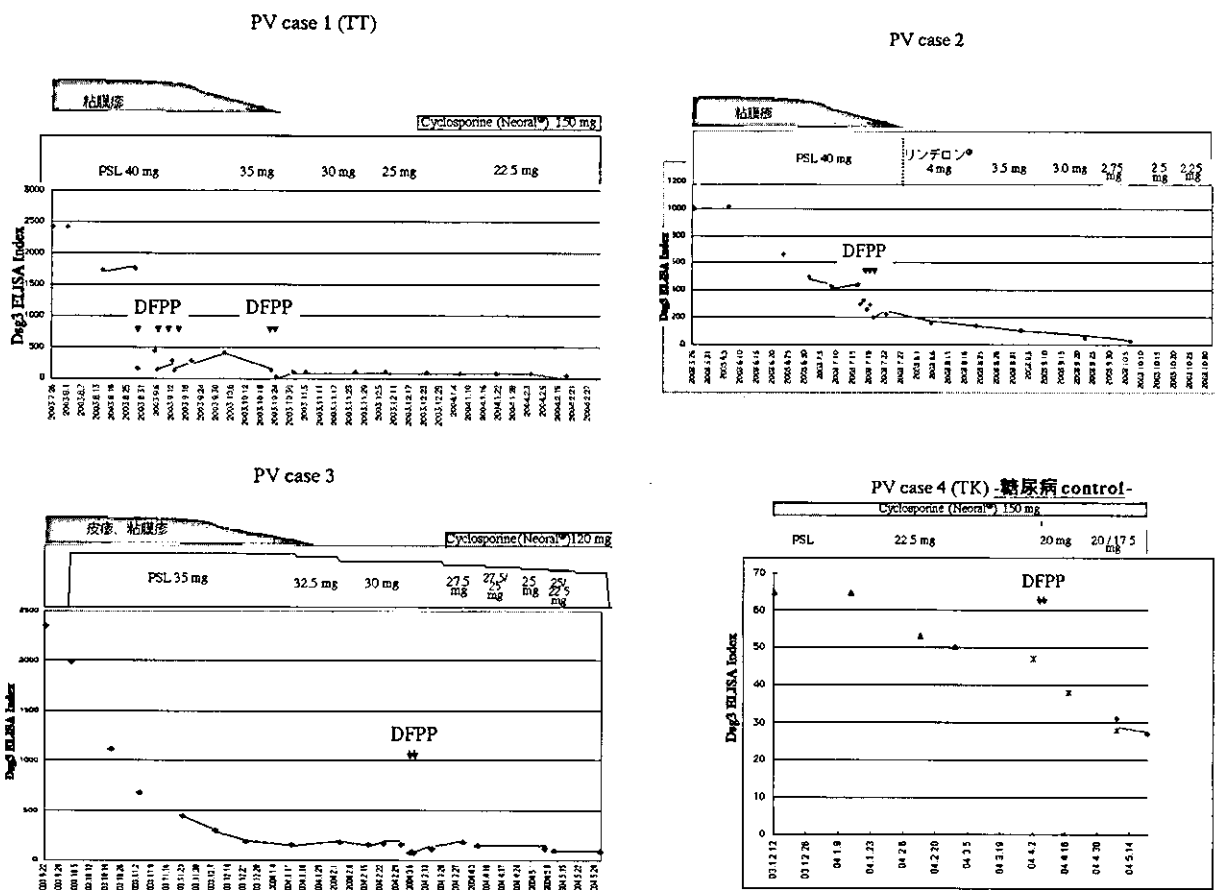


図1 難治性天疱瘡の臨床経過と ELISA index の推移

4例とも DFPP を併用することによりステロイドの速やかな減量が可能となった。

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
分担研究報告書

天疱瘡におけるステロイドパルス療法のELISA抗体価の推移解析による
2週間隔2回反復施行の有効性の提示

分担研究者 北島康雄 岐阜大学大学院医学研究科医科学専攻病態制御学講座
皮膚病態学分野 教授

研究要旨 重症例の天疱瘡の治療は、プレドニゾン換算で30mg/日以上
のステロイド単独、あるいは血漿交換療法を併用して行われるが、これらの治療に
対する抵抗例や血漿交換療法が困難な施設ではステロイドパルス療法も選択肢の
1つになる。今回、PV：4例、PF：2例、BP：2例の計8例でステロイドパ
ルス後のELISA抗体価の推移を検討し、天疱瘡におけるステロイドパルス療法
の有効性を向上させる方法について考察した。病型によらず、パルスから約2週間
後にELISA値は低下が停滞し、臨床的に無効時はその後再上昇するが、有効時
はそのまま低下した。また、無効時ではELISA値はIgGの推移とほぼ同程度の
減少率であるのに対し、有効時ではIgGの推移との間に解離がみられELISA値
がより強い減少率を示した。この有効性は反復することでより顕著となった。よ
って天疱瘡のステロイドパルス療法は2週間ごとに効果判定し、臨床症状に明ら
かな改善がない場合は2回連続で施行することが有効で、また判定の補助に
ELISA値の推移が有用であると考えられた。

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。前者は落葉状天疱瘡と
尋常性天疱瘡に大別され、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1（Dsg1：分子量160
kDa）、Dsg3（分子量130kDa）が、一方、
後者はヘミデスマゾーム構成分子の類天疱
瘡抗原2（BP180またはBPAG2：分子量
180kDa）が同定されている^{1)~3)}。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、病勢の客観的評価が病因抗
体価の測定という形で可能となり^{4), 5)}、我々
の施設では水疱症の治療を、臨床症状と
抗体価の両者を指標とし、原因抗体により

惹起される反応の抑制と、抗体自体の減
量・消失という観点に基づいて行ってきた^{6), 7), 8)}。天疱瘡の重症例では、通常ステ
ロイド（プレドニゾン換算で30mg/日
以上）単独、あるいは血漿交換療法を組み
合わせて治療されるが、ステロイド抵抗性
を示す症例や、あるいは血漿交換が困難な
施設においてはステロイドパルス療法も選
択肢の1つになる。今回は、最近当科でス
テロイドパルス療法を行った落葉状天疱瘡、
尋常性天疱瘡、類天疱瘡の症例において治
療前後のELISA抗体価の推移を詳細に検
討し、より効果的なステロイドパルス療法
の方法を模索した。

B. 研究方法

症例

活動性の高い時期で治療抵抗性（ステロ
イドに血漿交換療法や大量 γ グロブリン療
法などを併用しても症状の改善が得られな
い）、あるいは血液製剤使用拒否などを理

由に、我々の施設で過去3年間にステロイドパルス療法（メチルプレドニゾン 1g/日×3日間）を行った尋常性天疱瘡（PV）、落葉状天疱瘡（PF）、類天疱瘡（BP）の症例8例（PV：4、PF：2、BP：2例）について、パルス療法の初日を day0 とし、パルス施行直前の ELISA 値を 1 とし、次のパルスまでの期間、あるいは施行後60日間の ELISA 値変動率の推移を検討した。

ELISA に関する方法

Dsg1、Dsg3、BP180 ELISA kit (MBL, Nagoya, Japan) を用いた。リコンビナント Dsg1、Dsg3、BP180NC16a 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。洗浄後、酵素標識抗体を添加し、室温で一時間静置反応させた。再び洗浄後、酵素基質液を添加し、室温で30分静置反応させた。反応停止液を添加後、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⁵⁾。

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

C. 研究結果

ステロイドパルス療法を施行した PV：4例、PF：2例、BP：2例の計8例のうち、症例5は高齢を理由に0.5g/日で施行した。患者自身の拒否により、1回のみ施行した粘膜型の PV を除き、反復施行した症例のうち症例1以外では、2～3週間後に再度パルス療法を追加した。パルス直前の ELISA 値は希釈補正で極めて高値であった。各々の症例で、一連の経過で良好なコントロールを得るまでに要したステロイドパルスの反復回数は2回の症例が最も多かった（表1）。パルス前、パルス後の各々

の時期に、抗体価に影響する併用療法の種類によってステロイドパルス後の経過には差はなかった。

症例1の PV では、1回目、その8週間後に2回目、さらに2回目から16週間後に3回目、それぞれ単発で3回ステロイドパルスを行っている。すなわち、同一個体において、ステロイドパルス療法が臨床的に効果なしの経過を1回目、2回目で示し、効果ありの経過を3回目のパネルで示す。

1回目、2回目は1か月後に二重膜濾過血漿交換療法（以下 DFPP）を行っており、この時期にみられる抗体価の激しい変動はその影響である。DFPP 施行前に相当するパルス後1ヶ月間の前半部分で比較すると、臨床的に効果が不十分であった1回目と2回目では抗体価も不安定で、パルス前より上昇している。これに対し効果が得られた3回目は順調に減少しているがわかる。ここで注目すべきは、効果のなかった1回目、2回日も、効果のみられた3回日も、パルス療法から約2週間後に抗体価の減少がにぶる時期がみられる点である。1回目、2回目ではそこから上昇し、3回目では勾配がにぶるものの、そこからまた抗体価の減少が観察された（図1）。

別の PV の症例4では、1年後の再発時にも同じように2回、ステロイドパルスを反復した。初回時、再発時それぞれの1回目は無効時、2回目は有効時の経過と評価して抗体価の推移を比較した。症例1と同様に、効果の有無に関わらず、いずれの回でも約2週間後に ELISA 値の低下のにぶりがみられた。また、臨床的に有効であった2回目の方がより急峻な勾配で減少した。さらに IgG もパルス直前値を1の基準にとり、併せてその変化をみた。なお1年目の1回目のパルスの前には、大量γグロブリン療法をおこなっているためこの回の IgG の著しい減少はその消退を反映し ELISA 値の推移より低くなったと考えられる。それを考慮すると、1年目も2年目

も、臨床的に効果のなかった1回目はIgGとELISA値の推移が並行しているのに対し、効果が得られた2回目ではIgGの減少と解離がみられた(図2)。

以上の①臨床の有効時、無効時ともにパルスから約2週間後に1度ELISA値の低下がにぶる時期がみられ無効時にはそこから再上昇し、有効時にはさらに低下の傾向がみられること、②低下の勾配については、有効時は無効時より減少率がよいこと、③さらにIgGの推移と比較すると、無効時はほぼ同じ程度の減少率であるが、有効時にはIgGの推移との間に解離がみられ、ELISAの低下のほうが著しい傾向であることはPFとBPの病型によらず共通に観察される現象であった。

D. 考察

重症例の天疱瘡の治療は、プレドニゾン換算で30mg/日以上ステロイド単独、あるいは血漿交換療法を併用して行われるが、血漿交換療法が困難な施設や血液製剤使用拒否などの症例においてステロイドパルス療法を選択することは稀ではない。我々の施設ではこれまで自己免疫性水疱症の入院患者に対し、臨床症状と週1回測定する抗体価の両者を指標として治療を行い、ステロイドパルス療法については、経験的な臨床症状の改善を基準に、2週間ごとに効果を判定してきた。すなわち、ステロイドパルス直後は一旦症状の軽快をみるものの、約1週間後に再び活動性が上昇するという経過を観察し、場合によってはこの時期に他の治療法を併用しコントロールをはかるが、それでもなお活動性の高い状態が続く際には効果不十分と判断し、2週間以上の間隔で反復してきた。今回、PV:4例、PF:2例、BP:2例の計8例でステロイドパルス後のELISA抗体価の推移を検討したところ、病型によらず、パルスから約2週間後にELISA値の低下が停滞し、臨床的に無効であった回はその後上昇するが、

有効時はそのまま低下した。また無効時ではELISA値はIgGの推移とほぼ同程度の減少率であるのに対し、有効時にはIgGの減少推移との間に解離がみられELISA値がより強い減少率を示した。この結果は、これまで経験的に認知していた、ステロイドパルス直後に一旦症状の軽快をみるものの、約1週間後に再び活動性が上昇するという現象を、ELISA抗体価という客観的指標によって裏付けるものと考えられる。すなわち、ステロイドパルス施行後2~3週間の時期にELISA値が再上昇するなら臨床的にも効果が不十分であり、逆にパルス施行後2~3週間の時期にELISA値の再上昇がなく、IgGの推移と解離がみられれば、臨床的にも効果ありと判断できる。また反復することで、効果が得られると期待される抗体価の推移を示すようになることより、自己免疫性水疱症でのステロイドパルス療法の施行法として、繰り返し投与が推奨される可能性が示唆された。

E. 結論

自己免疫性水疱症のステロイドパルス療法は2週間ごとに効果判定し、臨床症状に明らかな改善がない場合は2回反復で施行することが有効で、また判定の補助にELISA値の推移が有用であると考えられた。

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 autoantibodies 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. 北島康雄：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. 厚生労働科学研究費補助金特定疾患対策研究事業 稀少難治性皮膚疾患に関する調査研究 平成14年度総括・分担研究報告書：45-53, 2003
 8. 北島康雄：天疱瘡・類天疱瘡寛解期における臨床症状と ELISA 抗体価の推移による維持療法の検討. 厚生労働科学研究費補助金特定疾患対策研究事業 稀少難治性皮膚疾患に関する調査研究 平成15年度総括・分担研究報告書：38-45, 2004
- F. 健康危険情報**
なし
- G. 研究発表 (平成16年度)**
1. 論文発表
英語論文
 1. Nguyen VT, Arredondo J, Chernyavsky AI, Kitajima Y, Pittelkow M, Grand SA. Pemphigus vulgaris IgG and methyl-prednisolone exhibit reciprocal effects on keratinocytes. **J Biol Chem** 279(3):2135-2146, 2004
 2. Nguyen VT, Chernyavsky AI, Arredondo J, Bercovich D, Orr-Urtreger A, Vetter DE, Wess J, Beaudet AL, Kitajima Y, Grand SA Synergistic control of epithelial cell adhesion through muscarinic and nicotinic subtypes of cholinergic receptors. **Exp Cell Res** 294:534-549, 2004
 3. Nguyen VT, Arredondo J, Chernyavsky AI, Pittelkow MR, Kitajima Y, Grand SA Pemphigus vulgaris acantholysis ameliorated by cholinergic agonists **Arch Dermatol** 140:327-334, 2004
 4. Nagao-Watanabe M, Fukao T, Matsui E, Kaneko H, Inoue R, Kawamoto N, Kasahara Nagai M, Ichiki Y, Kitajima Y, Kondo N Nagao-Watanabe M, Fukao T, Matsui E, Kaneko H, Inoue R, Kawamoto N, Kasahara Nagai M, Ichiki Y, Kitajima Y, Kondo N Identification of somatic and germline mosaicism for a keratin 5 mutation in epidermolysis bullosa simplex in a family of which the

proband was previously regarded as sporadic case *Clin Genet* 66: 236-238, 2004

5. Izumi T, Ichiki Y, Esaki C, Kitajima Y. Monitoring of ELISA for anti-BP180 antibodies: Clinical and therapeutic analysis of steroid treated patients with Bullous pemphigoid *J Dermatol* 31:383-391, 2004

日本語論文

1. 北島康雄. 尋常性天疱瘡の棘融解はなぜおこる? マルホ皮膚科セミナー放送内容集 174:8-13, 2005

日本語著書

1. 北島康雄 (分担). デスモソームの機能と病態への関与; 皮膚の発生・機能と病態. 最新皮膚科学大系 19 (中山書店): 80-86, 2004
2. 北島康雄 (分担). 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 (中外医学社): 19-23, 2004
3. 北島康雄 (分担). 天疱瘡 a) 病態 皮膚疾患の病態と治療 (改訂版): in press
2. 学会発表
1. 北島康雄. デスモソームの形成・分解制御と天疱瘡の発症機序. 第8回旭川皮膚科リサーチセミナー 2月1日, 2004 旭川
2. 北島康雄. 自己免疫性水疱症の発症機序と治療. 第3回香川皮膚免疫研究会 11月27日, 2004, 高松
3. 北島康雄. 尋常性天疱瘡の棘融解はなぜ起こる? マルホ皮膚科セミナーラジオたんぱ 8月12日, 2004 大阪
4. 江崎智香子、長谷川優佳、永井美貴、高木 肇、北島康雄、小林 敦、柴田

敏之. ロキシシロマイシン・トラニラスト併用療法により症状が消退した粘膜型 PV と BP の合併例. 第103回日本皮膚科学会総会 4月16-18日, 2004 京都

5. 江崎智香子、市來善郎、高木 肇、北島康雄. 自己免疫性水疱症におけるステロイドパルス療法 8例の毎週測定 ELISA 値からの示唆. 第26回水疱症研究会 10月17日, 2004 岡山
6. Zhou Y, Yamamoto Y, Nagai M, Kitajima Y. Distribution of desmoglein 3 and desmocollin 3 in DJM-1 cell after treatment with pemphigus vulgaris-IgG. 第29回日本研究皮膚科学会 4月14-16日, 2004 京都
7. Shu E, Yamamoto Y, Aoyama Y, Kitajima Y. Does desmoglein 3 decrease in a mouse model of passive transfer of pemphigus vulgaris-IgG in vivo? 第10回岐阜リサーチセミナー 11月20-21日, 2004 岐阜
8. 高塚智子、江崎智香子、和泉智子、青山裕美、市來善郎、高木 肇、北島康雄、楊 美雪、樋口実穂、遠渡 舞、米田和史. 治療に工夫を要した難治性の類天疱瘡の1例. 第26回水疱症研究会10月17日, 2004 岡山
9. 高塚智子、江崎智香子、和泉智子、青山裕美、市來善郎、高木 肇、北島康雄、横井繁明、出口 隆、楊 美雪、樋口実穂、遠渡 舞、米田和史. ステロイドパルスとγグロブリン大量療法が有効であった類天疱瘡の1例. 第230回日本皮膚科学会東海地方会 12月5日, 2004 名古屋
10. 山本ゆかり、角田和之、天谷雅行、北島康雄. 尋常性天疱瘡病原性抗 Dsg3 モノクロナール抗体は、デスモソーム形成阻害をしないが、Dsg3 欠損デスモソームを作る. 第29回日本研究皮膚

科学会 4月14—16日, 2004 京都
11. 山本ゆかり、青山裕美、角田和之、天
谷雅行、北島康雄. Formation of
Dsg3-deficient desmosome by
pemphigus monoclonal antibodies.
第18回表皮細胞研究会 10月30日,

2004 東京・第10回岐阜リサーチセミ
ナー 11月20—21日, 2004 岐阜

H. 知的所有権の出願・登録状況 (予定を
含む)
なし

| 症例 | 年齢・性 | 病型 | 回数 | パルス前ELISA | パルス間隔(Ⓜ) |
|------|------|----|----|-----------|----------|
| 1.TK | 50 F | PV | ① | 181.6 | 8 |
| | | | ② | 95.0 | 16 |
| | | | ③ | 123.8 | — |
| 2.SK | 28 M | PV | ① | 152.5 | — |
| 3.TR | 50 M | PV | ① | 2030.7 | 2 |
| | | | ② | 302.7 | — |
| 4.NM | 63 M | PV | ① | 146.2 | 3 |
| | | | ② | 64.7 | — |
| | | | ③ | 154.9 | 2 |
| | | | ④ | 123.0 | — |
| 5.IM | 85 M | PF | ① | 354.6 | 3 |
| | | | ② | 308.7 | — |
| 6.KT | 50 F | PF | ① | 1568.8 | 3 |
| | | | ② | 1123.4 | 7 |
| | | | ③ | 234.1 | — |
| 7.HK | 58 F | BP | ① | 2090.4 | 2 |
| | | | ② | 2141.3 | 4 |
| | | | ③ | 456.3 | 2 |
| | | | ④ | 302.1 | — |
| 8.TF | 51 F | BP | ① | 2014.7 | 2 |
| | | | ② | 2000.4 | — |

表1 ステロイドパルス療法を施行した8症例 症例5は 0.5g/日で施行。

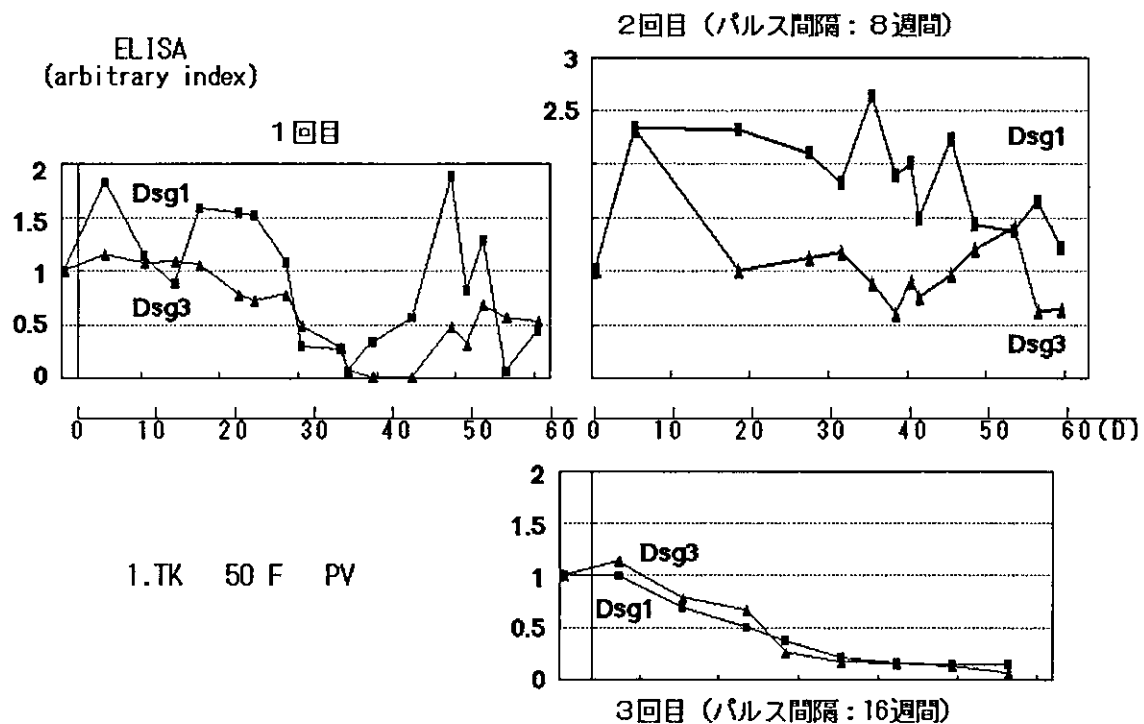
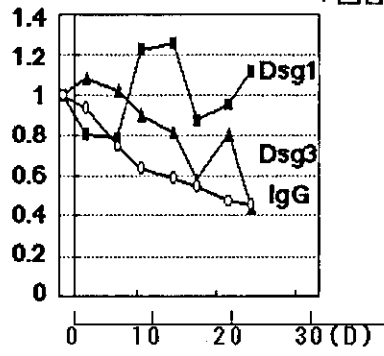


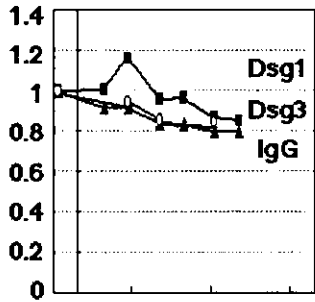
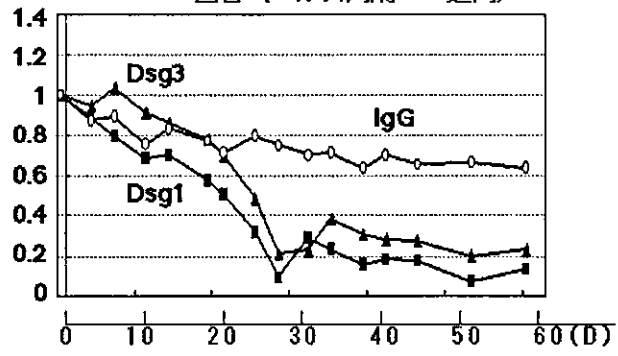
図1 症例1のステロイドパルス療法後の ELISA 抗体価の推移
パルス療法初日を day0、パルス施行直前の ELISA 値を1として表示。

(■:Dsg1 ▲:Dsg3)

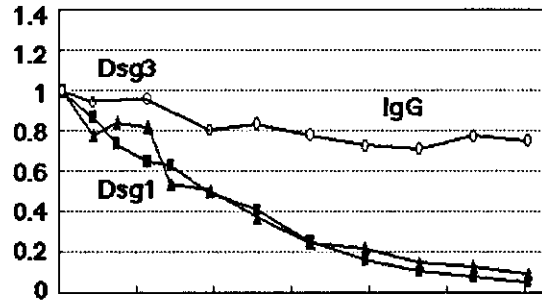
ELISA/IgG (arbitrary index) 1回目



2回目 (パルス間隔: 3週間)



4.NM 63 M PV 再発時1回目



再発時2回目 (パルス間隔: 2週間)

図2

図1 症例1のステロイドパルス療法後の ELISA 抗体価の推移

パルス療法初日を day0、パルス施行直前の ELISA 値を1として表示。

(■:Dsg1 ▲:Dsg3 ○:IgG)