

## 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), 0.4ug/ml ハイドロコルチゾン、10ng/ml EGF, 84ng/ml コレラトキシン、10%FCS を含む培地中で培養した。実験には  $5 \times 10^4$  個の細胞を 35mm シャーレに播種し、50 時間培養後の 40~50%コンフルエントの細胞を用いた。

### 2) 抗 Dsg3 モノクローナル抗体の調製

尋常性天疱瘡モデルマウスから作成された数種の抗 Dsg3 モノクローナル抗体のうち、in vivo での Passive transfer assay、Ascites formation assayにより強い病原活性が示された AK23 を用いた。この抗体を産生する各ハイブリドーマを無タンパク培地 (Gibco CD Hybridoma) にて大量培養を行い、その培養上清から Protein G column により IgG を精製し、刺激用抗体液とした。

刺激を行う場合は、PV-IgG は 0.3mg/ml で、AK23 モノクローナル抗体濃度は終濃度 0.5mg/ml になるように調製した。また、AK23 では、0.8ug/ml から 0.5mg/ml、1.0mg/ml、2.0mg/ml の間の濃度で 24 時間、48 時間刺激いずれにおいても Dsg3 減少率は約 40% で平衡状態 (プラトー) に達することは前に報告している<sup>3)</sup>。

### 3) 天疱瘡および AK23 抗体刺激と細胞間接着力測定

AK23 を 0.5mg/ml、PV-IgG を 0.3mg/ml、および陰性コントロールとして正常マウス IgG を 0.5mg/ml で刺激を行った。24 時間後、抗体液を除去し、500U/ml の Dispase で 37°C 30 分反応させてディッシュから細胞を剥がした。細胞を回収後、PBS で洗いながら残りの細胞をさらに 2.0ml のエッペンドルフチューブに回収した。P1000 ピペットマンで 5 回ピペッティングを繰り返して物理的刺激を加えた。後に最終濃度 50% エタノールで 5 分固定し、最終

濃度 1 $\mu$ g/ml DAPI (核染色液) を加えて 15 分反応させた。2000rpm で 5 分の遠心分離により細胞コロニーを沈殿として集め、FluorSave に浮遊させてスライドグラスに滴下、伸展して観察用試料作成した。上清についても細胞が残っていないか確認するため、同様にサンプルを作製した。蛍光顕微鏡にて 340nm の波長で観察した。1 サンプルあたり 10 枚の画像を撮り、核の集合体として観察される各細胞コロニーの蛍光強度を Image-J により測定した。

細胞数と蛍光強度の関係を求めるためにスライドグラスにサンプリングした DJM-1 細胞のコロニーの細胞が 1 個から 300 個までのコロニーの蛍光強度を測定し、横軸に細胞の個数を、縦軸に蛍光強度を取りグラフを作成した。その結果蛍光強度と細胞個数には比例の関係にあったため (結果、図 1)、蛍光強度を細胞数の指標とした。画像 1 枚中の 30 個以上のコロニーの総細胞数 / 30 個以下のコロニーの総細胞数の比を求め、抗体刺激後の前述した一定の可視数のピペッティングによって大きなコロニーから分離した小細胞数コロニーの割合がどの程度増えるかを検討した。

## C. 研究結果

### 1) コロニー細胞数の蛍光核染色測定法の検量性

スライドグラスにサンプリングした DJM-1 細胞は一個の単細胞から数百個の細胞からなるコロニーがほぼ均質に撒布性に見られた。コロニーの細胞が 1 個から 300 個までのコロニーの蛍光強度を測定し、横軸に細胞の個数を、縦軸に蛍光強度を取りグラフを作成したところ、定量的な直線が得られた (図 1)。これをもとに、細胞数の計測は蛍光強度の測定を用いることとした。

### 2) PV-IgG および AK23 抗体刺激後の細胞間接着強の減弱

今回の実験においても、PV-IgG および AK23 による 24 時間刺激により DJM-1 細

胞において、Dsg3の量はPV-IgG刺激時ではデスモソームを含む細胞内プールから約85%消失し、AK23では約32%減少した(図2)。このデスモグレイン3減少測定標本と平行して行った実験で得られた試料において、細胞間接着力は図2bに示すように、AK23、PV-IgG刺激後、我々が行った接着力測定法においては共に約38%の接着力減少が見られた。

#### D. 考察

我々はこれまでにAK23のDsg3への結合は、PV-IgGと同様に24時間刺激によりDsg3減少デスモソームを形成し、抗Dsg3抗体の結合による特異的な反応であることを示した。AK23の長時間刺激では、抗体濃度に関わらず約40%の減少で、PV-IgG刺激では約90%の減少でプラトーに達した。このことから、抗体の結合により引き起こされるDsg3の減少は、全か無かの法則のような一義的な反応なのではなく、エpitepopeやアフィニティなど異なる抗体がそれぞれに異なるDsg3減少活性を持ち、それらの相加的な反応として観察されるのではないかという実験結果を報告してきた。

一方、Dsg3ノックアウトマウスではニコルスキー現象が見られ、尋常性天疱瘡様臨床症状を呈する。このことはDsg3のデスモソームからの消失が基本的にニコルスキー現象の原因であると推察され、かつ、我々の天疱瘡抗体によるDsg3のデスモソームからの減少結果かとあわせると、Dsg3の減少が天疱瘡における水疱形成に重要な因子であると考えられる。

そこで、我々は培養細胞(DJM-1)においてPV-IgG、AK23刺激によってデスモソームから90%、40%のDsg3減少を惹起した時の細胞間接着力は定量的に減少していると考え、これらの抗体刺激24時間時の細胞間接着を半定量的に測定した。

その結果、Dsg3の減少量にかかわらず接着力の減少は等しく38%のところまでで

あった。この結果は、デスモグレイン3がたとえ90%減少しても、他の着分子であるデスモグレイン1、2、デスモコリン1-3によって補填されるため、「37%の減弱が接着力の最大減弱率」を引き出したと言う結果になる可能性と、たとえば、接着力の減弱に差があったとしてもこの測定方法の感受性が低いためにここまでしか測定できないと言う可能性がある。

しかしながら、細胞間接着力の減少はDsg3の減少量とは比例関係にはなかったものの、定量的に観察できるほど減少していることが示唆された。このことは、我々が先に報告した天疱瘡抗体腹腔内注射マウスで水疱と棘融解が生じ、このマウス表皮でDsg3の約30%の減少を観察した結果とあわせると、Dsg3の部分的減少でも棘融解に関与すると推察される。

#### E. 結論

以上から、PV-IgG、AK23抗体によるデスモソームからのDsg3の減少は、細胞間接着力を一定度減弱させることが明らかとなった。またこのことからDsg3の減少が、PV-IgGと抗デスモグレイン3モノクローナル抗体による患者あるいは天疱瘡モデルマウスにおける水疱形成に関与している可能性が示唆された。

#### 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. **J Invest Dermatol Symp Proc** 4: 137-144, 199
- 2) Aoyama Y, Owada MK, Kitajima Y, A pathogenic autoantibody, pemphigus IgG, induces phospho-

horylation of desmoglein 3, and its dissociation from plakoglobin in cultured lkeratinocytes. **Eur J Immunol** 29:2233-2240, 1999

- 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) Tsunoda K, Amagai M., Induction of pemphigus phenotype by a mouse monoclonal antibody against the amino-terminal adhesive interface of desmoglein 3. **J Immunol**. 170:2170-8, 2003.
- 5) 北島康雄、厚生労働科学研究費補助金(特定疾患対策研究事業)平成16年度分担研究報告書
- 6) Koch PJ, Mahoney MG, Ishikawa H, et al, Targeted disruption of the pemphigus vulgaris antigen (desmogleins 3) gene in mice causes loss of keratinocyte adhesion with a phenotype similar to pemphigus vulgaris. **J Cell Biol** 137:1091-1102, 1997.

## F. 健康危険情報

該当なし。

## G. 研究発表(平成16年度)

### 1. 論文発表

英語論文

1. Shu E, Yamamoto Y, Sato-Nagai M, Aoyama Y, Kitajima Y. Pemphigus vulgaris-IgG reduces the desmogleins 3/desmocollins 3 ratio on the cell surface in cul-

tured keratinocytes as revealed by double-staining immuno electron microscopy. **J Dermatol Sci** 40: 209-211.2005

### 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
2. 北島康雄、青山裕美. 表皮の構造と機能, *Visual Veterinary Dermatology* 6:2006、印刷中、

### 日本語著書

1. 北島康雄 (分担). 類天疱瘡(南光堂): 2006、印刷中
2. 北島康雄 (分担). 天疱瘡の病態(順天堂大学): 2006、印刷中

### 2. 学会発表

1. Yasuo Kitajima. Cell signaling and desmosome assembly/disassembly linked to the generation of Dsg3-depleted desmosomes. pemphigus Jun16-17, 2005, NIH, USA,
2. En Shu, Yukari Yamamoto, Yumi Aoyama, Yasuo Kitajima. Intra-peritoneal injection of pemphigus vulgaris-IgG into mouse depletes desmoglein 3 from epidermal keratinocytes as examined by western blotting, associated with suprabasal blistering. Annual Meeting of SID, 4<sup>th</sup>-7<sup>th</sup>, May, 2005, St. Luis, USA
3. Yukari Yamamoto\*, Yumi Aoyama\*, Kazuyuki Tsunoda\*\*, Masayuki Amagai\*\*, Yasuo Kitajima\*. Anti-desmoglein 3 (Dsg3) monoclonal antibodies deplete Dsg3 from desmosomes in cultured keratinocytes and their

activities differ in sites of epitopes.  
Annual Meeting of SID, 4<sup>th</sup>-7<sup>th</sup>,  
May, 2005, St. Luis, USA

H. 知的所有権の出願・登録状況（予定を  
含む）  
なし

### Image-Jによる画像解析

<http://rsb.info.nih.gov/ij/index.html>

画像中の細胞数 1 個～300 個までのコロニーを囲み、蛍光強度を測定し、縦軸に蛍光強度、横軸に細胞数をプロットし、右下のグラフを作成した。  
(バックの強度は予め差し引き済)

その結果、蛍光強度と細胞数は比例関係にあり、蛍光高度指数 30,000 は細胞数 30 に相当した。

これによって、コロニーの蛍光強度から細胞数を計算した。

### 細胞間接着力の計算

浮遊させたコロニーをパイペティングすることによって細胞シートから遊離する細胞数と遊離しない細胞数の比 (以下の式) を求め、正常IgG刺激のその値を細胞間接着力100%とした。

$$\frac{\text{細胞数30個以上のコロニー内総細胞数}}{\text{細胞数30個以下のコロニー内総細胞数}}$$

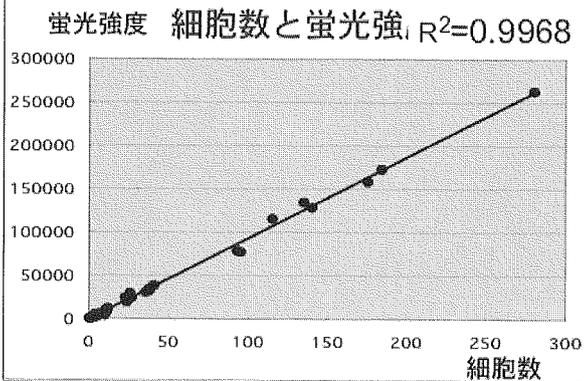
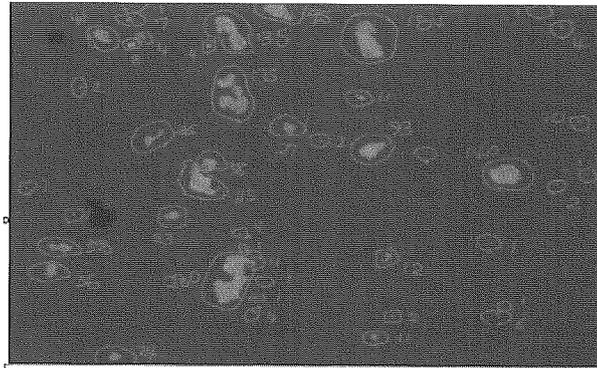
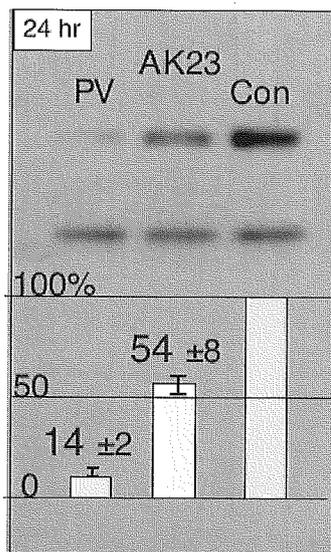


図 1. 核染色蛍光強度と細胞数の関係

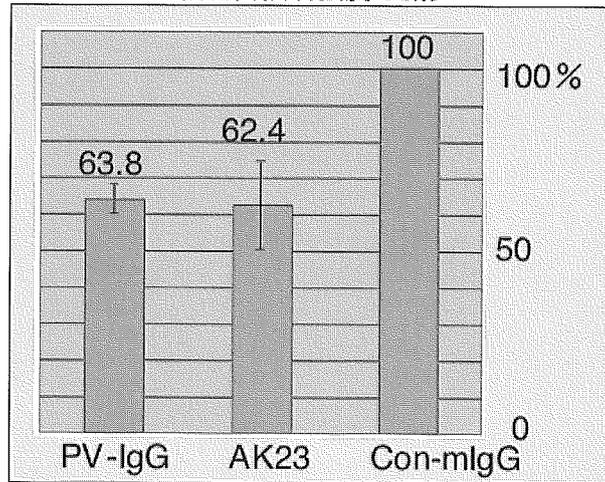
## 病因抗体 24 時間刺激後の Dsg3 の減少と細胞間接着力の減少

病因抗体24時間刺激後の  
Trt X-100 insoluble Fr.

(デスモソーム内) のDsg3減少量



病因抗体で24時間刺激後DJM-1細胞  
コロニーの細胞間接着強度の減少



正常m-IgG刺激時の

細胞数30個以上のコロニー内の総細胞数 の値を  
細胞数30個以下のコロニー内の総細胞数 100%とする

図 2. 天疱瘡抗体、AK23 抗体刺激によるデスモグレイン 3 の減少率と細胞間接着力の減少率

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

IgG/IgA天疱瘡における自己抗原の微小局在の検討

分担研究者 橋本 隆 久留米大学医学部皮膚科学教室 教授

**研究要旨** 蛍光抗体間接法で、IgG および IgA 抗表皮細胞間抗体が両方同時に検出されたとき、IgG/IgA 天疱瘡という名称での診断が下されるが、その臨床型、抗原検索については未だ詳細な検討はされていない。今回、5例のIgG/IgA 天疱瘡患者血清においてその抗原についての微細局在部位の検討を行った。ELISA 法、COS7 細胞 cDNA トランスフェクション法（蛍光抗体法）および免疫電顕法（post-embedding 法）を用いた。その結果、抗原は単一ではなく多岐にわたるも、すべてデスモゾーム構成蛋白であるデスモグレインまたはデスモコリンであることが示された。

共同研究者

石井文人 久留米大学医学部皮膚科 助手  
天谷雅行 慶応大学医学部皮膚科 教授  
山本明美 旭川医科大学皮膚科 講師

**A. 研究目的**

正常ヒト皮膚切片を基質とした蛍光抗体間接法（IIF）にて、抗表皮細胞間抗体が検出されたとき、IgG が表皮細胞間に反応すれば天疱瘡群を、IgA に反応すれば IgA 天疱瘡を疑う。また稀に IIF で、IgG と IgA 抗表皮細胞間抗体が両方同時に検出されたとき、IgG/IgA 天疱瘡という名称での診断が下されるが、その臨床型、抗原検索については 1 例報告が散見されるのみで、未だ詳細な検討はされていない。今回、そのような IgG/IgA 天疱瘡における抗原について ELISA 法、COS7 細胞 cDNA トランスフェクション法および免疫電顕法を施行し、微細局在部位の検討を行った。

**B. 研究方法**

- 1) 血清：IIF で IgG/IgA 抗表皮細胞間抗体を検出した患者血清 5 例。
- 2) ELISA 法：100 倍に希釈した血清

を Dsg1、3 のリコンビナント蛋白をコートした ELISA プレートと室温で 1 時間反応させ、洗浄後、ペルオキシダーゼ標識抗ヒト IgG および IgA 抗体と室温で 1 時間反応させたのち、発色剤を用いて発色させる。IgG 抗体に関しては陽性コントロールと陰性コントロールを測定し、以下のようにインデックス値を求める。

インデックス値 = (患者血清の 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) X100  
IgA 抗体に関しては OD 0.15 以上を陽性とした。

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

4) 免疫電顕法：post-embedding 法を用いた。固定と包埋は、正常ヒト皮膚を凍結固定・凍結置換し、Lowicryl K11M に包埋樹脂ブロックを作製し使用した。この

ブロックから超薄切片を作成し、免疫染色では患者血清を一次抗体として反応させ、それぞれ IgG または IgA に対する抗体を反応させ金粒子で標識した。

### C. 研究結果

ELISA法、と COS7 細胞 cDNA トランスフェクション法の結果は図 1 に、免疫電顕法の結果は図 2 に示す。

症例 1 : IgG/IgA 抗 Dsg1 抗 を検出。

症例 2 : IgG/IgA 抗 Dsg1 抗体を検出。

症例 3 : IgG/IgA 抗 Dsg3 抗体を検出。

症例 4 : IgG/IgA 抗 Dsc1 抗体を検出。

症例 5 : IgA 抗 Dsg1、3 抗体そして IgG 抗 Dsc1 抗体を検出。

免疫電顕ではすべての症例で IgG、IgA はデスモゾーム領域での沈着を認めた。

### D. 考察

免疫電顕の結果は、ELISA 法、トランスフェクション法の結果を裏付けるものであった。定量解析は行っていないが、デスモグレインとデスモコリンの抗体に対する金粒子沈着の差異はなく、また IgG と IgA に対する抗体に関しても差異はなく、その特異性は見出せなかった。

### E. 結論

今回調べ得た IgG/IgA 天疱瘡の抗原は、デスモゾーム構成蛋白であるデスモグレインまたはデスモコリンであることが示された。しかしそれらの抗原は単一ではなく、多岐にわたる。抗原の多様性と臨床症状の相関性はまだ見出せておらず今後の症例の蓄積、解析が待たれる。

### F. 健康危険情報

該当なし。

### G. 研究発表 (平成17年度)

1. 論文発表  
英語論文

1. Raap U, Volker B, Petering H, Hashimoto T, Zillikens D, Kapp A, Werfel T: Successful treatment of subcorneal pustular type of IgA pemphigus. **Hautarzt** 56(1):66-70, 2005 (German)
2. Seishima M, Oda M, Oyama Z, Yoshimura T, Yamazaki F, Aoki T, Nei M, Hashimoto T: Antibody titers to desmogleins 1 and 3 in a patient with paraneoplastic pemphigus associated with follicular dendritic cell sarcoma. **Arch Dermatol** 140(12):1500-1503, 2004
3. Ono F, Kumano K, Terahara K, Yasumoto S, Hashimoto T, Shoji S: A case of pustular psoriasis associated with drug-induced adrenal cortical hypofunction. **Proceedings for the 19th Annual Meeting for the Japanese Society for Psoriasis Research**, Yamagata, Japan, September 4-5, 2004, pp62-63, 2004
4. Takahashi Y, Rouan F, Uitto J, Ishida-Yamamoto A, Iizuka H, Owaribe K, Tanigawa M, Ishii N, Yasumoto S, Hashimoto T: Plectin deficient epidermolysis bullosa simplex with 27-year-history of muscular dystrophy. **J Dermatol Sci.** 37(2):87-93, 2005
5. Duhieu S, Laperdrix C, Hashimoto T, LeBitoux M-A, Haftek M: Desmosome-binding antibody M48 recognises an extracellular antigen different from desmosomal cadherins Dsg 1-3 and Dsc 1-3. **Eur J Dermatol.** 15(2):80-84, 2005
6. Hamada T, Hashimoto T: A Japanese case of dermatitis herpetiformis with facial and palmar lesions. **Clin Exp Dermatol**

- 30(3):298-300, 2005
7. Hamada T, Kawano Y, Szczecinska W, Wozniak K, Yasumoto S, Kowalewski C, Hashimoto T: Novel keratin 5 and 14 gene mutations in patients with epidermolysis bullosa simplex from Poland. **Arch Dermatol Res** 296:577-579, 2005
  8. Tashiro H, Arai H, Hashimoto T, Takezaki S, Kawana S: Pemphigoid nodularis: two case studies and analysis of autoantibodies before and after the development of generalized blistering. **J Nippon Med Sch** 72(1):60-65, 2005
  9. Dainichi T, Takeshita H, Moroi Y, Urabe K, Yoshida M, Hisamatsu Y, Komai A, Duan H, Koga T, Hashimoto T, Furue M: Cicatricial pemphigoid with autoantibodies against the laminin 5 gamma 2 subunit. **Eur J Dermatol** 15(3):189-193, 2005
  10. Hamada T, Ishii N, Karashima T, Kawano Y, Yasumoto S, Hashimoto T: The common KRT9 gene mutation in a Japanese patient with epidermolytic palmo-plantar keratoderma and knuckle pad-like keratoses, **J Dermatol** 32(6):500-502, 2005
  11. Shinojima Y, Ochiai T, Kawamura A, Arakawa H, Fukuda K, Hashimoto T: A case of bullous pemphigoid associated with autoantibodies targeting antigenic sites other than the NC16a domain of BP180. **Clin Exp Dermatol** 30(5):503-505, 2005
  12. Bruckner AL, Fitzpatrick JE, Hashimoto T, Weston WL, Morelli JG: Atypical IgA/IgG Pemphigus Involving the Skin, Oral Mucosa, and Colon in a Child: A Novel Variant of IgA Pemphigus? **Pediatr Dermatol** 22(4):321-327, 2005
  13. Osawa M, Demitsu T, Toda S, Yokokura H, Umemoto N, Yamada T, Yoneda K, Kakurai M, Yoshida M, Hashimoto T: A Case of Mixed Bullous Disease of Epidermolysis bullosa acquisita and Linear IgA Bullous Dermatitis. **Dermatology** 211(2):146-148, 2005
  14. Katagata Y, Takahashi M, Horiuchi Y, Takeda H, Kondo S, Tezuka T, Hashimoto T: Immunoelectron microscopy of keratin filaments in cultured malignant melanomas and squamous cell carcinomas. **Yamagata Med J** 23(2):117-124, 2005
  15. Kurokawa M, Koketsu H, Oda Y, Nagamine H, Toyama T, Hashimoto T, Setoyama M: A case of pemphigus vulgaris accompanied by multiple myeloma. **Int J Dermatol** 44(10):873-875, 2005
  16. Motegi S, Abe M, Tamura A, Ishii N, Hashimoto T, Ishikawa O: Childhood bullous pemphigoid successfully treated with diaminodiphenyl sulfone. **J Dermatol** 32(10):809-812, 2005
  17. Morizane S, Yamamoto T, Hisamatsu Y, Tsuji K, Oono T, Hashimoto T, Iwatsuki K: Pemphigus vegetans with IgG and IgA antidesmoglein 3 antibodies. **Br J Dermatol** 153(6):1236-1237, 2005

18. Nakama T, Natsuaki Y, Hamda T, Kurose K, Karashima T, Yasumoto S, Hashimoto T: Presentation of four cases of effective use of Fibrast spray and of one cautionary case. The proceedings of the Scientific Session of the 2<sup>nd</sup> Meeting of Fibroblast Growth Factor (FGF) Research Group in Fukuoka, Medical Consultation and New Remedies (Shinryo to Shinyaku) 42(10):1119-1120, 2005
  19. Marinovic B, Bukvic Mokos Z, Basta-Juzbasic A, Lakos Jukic I, Loncaric D, Hashimoto T, Pasic A: Atypical clinical appearance of pemphigus vulgaris on the face: case report. **Acta Dermatovenerol Croat** 13(4):233-6, 2005
  20. Yoshida M, Hamada T, Amagai M, Hashimoto K, Uehara R, Yamaguchi K, Imamura K, Okamoto E, Yasumoto S, Hashimoto T: Enzyme-linked immunosorbent assay using bacterial recombinant proteins of human BP230 as a diagnostic tool for bullous pemphigoid. **J Dermatol Sci** 41(1):21-30, 2006
- 日本語論文
1. 河瀬 歩、相馬良直、山前恵美子、溝口昌子、橋本 隆: Clinicolor: Linear Epidermolytic hyperkeratosis の1例、皮膚臨床、47(2):145-146, 2005
  2. 舩 明子、笹井 収、菊池克子、相場節也、駒井礼子、橋本 隆: ステロイドを含む多剤併用療法に反応した癩痕性類天疱瘡の1例、臨皮、59(2):132-134, 2005
  3. 辛島正志、橋本 隆: BPAG1(BP230)と中間径線維との細胞生物学的相互作用の検討、第19回角化症研究会記録集(2004年8月7日開催、東京商工会議所)、pp.28-31, 2005
  4. 石井文人、濱田尚宏、安元慎一郎、橋本 隆: 水疱型先天性魚鱗癬様紅皮症の1例、第19回角化症研究会記録集(2004年8月7日開催、東京商工会議所)、pp.70-72000, 2005
  5. 橋本 隆: 水疱性類天疱瘡におけるBP180 ELISA 値、臨皮、59(5増):62-65, 2005
  6. 熊野仁子、石井文人、三原 典、濱田尚宏、前山泰彦、安元慎一郎、橋本 隆: 腫瘍随伴性天疱瘡—胸腺種を合併し軽症に経過した症例、皮膚病診療、27(6):667-670, 2005
  7. 橋本 隆: アンケート・聞き慣れない病名. intercellular IgA vesiculopustular dermatosis (IAVPD)、皮膚病診療、27(増刊号):144, 2005
  8. 橋本 隆: 水疱症、臨床診断に苦渋する100の外來皮膚疾患. 編集:宮地良樹、メディカルビュー社、pp.230-231、2005年9月15日
  9. 渡邊理枝、山本真里、北見 周、末木博、飯島正文、駒井礼子、橋本 隆: Linear IgA bullous dermatosis (lamina lucida型) の1例—治療に関する考察を加えて—、西日皮膚、67(4):334-336, 2005
  10. 橋本 隆: 尋常性天疱瘡、日本医師会雑誌 特別号「実践 皮膚病変のみかた」、134(特別号(2))、S118
  11. 橋本 隆: 落葉状天疱瘡、日本医師会雑誌 特別号「実践 皮膚病変のみかた」、134(特別号(2))、S119
  12. 橋本 隆: 12. 水疱症、日本皮膚科白書、第2版(第103回日本皮膚科学会総会記念改訂版)発行人 理事長 玉置邦彦、日本皮膚科学会、金原出版、pp135-143、2005年6月25日
  13. 越後岳士、大石直人、白崎文朗、稲沖

- 真、佐藤伸一、竹原和彦、長谷川洋一、橋本 隆：高齢者に発症した抗p200類天疱瘡の1例、皮臨、59:1076-1079, 2005
14. 川崎 奏、小原 理、河 陽子、大岡志穂、山前恵美子、松永るり、保坂恵理、相馬良直、橋本 隆、溝口昌子：後天性表皮水疱症の1例、皮膚臨床47(13):1849-1852, 2005
15. 石井文人、橋本 隆：尋常性天疱瘡患者におけるプレドニゾロンとミゾリピン併用療法の治療経験、西日皮膚、67(6):624-628, 2005
- H. 知的所有権の出願・登録状況（予定を含む）**  
該当なし。

図とその説明

		ELISA (index)*		Transfection			
		Dsg1	Dsg3	Dsc1	Dsc2	Dsc3	
症例 1	(IgG)	<b>242.98</b>	6.24	(IgG)	—	—	—
	(IgA)	<b>2.702</b>	0.097	(IgA)	—	—	—
症例 2	(IgG)	<b>155.05</b>	0.31	(IgG)	—	—	—
	(IgA)	<b>0.479</b>	0.037	(IgA)	—	—	—
症例 3	(IgG)	0.87	<b>142.52</b>	(IgG)	—	—	—
	(IgA)	0.03	<b>0.238</b>	(IgA)	—	—	—
症例 4	(IgG)	0.88	2.25	(IgG)	+	—	—
	(IgA)	0.032	0.059	(IgA)	+	—	—
症例 5	(IgG)	3.62	4.51	(IgG)	+	—	—
	(IgA)	<b>0.434</b>	<b>0.365</b>	(IgA)	—	—	—

\*Positive results of ELISA are shown in bold letters.

図1 ELISA 法と COS7 細胞 cDNA トランスフェクション法（蛍光抗体法）の結果



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

尋常性天疱瘡患者におけるプレドニゾロンとミゾリビン併用療法の治療経験の検討

分担研究者 橋本 隆 久留米大学医学部皮膚科学教室 教授

**研究要旨** ステロイド治療に抵抗性を示す尋常性天疱瘡患者3例に対してミゾリビンをプレドニゾロンと併用して投与し、その効果について検討を行った。その結果、全例においてミゾリビン併用を行うことによって、プレドニゾロンの減量と良好な治療経過をたどった。またミゾリビンの内服法として、150mg/日内服する場合、50mgずつの均等内服法より朝100mg、夜50mgの1日2回投与する不均等内服法のほうがミゾリビン血中濃度の上昇を認め、有効であると考えた。

共同研究者

石井文人 久留米大学医学部皮膚科 助手

### A. 研究目的

天疱瘡を含め、多くの自己免疫性水疱症の治療はステロイド内服療法が基本であり、主にプレドニゾロン（以下 PSL）、ベタメタゾンが使われる。しかし、天疱瘡症例の中には初期治療に反応せず、病勢が進行する例や、ステロイドの副作用が強く出てしまう例をしばしば経験する。そのような場合、試みられる治療法としてメチルプレドニゾロンのパルス療法や、アザチオプリン、シクロホスファミドなどの免疫抑制剤の併用また血漿交換療法の併用などが挙げられる。いままでにも国内外に多くの combination therapy の報告があり、その有効性も示されている。

今回、尋常性天疱瘡（pemphigus vulgaris：以下 PV）患者を対象に、ステロイド剤とミゾリビンの併用療法を施行し、その反応性と有効性（皮膚・粘膜病変部の改善、ステロイド剤の減量）、また経時的に抗 Dsg1、Dsg3 抗体価およびミゾリビン血中濃度を測定しその推移について検討した。

### B. 研究方法

#### 1. 患者

1998年から2004年までの6年間に久留米大学病院皮膚科においてミゾリビンを用いて治療した PV 3例を対象とした。PV の診断は、臨床症状、病理組織学的、免疫組織学的所見に基づき行った。重症度判定には稀少難治性疾患調査研究班の天疱瘡重症度判定基準に準じた。またミゾリビンを投与する際、その薬剤血中動態観察も含めて、本研究意義・方法、予想される効果および副作用など試験内容を十分に説明し、同意が得られた患者を対象とした。

#### 2. 投与状況

ミゾリビン（ブレディニン®）は全例において PSL と併用した。ミゾリビンの1日投与量は150mgであり、3症例において、朝100mg、夜50mgの1日2回投与の不均等内服投与を行った。症例1と3では併用当初は均等内服し、経過途中から不均等内服に変更した。症例2では併用当初から不均等内服を行った。また症例1と3ではミゾリビン内服併用の他に血漿交換療法や DDS 内服を一時併用した。

### C. 研究結果

#### 1. 患者背景

対象症例の背景を表1に示す。3症例すべて粘膜皮膚型 PV で重症度は中等症であ

った。いずれも病理組織学的に基底層直上に棘融解性の表皮内水疱を示し、蛍光抗体間接法により血中抗表皮細胞膜抗体を検出した。ELISA法では抗Dsg1、3抗体価がともに陽性であり高値を示した。

2. 治療経過 各症例の臨床経過を示す。

症例1：39歳、男性。中等症の粘膜皮膚型PVとして、前医から続いているミゾリビン150mg/日の均等内服を併用しながら、PSL30mg/日内服に血漿交換療法を22回施行した。皮疹は軽快したため、PSL内服を漸減しミゾリビンは中止した(図1—①)。しかしPSL15mg/日では水疱、びらんの新生を繰り返し、DDS50mg/日の併用を開始し、その後ミゾリビンを再開しても水疱の新生・口腔内びらんは続いた(図1—②)。経過の途中でミゾリビンの不均等内服に変更し、増悪時に再び計8回の血漿交換療法を施行するが、現在PSL15mg/日、ミゾリビン150mg/日を維持し、若干の皮疹の新生はあるものの増悪傾向はない(図1—③)。

症例2：44歳、男性。中等症の粘膜皮膚型PVと診断し、PSL30mg/日の内服開始により若干病勢はおちついたものの、皮疹の新生は続いた。そこでミゾリビン150mg/日(朝100mg、夜50mgの1日2回投与内服)を併用した。皮疹・粘膜症状は急速に消退し、現在PSL5mg/日、ミゾリビン100mg/日にて経過観察中であるが色素沈着を残すのみであり、経過は良好である(図2)。

症例3：36歳、男性。症例1、2同様、病理組織、免疫学的検査により、中等度の粘膜皮膚型PVと診断しPSL30mg/日の内服を開始したが、当初、入退院と軽快増悪を繰り返し、臨床症状の改善が十分ではなく、ミゾリビン150mg/日内服併用を開始した(図3—①)。途中で朝100mg、夜50mgの1日2回投与の不均等法で皮疹の改善がみられ、現在PSL15mg/日、ミゾ

リビン150mg/日内服で口腔内病変は軽快傾向にある(図3—②)。

#### D. 考察

ミゾリビンは、糸状菌(*Eupenicillium brefeldianum*)の培養液より単離された抗カビ作用を有する抗生物質で、IMP(inosine monophosphate) dehydrogenaseの阻害によりDNA合成を抑制する免疫抑制作用をもっている。またミゾリビンの効果は血中濃度に依存していることが示唆されており、その有効な使用方法として、今回われわれは朝100mg、夜50mgの1日2回投与という不均等内服法を行った。症例1、3ではその効果を期待して途中から、症例2では併用当初から行った。50mg3回の均等投与の期間と朝100mg、夜50mgの不均等投与の期間を比較すると、明らかにミゾリビン血中濃度の上昇を認めた(表2)。不均等投与時の平均ミゾリビン血中濃度は3症例いずれも有効域と思われる値を示した。また血中濃度の上昇に伴い、臨床症状の軽快とPSLの減量をすることができ有効であると考えた。副作用については3例とも骨髄抑制や肝・腎機能障害など認めなかった。

また、PVでは、その病勢とELISA法の抗Dsg抗体価のindex値はよく相関することが知られている。しかし、抗Dsg抗体が症状に相関しない症例報告もいくつか散見される。このような場合、抗体の病的意義の有無によることがひとつの理由として挙げられる。症例1と3でも抗Dsg抗体価はステロイド減量、皮疹が軽快したにもかかわらず、高値を示しており、抗体価の変動と皮膚症状は相関しているとはいえない(表3)。一方、症例2では、抗Dsg抗体価は臨床症状・病勢に反映して低下を認めた。皮疹と抗体価が相関しない症例は未だ数少ないが、今後の症例報告の蓄積とそのメカニズムの解明が待たれる。

## E. 結論

今後ミゾリビン投与の際、不均等内服は血中濃度をあげることに於いて有効であり、試みるべき方法のひとつと考えた。

## F. 健康危険情報

該当なし。

## G. 研究発表 (平成17年度)

### 1. 論文発表

#### 英語論文

1. Raap U, Volker B, Petering H, Hashimoto T, Zillikens D, Kapp A, Werfel T: Successful treatment of subcorneal pustular type of IgA pemphigus. **Hautarzt**. 56(1):66-70, 2005 (German)
2. Seishima M, Oda M, Oyama Z, Yoshimura T, Yamazaki F, Aoki T, Nei M, Hashimoto T: Antibody titers to desmogleins 1 and 3 in a patient with paraneoplastic pemphigus associated with follicular dendritic cell sarcoma. **Arch Dermatol** 140(12):1500-1503, 2004
3. Ono F, Kumano K, Terahara K, Yasumoto S, Hashimoto T, Shoji S: A case of pustular psoriasis associated with drug-induced adrenal cortical hypofunction. **Proceedings for the 19th Annual Meeting for the Japanese Society for Psoriasis Research**, Yamagata, Japan, September 4-5, 2004, pp62-63, 2004
4. Takahashi Y, Rouan F, Uitto J, Ishida-Yamamoto A, Iizuka H, Owaribe K, Tanigawa M, Ishii N, Yasumoto S, Hashimoto T: Plectin deficient epidermolysis bullosa simplex with 27-year-history of muscular dystrophy. **J Dermatol Sci**. 37(2):87-93, 2005
5. Duhieu S, Laperdrix C, Hashimoto T, LeBitoux M-A, Haftek M: Desmosome-binding antibody KM48 recognises an extracellular antigen different from desmosomal cadherins Dsg 1-3 and Dsc 1-3. **Eur J Dermatol**. 15(2):80-84, 2005
6. Hamada T, Hashimoto T: A Japanese case of dermatitis herpetiformis with facial and palmar lesions. **Clin Exp Dermatol** 30(3):298-300, 2005
7. Hamada T, Kawano Y, Szczecinska W, Wozniak K, Yasumoto S, Kowalewski C, Hashimoto T: Novel keratin 5 and 14 gene mutations in patients with epidermolysis bullosa simplex from Poland. **Arch Dermatol Res** 296:577-579, 2005
8. Tashiro H, Arai H, Hashimoto T, Takezaki S, Kawana S: Pemphigoid nodularis: two case studies and analysis of autoantibodies before and after the development of generalized blistering. **J Nippon Med Sch** 72(1):60-65, 2005
9. Dainichi T, Takeshita H, Moroi Y, Urabe K, Yoshida M, Hisamatsu Y, Komai A, Duan H, Koga T, Hashimoto T, Furue M: Cicatricial pemphigoid with autoantibodies against the laminin 5 gamma 2 subunit. **Eur J Dermatol** 15(3):189-193, 2005
10. Hamada T, Ishii N, Karashima T, Kawano Y, Yasumoto S, Hashimoto T: The common KRT9 gene mutation I a Japanese patient with epidermolytic palmoplantar keratoderma and knuckle

- pad-like keratoses, **J Dermatol** 32(6):500-502, 2005
11. Shinojima Y, Ochiai T, Kawamura A, Arakawa H, Fukuda K, Hashimoto T: A case of bullous pemphigoid associated with auto-antibodies targeting antigenic sites other than the NC16a domain of BP180. **Clin Exp Dermatol** 30(5):503-505, 2005
  12. Bruckner AL, Fitzpatrick JE, Hashimoto T, Weston WL, Morelli JG: Atypical IgA/IgG Pemphigus Involving the Skin, Oral Mucosa, and Colon in a Child: A Novel Variant of IgA Pemphigus? **Pediatr Dermatol** 22(4):321-327, 2005
  13. Osawa M, Demitsu T, Toda S, Yokokura H, Umemoto N, Yamada T, Yoneda K, Kakurai M, Yoshida M, Hashimoto T: A Case of Mixed Bullous Disease of Epidermolysis bullosa acquisita and Linear IgA Bullous Dermatitis. **Dermatology** 211(2):146-148, 2005
  14. Katagata Y, Takahashi M, Horiuchi Y, Takeda H, Kondo S, Tezuka T, Hashimoto T: Immunoelectron microscopy of keratin filaments in cultured malignant melanomas and squamous cell carcinomas. **Yamagata Med J** 23(2):117-124, 2005
  15. Kurokawa M, Koketsu H, Oda Y, Nagamine H, Toyama T, Hashimoto T, Setoyama M: A case of pemphigus vulgaris accompanied by multiple myeloma. **Int J Dermatol** 44(10):873-875, 2005
  16. Motegi S, Abe M, Tamura A, Ishii N, Hashimoto T, Ishikawa O: Childhood bullous pemphigoid successfully treated with diaminodiphenyl sulfone. **J Dermatol** 32(10):809-812, 2005
  17. Morizane S, Yamamoto T, Hisamatsu Y, Tsuji K, Oono T, Hashimoto T, Iwatsuki K: Pemphigus vegetans with IgG and IgA antidesmoglein 3 antibodies. **Br J Dermatol** 153(6):1236-1237, 2005
  18. Nakama T, Natsuaki Y, Hamda T, Kurose K, Karashima T, Yasumoto S, Hashimoto T: Presentation of four cases of effective use of Fibrast spray and of one cautionary case. The proceedings of the Scientific Session of the 2<sup>nd</sup> Meeting of Fibroblast Growth Factor (FGF) Research Group in Fukuoka, Medical Consultation and New Remedies (Shinryo to Shinyaku) 42(10):1119-1120, 2005
  19. Marinovic B, Bukvic Mokos Z, Basta-Juzbasic A, Lakos Jukic I, Loncaric D, Hashimoto T, Pasic A: Atypical clinical appearance of pemphigus vulgaris on the face: case report. **Acta Dermatovenerol Croat** 13(4):233-6, 2005
  20. Yoshida M, Hamada T, Amagai M, Hashimoto K, Uehara R, Yamaguchi K, Imamura K, Okamoto E, Yasumoto S, Hashimoto T: Enzyme-linked immunosorbent assay using bacterial recombinant proteins of human BP230 as a diagnostic tool for bullous pemphigoid. **J Dermatol Sci** 41(1):21-30, 2006

日本語論文

1. 河瀬 歩、相馬良直、山前恵美子、溝口昌子、橋本 隆：Clinicolor: Linear Epidermolytic hyperkeratosis の 1 例、皮膚臨床、47(2):145-146, 2005
  2. 舩 明子、笹井 収、菊池克子、相場節也、駒井礼子、橋本 隆：ステロイドを含む多剤併用療法に反応した癩痕性類天疱瘡の 1 例、臨皮、59(2):132-134, 2005
  3. 辛島正志、橋本 隆：BPAG1(BP230) と中間径線維との細胞生物学的相互作用の検討、第19回角化症研究会記録集(2004年 8 月 7 日開催、東京商工会議所)、pp.28-31, 2005
  4. 石井文人、濱田尚宏、安元慎一郎、橋本 隆：水疱型先天性魚鱗癬様紅皮症の 1 例、第19回角化症研究会記録集(2004年 8 月 7 日開催、東京商工会議所)、pp.70-72, 2005
  5. 橋本 隆：水疱性類天疱瘡における B P180 ELISA 値、臨皮、59(5増):62-65, 2005
  6. 熊野仁子、石井文人、三原 典、濱田尚宏、前山泰彦、安元慎一郎、橋本 隆：腫瘍随伴 性天疱瘡—胸腺種を合併し軽症に経過した症例、皮膚病診療、27(6):667-670, 2005
  7. 橋本 隆：アンケート・聞き慣れない病名、intercellular IgA vesiculopustular dermatosis (IAVPD)、皮膚病診療、27 (増刊号):144, 2005
  8. 橋本 隆：水疱症、臨床診断に苦渋する 100 の外来皮膚疾患。編集：宮地良樹、メディカルビュー社、pp.230-231、2005年 9 月15日
  9. 渡邊理枝、山本真里、北見 周、末木博、飯島正文、駒井礼子、橋本 隆：Linear IgA bullous dermatosis (lamina lucida型)の 1 例—治療に関する考察を加えて—、西日皮膚、67(4): 334-336, 2995
  10. 橋本 隆：尋常性天疱瘡、日本医師会雑誌 特別号「実践 皮膚病変のみかた」、134 (特別号(2))、S118
  11. 橋本 隆：落葉状天疱瘡、日本医師会雑誌 特別号「実践 皮膚病変のみかた」、134 (特別号(2))、S119
  12. 橋本 隆：12. 水疱症、日本皮膚科白書、第 2 版(第 103 回日本皮膚科学会総会記念改訂版) 発行人 理事長 玉置邦彦、日本皮膚科学会、金原出版、pp135-143、2005年 6 月25日
  13. 越後岳士、大石直人、白崎文朗、稲沖真、佐藤伸一、竹原和彦、長谷川洋一、橋本 隆：高齢者に発症した抗 p 200 類天疱瘡の 1 例、臨皮、59:1076-1079, 2005
  14. 川崎 奏、小原 理、河 陽子、大岡志穂、山前恵美子、松永るり、保坂恵理、相馬良直、橋本 隆、溝口昌子：後天性表皮水疱症の 1 例、皮膚臨床47 (13):1849-1852, 2005
  15. 石井文人、橋本 隆：尋常性天疱瘡患者におけるプレドニゾロンとミゾリピン併用療法の治療経験、西日皮膚、67(6):624-628, 2005
- H. 知的所有権の出願・登録状況 (予定を含む)  
該当なし。

図とその説明

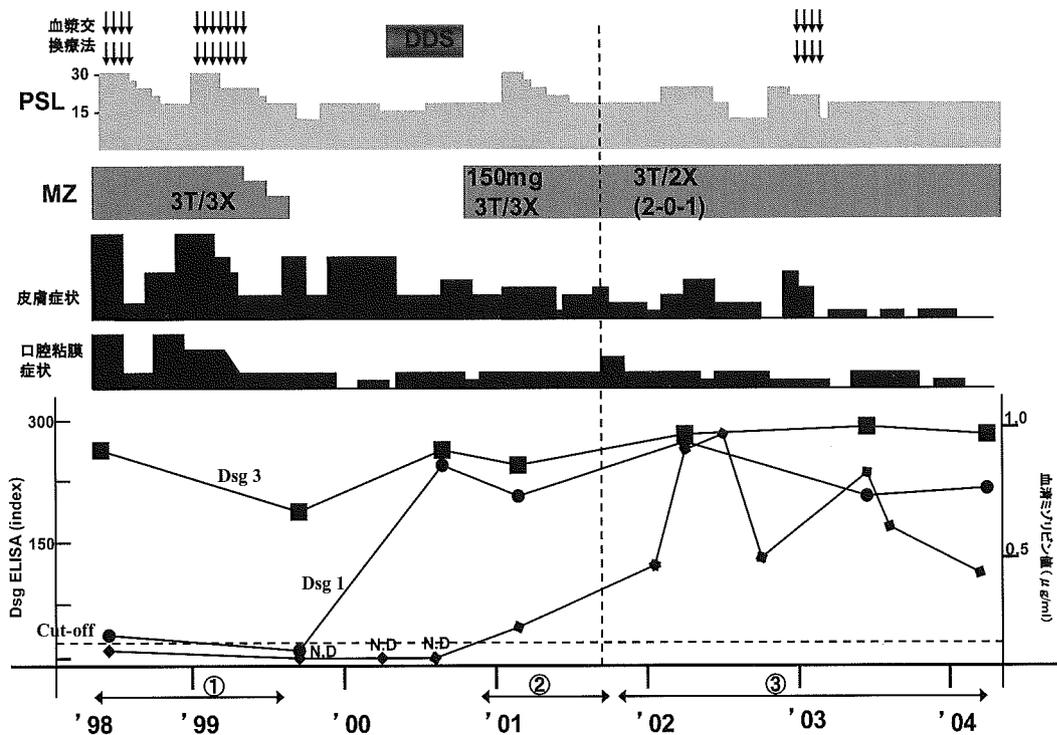


図1 症例1における治療経過、抗 Dsg 抗体価とミゾリビン血中濃度の推移  
MZ, ミゾリビン (mizoribine)

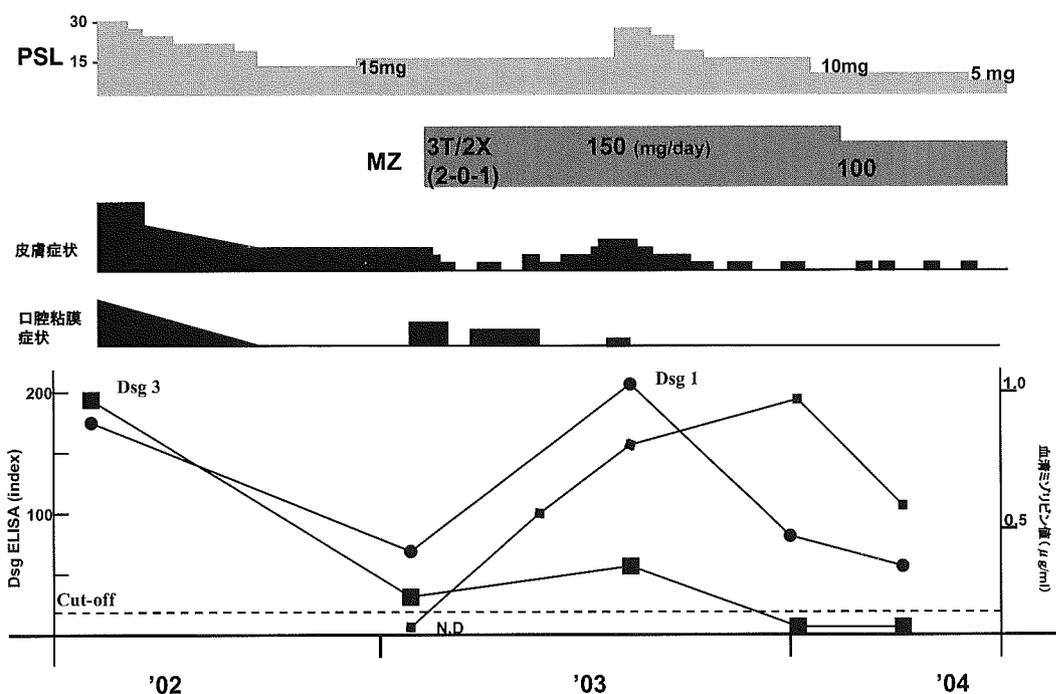


図2 症例2における治療経過、抗 Dsg 抗体価とミゾリビン血中濃度の推移

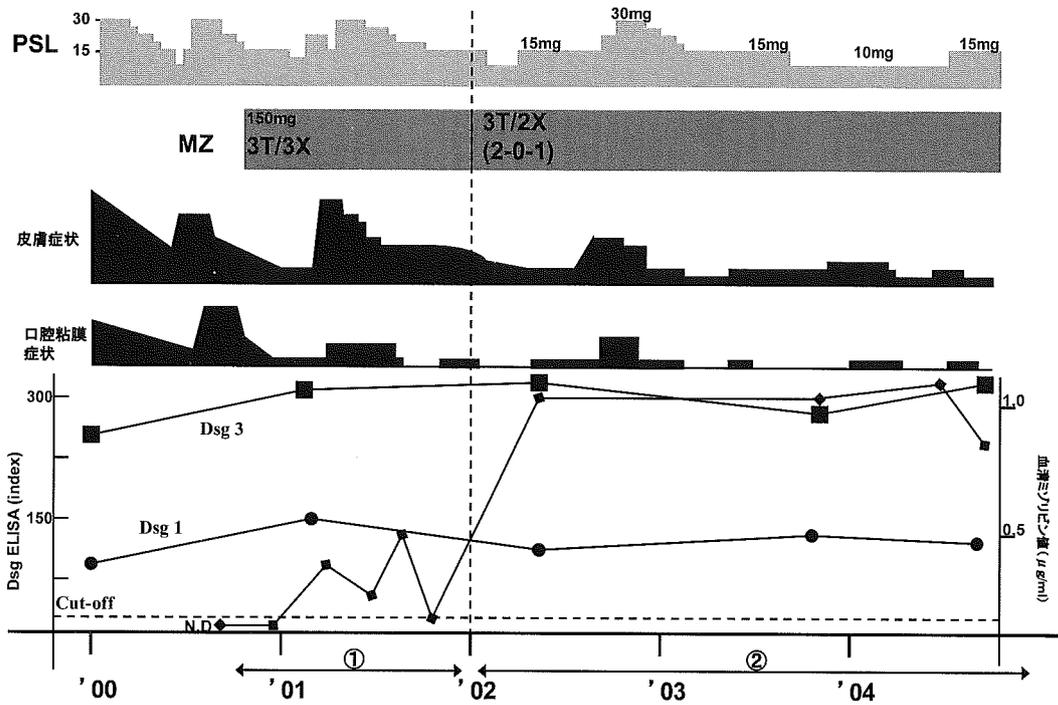


図3 症例3における治療経過, 抗Dsg抗体価とミゾリビン血中濃度の推移

MZ, ミゾリビン (mizoribine)

■ 抗Dsg 3抗体/ELISA (index値)

● 抗Dsg 1抗体/ELISA (index値)

◆ 血清ミゾリビン値 (μ g/ml)

(N.D, not detected : 0.05 μ g/ml 未満)

表 1 患者背景

	症例 1	症例 2	症例 3
病型	PV-MC	PV-MC	PV-MC
年齢	39歳,男性	44歳,男性	36歳,男性
重症度	中等症	中等症	中等症
その他の併用療法	血漿交換 DDS	—	DDS
プレドニゾン 初期量/日	30mg	30mg	30mg
ミゾリビン開始直前 のステロイド量/日	30mg	15mg	20mg
2004年8月時の プレドニゾン量/日	15mg	5mg	15mg

表 1 患者背景

PV-MC : mucocutaneous type PV (粘膜皮膚型 PV)

表 2 ミゾリビンの血中濃度の推移

	症例 1	症例 2	症例 3
ミゾリビン投与直前	N.D	N.D	N.D
ミゾリビン(50mg) 3T/3X 投与時の平均値	0.16 $\mu$ g/ml	-	0.23 $\mu$ g/ml
ミゾリビン(50mg) 不均等3T/2X (2-0-1) 投与時の平均値	0.66 $\mu$ g/ml	0.76 $\mu$ g/ml	0.85 $\mu$ g/ml
最大値	0.91 $\mu$ g/ml (不均等内服投与10ヵ月後)	0.97 $\mu$ g/ml (不均等内服投与11ヵ月後)	1.16 $\mu$ g/ml (不均等内服投与26ヵ月後)

表 2 ミゾリビン血中濃度の推移

N.D, not detected : 0.05  $\mu$  g/ml 未満