



図1 稀少難治性皮膚疾患の疫学研究 (予防要因、予後要因調査)

表1 膿疱性乾癬のリスク因子(Pub Med)途中経過

No	発行年	対象疾患	研究方法	言語	対象数	リスク因子
3)	2010	乾癬	Review. 記述疫学	英語	419例	-
4)	2009	GPPを含む乾癬	記述疫学	英語	607例	-
5)	2009	AGEP	レビュー	英語	-	薬剤
6)	2007	AGEP	症例対照研究	英語	症例97: 対照1009	薬剤
7)	2006	GPP: Zumbusch	後ろ向き記述疫学	英語	99例	悪化のリスク: 治療 (High use of dermatocorticosteroids, Low use of retinoids)
8)	2006	乾癬	記述疫学	英語	61例	誘発因子: 上気道感染、ストレス
9)	2004	GPP	記述疫学	英語	22人	-
10)	2003	AGEP		英語		
11)	2003	乾癬	記述疫学	英語	全国148の皮膚科28628症例	
12)	2001	乾癬		ポルトガル		リスク: 薬、精神的外傷、アルコール、感染とストレス 予防: 適度な日光浴
13)	1998	SAPHO症候群	後ろ向き調査	英語	GPP (25例含む)	
14)	1998	乾癬	記述疫学、質問票調査	英語	韓国870例の乾癬患者	冬、ストレス (精神的ストレスで有意に悪化 p<0.01) 予防要因: 夏、日光
15)	1997	GPP	記述疫学	英語	1989-1993年の4年間の膿疱性乾癬28例	感染症、薬剤、ステロイド内服の中止、anthrallinとステロイド内服の長期使用 限局性: 喫煙
16)	1996	AGEP	Review.	英語		ウイルス感染や紫外線と関連なし
17)	1996	GPP	全国調査	英語	GPP 541例 (Zumbusch/急性208例)	乾癬既往なし: 感染症 乾癬既往あり (HLA A1, B37, DRw10↑): コルチコステロイド治療後
18)	1991	GPPを含む重症乾癬	後ろ向き記述	仏語	992乾癬症例中GPP死亡18例	死亡リスク: 代謝異常等 (感染症やアミロイドーシス)、副作用

表2 膿疱性乾癬のリスク因子(医中誌)途中経過

No	発行年	対象疾患	研究方法	言語	対象数	リスク因子
19)	2010	GPP	症例報告	和文	1例	GPP治療による高ビリルビン血症リスク：シクロスポリン
20)	2009	GPP	症例報告	和文	3例	GPP治療による腎障害のリスク：シクロスポリン
21)	2002	小児GPP	記述疫学	和文	19例	誘発・悪化因子：感染症、ステロイド、ストレス？、妊娠？
22)	2001	乾癬	記述	英語	28628例	乾癬悪化要因：季節、ストレス、精神的な外傷、感染症、食品、薬（インドメタシンとβブロッカー除く）、妊娠、日光、βブロッカー、インドメタシン
23)	1999	GPP	症例対照研究	和文	症例47, 対照7824	喫煙、蕁麻疹既往、塩分高い食品嗜好、脂肪食摂取多、睡眠時間短、朝食欠

表3 膿疱性乾癬(GPP)の各リスクと研究方法(途中経過)

	症例報告	疫学研究		
		記述疫学	症例対照研究	コホート研究
発症リスク	-	乾癬既往なし：感染症 乾癬既往あり（HLA-A1, B37, DRw10↑）：コルチコステロイド治療後	リスク因子：喫煙、蕁麻疹既往、塩分高い食品嗜好、脂肪食摂取多、睡眠時間短、朝食欠 予防因子：飲酒、野菜・果物摂取、干魚摂取	-
悪化リスク	治療（シクロスポリン）による高ビリルビン血症	治療（High use of dermatocorticosteroids, Low use of retinoids） 誘発・悪化因子：感染症、ステロイド	-	-
死亡リスク（重症乾癬）	-	代謝異常等（感染症やアミロイドーシス）、副作用	-	-

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

稀難皮膚研究班の研究成果を元に現行膿疱性乾癬・臨床調査個人票を見直す

研究分担者 照井 正 日本大学医学部皮膚科学系皮膚科学分野 教授

研究要旨 本研究班の膿疱性乾癬（GPP）診療分科会では、研究成果を元に2006年にGPP診療ガイドラインの改訂作業を行い、日本皮膚科学会のホームページと日本皮膚科学会雑誌に公表した。このガイドラインには、研究班で再考された診断基準と重症度分類、そして、新たに治療アルゴリズムを追加した。さらに、2010年から適応追加されたTNF α 阻害薬を組み入れた治療指針を日本皮膚科学会ホームページと学会誌（簡略版）に公表した¹⁾。一方、この期間中に本研究班分担者の一人である黒沢は現行の旧臨床調査個人票で得られた資料を使って、改訂診療ガイドラインの診断基準、重症度分類に照らし合わせて、一連の疫学調査を行った。その過程で浮き彫りにされた問題点を解決できるよう配慮しながら、私たちは臨床調査個人票の改訂案を作成した。この改訂臨床調査個人票によるデータ解析と比較により、より正確な診断と重症度分類が可能であり、全国規模の疫学調査が可能となる重要なデータソースとなると考える。

共同研究者

GPP診療分科会

黒沢美智子 順天堂大医学部衛生学

岩月 啓氏 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科皮膚学分野

小澤 明 東海大学医学部皮膚科

武藤 正彦 山口大学医学部皮膚科

池田 志孝 順天堂大学医学部皮膚科

小宮根真弓 自治医科大学皮膚科

山西 清文 兵庫医科大学医学部皮膚科

佐野 栄紀 高知大学医学部皮膚科

金蔵 拓郎 鹿児島大学医学部皮膚科

馬淵 智生 東海大学医学部皮膚科

GPP患者のQOL向上を目指す、2) よりよい治療法の開発を目指したGPPの病因・病態の解明研究の2つがあげられる。上記1)の疫学調査としてa) 班会議で大河原らを中心に企画された全国調査、b) 臨床調査個人票を元にした疫学調査、c) 本研究班員による前向き調査（レジストリー調査）などがあげられる。

本研究の目的は、b) 臨床調査個人票を元にした疫学調査として、2006年に発表したGPP診療ガイドラインに沿った診断と重症度分類が可能であるかを検討すること、さらに、問題点があるとすればどのように臨床調査個人票を改訂したら今度の調査活動により有用な結果が得られるかを検討することである。

A. 研究目的

稀少難治性皮膚疾患研究班は2006年にGPP診断基準の改定（資料1）と重症度判定基準（資料2）を作成した。さらに2011年に適応追加されたTNF α 阻害薬を組み入れた治療指針を公表した¹⁾。班会議（GPP診療分科会）での取り組みとして、1) 疫学調査などを通してGPP診療の実態を明らかにし、

B. 研究方法

稀少難治性皮膚疾患研究班と特定疾患の疫学に関する研究班の共同でGPPの全国疫学調査が、昭和63（1988）年度（1982年～1986年の患者対象）²⁾と平成6（1994）年度（1987

年～1993年の患者対象)³⁾に実施された。また、平成15年から難病指定の申請時に提出される臨床調査個人票データが都道府県で入力され、オンラインで厚労省に集積されるシステムが稼働し、研究班で分析可能となった。

本研究班の研究分担者である黒沢らの研究により、過去2回の全国調査結果²⁾³⁾とH16年(2004)の臨床調査個人票データを用いて三度の疫学調査が行われ、それらの結果が本研究班で報告された³⁻⁵⁾。調査対象となったのは、1988年全国調査の208例と1994年全国調査の2次調査244例と臨床調査個人票データは、入力率が最も高かったH16(2004)年の976例の中から関節性乾癬、掌蹠膿疱症を除いた971例(新規88例、更新883例)である。

これらの調査結果と2011のGPP診療ガイドライン簡略版の記載内容とを比較検討しながら問題点を明らかにして、改訂臨床調査個人票(案)に反映することにした。

各問題点をどのように改訂臨床調査個人票に反映するか対策については次の「結果・考察」で黒丸印で示した。

C. 研究結果、および D. 考察

H19年度の黒沢らの調査研究³⁾で、全国調査とH16年度のデータをもとに、年齢・性別分布、発症分布、診断名、日常生活状況、経過、再発の回数、各症状の有症状割合、発症誘因、組織検査状況、治療とその効果などが検討された。今後、これらの結果は改訂臨床調査個人票を元に比較検討する基礎データになると考える。この検討で、改訂臨床調査個人票に反映すべき問題は見つからなかった。

H20年度の黒沢らの研究⁴⁾で、2006年GPP診療ガイドラインに基づいた旧臨床調査個人票で集積されたデータ解析が可能かが検討された。入力率の高かったH16年度新規登録患者(90例)データを用いて行われた。この際、いくつかの問題点が浮き彫りにされた。

受給を決定するための診断基準と治療選択や効果を観察する上で指標となる重症度分類について見てみると、当然ではあるが基本的

な問題点は2006年に稀少難治性皮膚疾患研究班で改訂された1)診断基準、2)重症度が現行の旧臨床調査個人票にはまだ反映されていないことである。

1) 診断基準について

診断基準の分類として資料1に示したように2006年GPP診療ガイドラインの診断基準主要項目を4つ満たす場合は「確実例」とし、2)と3)を満たす場合は「疑い例」とした。黒沢らは、H20年度の報告⁵⁾でH16年臨床調査個人票の新規データ90例を分析対象とし、診断分類(「確実例」、「疑い例」、「その他:左記以外」)を試みた。

診断基準の項目を臨床調査個人票の入力項目と比較してみると、主要項目2)3)4)については旧臨床調査個人票でも判断できる項目であった。しかし、診断基準1)については、臨床調査個人票に「発熱」の項目はあるが、「全身倦怠感」の項目がなかったため、項目1)を満たす症例のすべてを抽出できなかった可能性が指摘された。

●対策:改訂臨床調査個人票では「倦怠感」の項目を追加した(資料3)。

黒沢はこの報告書⁵⁾で、GPP臨床調査個人票(H16年)の新規90例の診断名を確認したところ関節性乾癬1例、掌蹠膿疱症1例が含まれており、この2例を除外し、88例について検討した。ここでの問題点は受給対象とならない診断症例が含まれている事実である。すなわち、関節性乾癬は必ずしも膿疱を伴わない疾患であり、むしろ尋常性乾癬に伴う頻度が高い。また、膿疱形成が掌蹠に局限し、全身症状も少ない掌蹠膿疱症患者が受給を受けてたからである。診断基準の補足として記載がある「除外すべき疾患」(資料1)に掌蹠膿疱症が含まれていないのが理由の一つと考えられた。

●対策:改訂臨床調査個人票では「掌蹠膿疱症は除外できるか」のチェック項目を追加した(資料3)。また、今後、ガイドラインを改訂する際に掌蹠膿疱症を除外診断に入れる。

この報告書⁵⁾の結果を再掲すると、主要項目1)+2)+3)+4)を満たす「確実例」は15例(17%)、主要項目2)+3)のみを満たす「疑い例」は44例(50%)、「それ以外」が29例(33%)であった。「全身倦怠感」の情報があれば、「疑い例」が「確実例」となる可能性はあるが、「それ以外」の割合には影響しない。ここでの問題点は「その他」に分類された症例の割合が新規症例全体の1/3にも及んでいる。この1/3の症例において、調査票からのデータのみでは、除外すべき疾患に含まれる「尋常性乾癬の一過性膿疱化」と「膿疱型薬疹(acute generalized exanthematous pustulosis: AGEPを含む)」が除外できない。

●対策：改訂臨床調査個人票では、「尋常性乾癬の一過性膿疱化は除外できるか」と「膿疱型薬疹(acute generalized exanthematous pustulosis: AGEPを含む)は除外できるか」を除外診断チェック項目として追加した(資料3)。

2) 重症度分類について

新しく作成された重症度判定(資料2)では、A. 皮膚症状の評価とB. 全身症状・検査所見の2つに分けて、各項目をスコア化し、点数の合計で総合的な重症度が評価している。しかし、現行の旧臨床調査個人票には「膿疱を伴う紅斑面積」、「浮腫性紅斑面積」の項目が入っていなかった。

●対策：改訂臨床調査個人票では、「膿疱を伴う紅斑面積」、「浮腫の面積」の項目を追加した(資料3)。

検査値の項目をみると、「白血球、CRP、血清アルブミン値」はスコア分類が可能であった。しかし、「紅斑」と「発熱」のスコア基準が新ガイドラインと旧臨床調査個人票では異なっていた。

●対策：改訂臨床調査個人票では、「紅斑」と「発熱」のスコア基準を新ガイドラインの基準に併せて変更した(資料3)。

3) 治療の選択

H16年新規データ88例を分析対象とした治療の選択結果⁵⁾を再掲する。内服治療では免疫抑制剤シクロスポリン48例(54.5%)が最も多く選択されており、エトレチナート38例(43.2%)、副腎皮質ステロイド30例(34.1%)が選択され、メトトレキサートの使用は4例(4.5%)と少なかった。

これまで2回行われた全国調査結果^{2), 3)}とH16年の治療を比較するとエトレチナートの使用頻度がやや低下して、シクロスポリンの使用頻度が増えている傾向にある⁶⁾。

2010年から生物学的製剤が使用できるようになったが、どれくらいの患者で使用されているか、重症度別で使用頻度が異なるか、既存治療に比較して効果はどうか、長期的な効果はどうか、などを検討する必要がある。

●対策：改訂臨床調査個人票では、生物学的製剤の項目を加えた(資料3)。

これまでのGPP研究報告では、数例程度の症例報告が散見されるのみであったが、改訂臨床調査個人票を使って得られる生物学的製剤などの調査結果は世界でも類例のない多数のGPP患者結果の調査解析結果を公表できると考える。

E. 結論

2006年診断基準と重症度を基つき臨床調査個人票(H16)データの解析の結果^{3), 4), 5)}を参考に、問題点を探して、改訂臨床調査個人票(案)を作成した。今後、より確実な診断と重症度判定が可能となり、今後のデータが全国レベルでの確度の高い疫学情報を与えてくれる。国内の患者ばかりでなく世界のGPP患者診療の役立つ基本情報となり、QOL向上につながるであろう。

参考文献

- 1) 岩月啓氏(岡山大学 大学院医歯薬学総合研究科皮膚科学) 照井 正 小澤 明
小宮根真弓 梅澤慶紀 鳥居秀嗣 中西 元、原 弘之、馬淵智生、青山裕美、

北島康雄 日本皮膚科学会 日本皮膚科学会ガイドライン 膿疱性乾癬(汎発型)診療ガイドライン2010 TNF α 阻害薬を組み入れた治療指針(簡略版). 日本皮膚科学会雑誌120(4): 815-839, 2010.

- 2) 大河原章、北村清隆、小林 仁、安田秀美、芝木晃彦. 汎発性膿疱性乾癬 - 第2次、3次全国調査における治療の検討. 厚生省特定疾患稀少難治性皮膚疾患調査研究班平成2年度研究報告書. pp11-40, 1991.
- 3) 大河原章、小林 仁、川嶋利瑞、稲葉裕、川村 孝. 膿疱性乾癬全国調査の結果 - 治療の検討 -. 厚生省特定疾患稀少難治性皮膚疾患調査研究班平成7年度研究報告書. pp157-161, 1990.
- 4) 黒沢美智子. 膿疱性乾癬の臨床疫学像 - 臨床調査個人票データを用いて -. 厚生労働科学研究費補助金(難治性疾患克服研究事業)平成20年度報告書.
- 5) 黒沢美智子. 膿疱性乾癬新規臨床調査個人票の重症度構成項目別治療内容とその効果. 厚生労働科学研究費補助金(難治性疾患克服研究事業)平成20年度報告書
- 6) 黒沢美智子. 膿疱性乾癬の治療内容の推移 過去に行われた全国調査と臨床調査個人票の比較. 厚生労働科学研究費補助金(難治性疾患克服研究事業)平成21年度報告書

F. 健康危険情報

特記すべきことなし。

G. 研究発表(平成23年度)

論文発表

1. Goto H, Hara H, Takayanagi T, Terui T. Coexistence of papuloerythroderma of Ofuji and acrokeratosis paraneoplastica (Bazex syndrome) preceding the diagnosis of primary hepatocellular carcinoma. *Int J Dermatol* 50(11): 1393-6, 2011.
2. Hiruma A, Ikeda S, Terui T, Ozawa M, Hashimoto T, Yasumoto S, Nakayama J, Kubota Y, Iijima M, Sueki H, Matsumoto Y, Kato M, Akasaka E, Ikoma N, Mabuchi T, Tamiya S, Matsuyama T, Ozawa A, Inoko H, Oka A. A novel splicing variant of CADM 2 as a protective transcript of psoriasis. *Biochem Biophys Res Commun* 412: 626-32, 2011.
3. Miyazaki-Nakajima K, Hara H, Terui T. Subungual trichoadenoma showing differentiation toward follicular infundibulum. *J Dermatol* 38: 1118-21, 2011.
4. Washio H, Fukuda N, Matsuda H, Nagase H, Watanabe T, Matsumoto Y, Terui T. Transcriptional inhibition of hypertrophic scars by a gene silencer, pyrrole - imidazole polyamide, targeting the TGF - β 1 promoter. *J Invest Dermatol* 131: 1987-1995, 2011.
5. Torii H, Nakagawa H; Terui T, Japanese Infliximab Study Investigators. Long - term study of infliximab in Japanese patients with plaque psoriasis, psoriatic arthritis, pustular psoriasis and psoriatic erythroderma. *J Dermatol* 38(4): 321-34, 2011.
6. Furue M, Yamazaki S, Jimbow K, Tsuchida T, Amagai M, Tanaka T, Matsunaga K, Muto M, Morita E, Akiyama M, Soma Y, Terui T, Manabe M. Prevalence of dermatological disorders in Japan: a nationwide, cross - sectional, seasonal, multicenter, hospital-based study. *J Dermatol* 38(4): 310-20, 2011.
7. Hayama K, Suzuki Y, Inoue T, Ochiai T, Terui T, Ra C. Gold activates mast cells via calcium influx through multiple H2O2-sensitive pathways including L-type calcium channels. *Free Radic Biol Med* 50(10): 1417-28, 2011.
8. Watanabe T, Yachi K, Ohta T, Fukushi-

- ma T, Yoshino A, Katayama Y, Shinojima Y, Terui T, Nagase H. Non-promoter hypermethylation of zygote arrest 1 (ZAR1) in human brain tumors. *Brain Tumor Pathol* 28(3) : 199-202, 2011.
9. Ishige T, Kikuchi K, Miyazaki Y, Hara H, Yoshino A, Terui T, Katayama Y, Kusama K, Nemoto N. Differentiation and apoptosis in pilomatrixoma. *Am J Dermatopathol* 33(1) : 60-4, 2011.
10. Suda-Takayanagi T, Hara H, Ohyama B, Hashimoto T, Terui T. A case of pemphigoid vegetans with autoantibodies against both BP180 and BP230 antigens. *J Am Acad Dermatol* 64(1) : 206-8, 2011.
10. 藤澤大輔、篠島由一、照井 正. 乾癬治療におけるエキシマライト療法の有効性. *Visual Dermatology* 10(8) : 819-821, 2011.
11. 大槻マミ太郎、照井 正、小澤 明、森田明理、佐野栄紀、高橋英俊、小宮根真弓、江藤隆史、鳥居秀嗣、朝比奈昭彦、根本 治、中川秀己、日本皮膚科学会生物学的製剤検討委員会. 日本皮膚科学会マニュアル 乾癬における生物学的製剤の使用指針および安全対策マニュアル (2011年版). *日皮会誌* 121(8) : 1561-1572, 2011.
12. 野村みずほ、洲崎玲子、石崎純子、田中勝、神戸克明、照井 正. 関節リウマチにアダリムマブ投与後より乾癬様皮疹を生じた1例. *臨床皮膚科* 65(7) : 509-513, 2011.

学会発表

1. Terui T. Pathophysiology of neutrophilic dermatoses - neutrophilic inflammation of the skin. Symposia : Neutrophilic Dermatoses. 22nd World Congress of Dermatology, May 24-29, 2011, Seoul.
2. 照井 正. 尋常性乾癬の病態と治療. 最

近のトピックス. 特別講演、日本皮膚科学会第205回熊本地方会、平成23年12月4日、熊本.

H. 知的所有権の出願・登録状況 (予定を含む)

1. 特許取得
該当なし
2. 実用新案登録
該当なし

- 1) 発熱あるいは全身倦怠感等の全身症状を伴う。
- 2) 全身または広範囲の潮紅皮膚面に無菌性膿疱が多発し、ときに融合し膿海を形成する。
- 3) 病理組織学的にKogoj海綿状膿疱を特徴とする好中球性角層下膿疱を証明する。
- 4) 以上の臨床的、組織学的所見を繰り返し生じること。

以上の4項目を満たす場合を膿疱性乾癬（汎発型）（確実例）と診断する。主要項目2)と3)を満たす場合を疑い例と診断する。

除外診断

- 1) 尋常性乾癬が明らかに先行し、副腎皮質ホルモン剤などの治療によてい一過性に膿疱化した症例は原則として除外するが、皮膚科専門医が一定期間注意深く観察した結果、繰り返し容易に膿疱化するしょうれいで、本性に含めた方がよいと判断した症例は、本症に含む。
- 2) circinate annular formは、通常全身症状が軽微なので対象外とするが、明らかに汎発性膿疱性乾癬に移行した症例は、本症に含む。
- 3) 一定期間の慎重な観察により角層化膿疱、膿疱型薬疹（acute generalized exanthematous pustulosisを含む）と診断された症例は除く。

資料1 膿疱性乾癬の診断基準

- A 皮膚症状の評価：紅斑、膿疱、浮腫（0-9）
 B 全身症状・検査所見の評価：発熱、白血球、血清CRP、血清アルブミン（0-8）
 ○重症度分類： 軽症 中等症 重症
 （点数の合計）（0-6）（7-10）（11-17）

A. 皮膚症状の評価	高度	中等度	軽度	なし
紅斑面積*	3点	2点	1点	0点
膿疱を伴う紅斑面積**	3点	2点	1点	0点
浮腫の面積**	3点	2点	1点	0点
* 体表面積に対する%（高度75%以上、中等度25以上75%未満、軽度25%未満）				
** 体表面積に対する%（高度50%以上、中等度10以上50%未満、軽度10%未満）				
B. 全身症状・検査所見スコア	2点	1点	0点	
発熱	38.5以上	37-38.5	37未満	
白血球数	15000以上	10000-15000	10000未満	
血清CRP値	7.0以上	0.3-7.0	0.3未満	
血清アルブミン値	3.0未満	3.0-3.8	3.8以上	

上記の合計で0-6点（軽症）、7-10点（中等度）、11-17点（重症）と分類する。

資料2 膿疱性乾癬の重症度判定

資料3 汎発性膿疱性乾癬・臨床調査個人票の改訂案は「IV 臨床調査個人票改訂版」を参照。

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

ステロイド治療抵抗性の天疱瘡患者および類天疱瘡患者、後天性表皮水疱症患者を
対象としたRituximabの効果・安全性の探索的研究

研究分担者 天谷雅行 慶應義塾大学医学部皮膚科学 教授
研究協力者 谷川瑛子 慶應義塾大学医学部皮膚科学 講師

研究要旨 リツキシマブは、Bリンパ球表面に特異的に発現するCD20抗原に結合し、B細胞を傷害する。近年本剤の水疱症に対する有効性が多数報告されているが、未だ適応が承認されている国はなく、本邦では使用できなかった。本研究は、ステロイド療法により臨床症状が改善しない天疱瘡患者、類天疱瘡患者、後天性表皮水疱症患者に対する、リツキシマブ投与の効果、安全性を評価するために自主臨床試験を行う。

共同研究者

宮本樹里亜、谷川瑛子、岩月啓氏、橋本 隆、
清水 宏

A. 研究目的

ステロイド療法に抵抗性の重症天疱瘡、類天疱瘡、後天性表皮水疱症患者におけるリツキシマブ（リツキサン注[®] 10mg/mL）の有効性・安全性を評価する。

B. 研究方法

この臨床試験を開始するにあたり、試験実施計画書、症例報告書を作成した。

適応は、尋常性天疱瘡、落葉状天疱瘡、類天疱瘡、後天性表皮水疱症患者で、PDAI（Pemphigus Disease Area Index）10点以上であり、PSL 1.0 mg/kg/dayを2週間以上投与してもPDAI10～15点である患者、またはPSL使用中の患者でPSL10mg/dayに減量するまでの間に、再燃、再発する患者を対象とする。治療はリツキシマブ375 mg/m²を、週1回、合計4回の点滴を入院下で行うこととする。

C. 研究結果

(1) 試験計画書の作成

慶應義塾大学医学部クリニカルリサーチセンターの協力のもと、試験計画書を作成した。第Ⅱ相、オープンラベル・介入試験とし、予定登録20例、登録期間3年、介入・追跡期間96週間（約2年間）、総研究期間5年とした。

参加施設は、慶應義塾大学病院皮膚科、岡山大学病院皮膚科、久留米大学病院皮膚科、北海道大学病院皮膚科とした。

(2) 試験開始

本試験第1例目は、難治性再発性の尋常性天疱瘡の患者であった。現在はリツキシマブ投与後12カ月経過している。投与前は、免疫抑制剤併用にてPSL 20mg/日から約8カ月間減量できなかったが、現在9mg/日まで減量できている。PDAIは6点から1点に、抗Dsg 3抗体はELISA Index 519から120に減少し、部分寛解の状態に達した。重篤な有害事象も起きていない。

第2例目は、難治性再発性の落葉状天疱瘡の患者であった。現在は投与後7カ月経過し、PSL 47mg/日から9.5mg/日まで減量できている。PDAIは23点から0点に減少し、抗Dsg 1抗体はELISA Indexは35

であったが、陰性化した。重篤な有害事象は起きていない。

D. 考察

近年海外では難治性水疱症に対するリツキシマブの有効性が多数報告されている。本剤により病勢のコントロール、寛解導入が期待でき、またステロイドの減量により、その副作用（骨粗鬆症・高血糖・高脂血症など）を軽減できると考えられる。本試験で難治性水疱症に対する本剤の有効性、安全性が確認できれば、保険適応拡大を目指したい。

E. 結論

ステロイド療法により臨床症状が改善しない天疱瘡患者、類天疱瘡患者、後天性表皮水疱症患者に対する、リツキシマブ投与の効果、安全性を評価するために自主臨床試験を実施している。既に2例を経験し、経過は良好であり、重篤な有害事象も発生していない。各種免疫抑制剤に抵抗性の難治性水疱症患者には、リツキシマブ治療の導入を積極的に検討すべきと考えた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表（平成23年度）

論文発表

1. Amagai M, Stanley JR : Desmoglein as a Target in Skin Disease and Beyond. J Invest Dermatol , Epub 2011.
2. Hata T, Nishifuji K, Shimoda K, Sasaki T, Yamada T, Nishikawa T, Koyasu S, Amagai M : Transgenic rescue of desmoglein 3 null mice with desmoglein 1 to develop a syngeneic mouse model for pemphigus vulgaris. J Dermatol Sci 63(1), 33-39, 2011.
3. Jennings JM, Tucker DK, Kottke MD, Saito M, Delva E, Hanakawa Y, Amagai M, Kowalczyk AP : Desmosome disassembly in response to pemphigus vulgaris IgG occurs in distinct phases and can be reversed by expression of exogenous dsG3. J Invest Dermatol 131(3), 706-718, 2011.
4. Saleh MA, Ishii K, Kim YJ, Murakami A, Ishii N, Hashimoto T, Schmidt E, Zillikens D, Shirakata Y, Hashimoto K, Kitajima Y, Amagai M : Development of NC 1 and NC 2 domains of type VII collagen ELISA for the diagnosis and analysis of the time course of epidermolysis bullosa acquisita patients. J Dermatol Sci 62(3), 169-175, 2011.
5. Takahashi H, Kouno M, Nagao K, Wada N, Hata T, Nishimoto S, Iwakura Y, Yoshimura A, Yamada T, Kuwana M, Fujii H, Koyasu S, Amagai M : Desmoglein 3-specific CD4+ T cells induce pemphigus vulgaris and interface dermatitis in mice. J Clin Invest 121(9), 3677-3688, 2011.
6. Tanikawa A, Amagai M : Pemphigus treatment in Japan. Dermatol Clin 29(4), 685-686, 2011.
7. Tsunoda K, Ota T, Saito M, Hata T, Shimizu A, Ishiko A, Yamada T, Nakagawa T, Kowalczyk AP, Amagai M : Pathogenic Relevance of IgG and IgM Antibodies against Desmoglein 3 in Blister Formation in Pemphigus Vulgaris. Am J Pathol 179(2), 795-806, 2011.
8. Wada N, Nishifuji K, Yamada T, Kudoh J, Shimizu N, Matsumoto M, Peltonen L, Nagafuchi S, Amagai M : Aire-dependent thymic expression of desmoglein 3, the autoantigen in pemphigus vulgaris, and its role in T-cell tolerance. J Invest Dermatol 131(2), 410-417, 2011.
9. Yokoyama T, Matsuda S, Takae Y, Wada N, Nishikawa T, Amagai M,

Koyasu S : Antigen-independent development of Foxp3 + regulatory T cells suppressing autoantibody production in experimental pemphigus vulgaris. *Int Immunol* 23(6), 365-373, 2011.

10. Ohyama B, Nishifuji K, Chan PT, Kawaguchi A, Yamashita T, Ishii N, Hamada T, Dainichi T, Koga H, Tsuruta D, Amagai M, Hashimoto T : Epitope spreading is rarely found in pemphigus vulgaris by large scale longitudinal study using desmoglein 2 -based swapped molecules. *J Invest Dermatol* in press.
11. Veraitch O, Ohyama M, Yamagami J, Amagai M : Alopecia as a rare but distinct manifestation of pemphigus vulgaris. *J Eur Acad Dermatol Venereol* in press.

学会発表

1. Yoshida K, Kubo A, Yokouchi M, Ishii K, Kawasaki H, Ebihara T, Ohyama M, Nagao K, Amagai M : Human epidermal tight junctions are functional and allow penetration of activated Langerhans cell dendrites. The 70th Annual Meeting of Society for Investigative Dermatology, Phoenix, Arizona, USA, 2011. 5. 4-7.
2. Amagai M : Cellular Mechanisms of Autoimmune Responses in Pemphigus. 22nd World Congress of Dermatology, Seoul, Korea, 2011. 5. 24-29.
3. Amagai M : Autoimmune Bullous Disease. 22nd World Congress of Dermatology, Seoul, Korea, 2011. 5. 24-29.
4. Amagai M : IVIG, Recent Advances. 22nd World Congress of Dermatology, Seoul, Korea, 2011. 5. 24- 29.
5. Amagai M : What Will Dermatologists Be Doing in Asia in 2020 ? 22nd World Congress of Dermatology, Seoul, Korea,

2011. 5. 24- 29.

6. Amagai M: Conventional Therapies for Pemphigus. 22nd World Congress of Dermatology, Seoul, Korea, 2011. 5. 24-29.
7. Yoshida T, Takae Y, Okada E, Hirai I, Saleh MA, Sato T, Amagai M : The usefulness of type VII collagen ELISA in guiding the tapering of steroids in an epidermolysis bullosa acquisita patient. 22nd World Congress of Dermatology, Seoul, Korea, 2011. 5. 24- 29.
8. Veraitch O, Kobayashi T, Imaizumi Y, Akamatsu W, Amagai M, Okano H, Ohyama M : An efficient method to generate human iPS-derived epithelial progenitors/keratinocyte. The 41st Annual Meeting of European Society for Dermatological Research, Barcelona, Spain, 2011. 9. 7- 10.
9. Amagai M : The establishment of the active mouse model for pemphigus vulgaris and updates. The 3rd International Academic Meeting on Bullous Disease, 上海, 2011. 10. 15- 19.
10. Saito M, Caughman CY, Tucker DK, Payne AS, Amagai M, Kowalzyk AP : A key role for the polyclonal nature of pemphigus vulgaris IgG in p38 MAPK - dependent Dsg 3 endocytosis and desmosome disassembly. The 3rd International Academic Meeting on Bullous Disease, 上海, 2011. 10. 15- 19.
11. Amagai M : Dissection of epidermal barrier function and its dysfunction in atopic diseases. 第61回日本アレルギー学会秋季学術大会 日韓中合同シンポジウム、東京、2011. 11. 10- 11.
12. Saleh MA, Ishii K, Yamagami J, Amagai M : Characterization of pathogenic anti-desmoglein 3 monoclonal antibodies isolated from a paraneoplastic pemphi-

gus patient by phage display technique.
第40回日本免疫学会学術集会、幕張、
2011. 11. 27-29.

13. Amagai M : Epidermal barrier function and its dysfunction in atopic diseases. The 36th Annual Meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology, Kyoto, Japan, 2011. 12. 9- 11.
14. Furukawa F, Ikeda T, Tanikawa A, Amagai M, Kato Y, Momose Y, Arai S, Eto H, Yokogawa N : Therapeutic effects of hydroxychloroquine on Cutaneous Lupus Erythematosus (CLE) using CLE Disease Area and Severity Index (CLASI). The 36th Annual Meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology, Kyoto, Japan, 2011. 12. 9- 11.
15. Saito M, Caughman CY, Taucker DK, Payne AS, Amagai M, Kowalczyk AP : A key role for the polyclonal nature of pemphigus vulgaris IgG in p38 MAPK-dependent Dsg 3 endocytosis and desmosome disassembly. The 36th Annual Meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology, Kyoto, Japan, 2011. 12. 9- 11.

H. 知的所有権の出願・登録状況（予定を含む）

なし

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

ファージ提示法を用いた腫瘍随伴性天疱瘡患者からのデスモグレイン3に対する
モノクローナル抗体の解析

研究分担者 天谷雅行 慶應義塾大学医学部皮膚科学 教授

研究要旨 腫瘍随伴性天疱瘡（PNP）は、内在する悪性腫瘍に伴って生じる自己免疫性水疱症で、デスモグレイン（Dsg）とプラキンを標的抗原とする。PNPにおける抗Dsg3抗体の病原性を検討するため、本研究ではファージ提示法を用いてPNP患者から単離されたDsg3に対するモノクローナル抗体（mAb）を解析した。得られたmAbは、重鎖の塩基配列をもとに4つの群に分けられ、VH遺伝子として3群はVH1-46、残りの1群はVH1-02を使用していた。表皮角化細胞を用いたdissociation assayおよび培養ヒト表皮への注入試験の結果から、3群のmAbは病原性を示した。病原性mAbは、Dsg3の細胞外ドメインの中間にあたるEC2とEC3を認識し、病原性抗体の多くがN末端のEC1に反応する尋常性天疱瘡とは対照的であった。本研究は、PNPにおける抗Dsg3抗体の病態的意義を解明する重要な手掛かりになりうる。

研究協力者

山上 淳、Marwah Adly Saleh

A. 研究目的

腫瘍随伴性天疱瘡（PNP；paraneoplastic pemphigus）は、内在する悪性腫瘍（主にリンパ腫）に伴って生じる天疱瘡の一型である。臨床的には血痂を伴う難治性の粘膜疹、扁平苔癬様皮疹など多彩な皮膚症状を呈し、病理組織学的には棘融解のみならず、表皮基底層の空胞変性やリンパ球浸潤といった苔癬型反応が見られるのが特徴である。PNP患者の血清からは、デスモグレイン（Dsg）だけでなく、プラキン分子に対する自己抗体が検出される。血清からDsg3に対する抗体を取り除くと病原性がなくなることから、PNPの病態における抗Dsg3抗体の重要性は明確である。ただPNP患者血清のエピトープは、Dsg3細胞外ドメインのEC1からEC4の広範囲にわたっており、主にN末端のEC1とEC2に反応するPV患者血清に比べて、PNPにおけるDsg3に対する自己免疫反応は多様であ

ると考えられてきた。本研究は、ファージ提示法を用いてPNP患者からDsg3に対する一本鎖抗体（scFv）型のモノクローナル抗体（mAb）の単離と解析を行うことにより、PNPの病態をより深く理解することを目的としている。

B. 研究方法

ファージ提示法を用いて、PNP患者の末梢血リンパ球から、Dsg3に対するモノクローナル抗体（mAb）を分離する。得られたmAbのシークエンス解析を行い、使用している免疫グロブリン遺伝子の特定、可変領域のアミノ酸配列の比較など遺伝子的特徴を検討する。蛍光抗体法、ELISA、免疫沈降法でmAbの性質を調べるとともに、Dsg2の骨格上にDsg3の細胞外ドメインを置換した組み替えタンパクを用いてエピトープ解析を行う。また、表皮角化細胞を用いたdissociation assayとヒト正常皮膚への注入試験により、mAbの病原性を評価する。

C. 研究結果

PNP患者から単離されたmAbは、抗原特異性の決定に重要と考えられる重鎖の相補性決定領域（H-CDR3）の塩基配列に対応して4群に分けられ、VH遺伝子として3群はVH1-46を、残りの1群はVH1-02を使用していた。VH1-46を有する3群は、蛍光抗体法で表皮細胞間への沈着を認めた。エピトープ解析の結果、これらのmAbはDsg3の細胞外ドメインの中間にあたるEC2とEC3に反応した。さらにdissociation assayおよび培養ヒト表皮への注入試験により、これら3群のmAbは弱いながらも病原性を有することが明らかになった。

D. 考察

これまでの研究でPV患者あるいはPVモデルマウスから分離された病原性を有するmAbは、主にDsg3分子のN末端であるEC1に結合していたが、本研究でPNP患者から分離された病原性mAbは、Dsg3細胞外ドメインのEC2およびEC3に反応した。この結果は、PNP患者において抗Dsg3抗体が、PVに比べてより広範囲なエピトープに反応することを反映していると考えられた。実際に、本研究で末梢血を採取したPNP患者の血清は、EC1からEC4に反応していた。また、EC2とEC3に結合するmAbが水疱形成を起こした点は非常に興味深い。EC1はDsg3分子間結合に直接関わるが、それ以外の部分に結合するmAbのみで水疱が起きたことは、PVとPNPにおける水疱形成機序の相違を考える上で重要な意味を持つだけでなく、表皮間細胞接着の機構を理解する上でも意義深いと考えられた。

E. 結論

この研究を通じて単離されたmAbは、PNPにおける抗Dsg3抗体の多彩な性質を反映していると考えられた。今後、PNP患者の水疱形成における分子機構の解明、Dsgを介した細胞接着機能の解析に役立てられるこ

とが期待される。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表（平成23年度）

論文発表

1. Amagai M, Stanley JR : Desmoglein as a Target in Skin Disease and Beyond. J Invest Dermatol, Epub 2011.
2. Hata T, Nishifuji K, Shimoda K, Sasaki T, Yamada T, Nishikawa T, Koyasu S, Amagai M : Transgenic rescue of desmoglein 3 null mice with desmoglein 1 to develop a syngeneic mouse model for pemphigus vulgaris. J Dermatol Sci 63 (1), 33-39, 2011.
3. Jennings JM, Tucker DK, Kottke MD, Saito M, Delva E, Hanakawa Y, Amagai M, Kowalczyk AP : Desmosome disassembly in response to pemphigus vulgaris IgG occurs in distinct phases and can be reversed by expression of exogenous dsg3. J Invest Dermatol 131(3), 706-718, 2011.
4. Saleh MA, Ishii K, Kim YJ, Murakami A, Ishii N, Hashimoto T, Schmidt E, Zillikens D, Shirakata Y, Hashimoto K, Kitajima Y, Amagai M : Development of NC1 and NC2 domains of type VII collagen ELISA for the diagnosis and analysis of the time course of epidermolysis bullosa acquisita patients. J Dermatol Sci 62(3), 169-175, 2011.
5. Takahashi H, Kouno M, Nagao K, Wada N, Hata T, Nishimoto S, Iwakura Y, Yoshimura A, Yamada T, Kuwana M, Fujii H, Koyasu S, Amagai M : Desmoglein 3-specific CD4+ T cells induce pemphigus vulgaris and interface dermatitis in mice. J Clin Invest 121(9), 3677-3688, 2011.

6. Tanikawa A, Amagai M : Pemphigus treatment in Japan. *Dermatol Clin* 29 (4), 685-686, 2011.
 7. Tsunoda K, Ota T, Saito M, Hata T, Shimizu A, Ishiko A, Yamada T, Nakagawa T, Kowalczyk AP, Amagai M : Pathogenic Relevance of IgG and IgM Antibodies against Desmoglein 3 in Blister Formation in Pemphigus Vulgaris. *Am J Pathol* 179(2), 795-806, 2011.
 8. Wada N, Nishifuji K, Yamada T, Kudoh J, Shimizu N, Matsumoto M, Peltonen L, Nagafuchi S, Amagai M : Aire-dependent thymic expression of desmoglein 3, the autoantigen in pemphigus vulgaris, and its role in T-cell tolerance. *J Invest Dermatol* 131(2), 410-417, 2011.
 9. Yokoyama T, Matsuda S, Takae Y, Wada N, Nishikawa T, Amagai M, Koyasu S : Antigen-independent development of Foxp3+ regulatory T cells suppressing autoantibody production in experimental pemphigus vulgaris. *Int Immunol* 23(6), 365-373, 2011.
 10. Ohyama B, Nishifuji K, Chan PT, Kawaguchi A, Yamashita T, Ishii N, Hamada T, Dainichi T, Koga H, Tsuruta D, Amagai M, Hashimoto T : Epitope spreading is rarely found in pemphigus vulgaris by large scale longitudinal study using desmoglein 2-based swapped molecules. *J Invest Dermatol* in press.
 11. Veraitch O, Ohyama M, Yamagami J, Amagai M : Alopecia as a rare but distinct manifestation of pemphigus vulgaris. *J Eur Acad Dermatol Venereol* in press.
- 学会発表
1. Yoshida K, Kubo A, Yokouchi M, Ishii K, Kawasaki H, Ebihara T, Ohyama M, Nagao K, Amagai M : Human epidermal tight junctions are functional and allow penetration of activated Langerhans cell dendrites. The 70th Annual Meeting of Society for Investigative Dermatology, Phoenix, Arizona, USA, 2011. 5. 4-7.
 2. Amagai M : Cellular Mechanisms of Autoimmune Responses in Pemphigus. 22nd World Congress of Dermatology, Seoul, Korea, 2011. 5. 24-29.
 3. Amagai M : Autoimmune Bullous Disease. 22nd World Congress of Dermatology, Seoul, Korea, 2011. 5. 24-29.
 4. Amagai M : IVIG, Recent Advances. 22nd World Congress of Dermatology, Seoul, Korea, 2011. 5. 24-29.
 5. Amagai M : What Will Dermatologists Be Doing in Asia in 2020 ? 22nd World Congress of Dermatology, Seoul, Korea, 2011. 5. 24-29.
 6. Amagai M : Conventional Therapies for Pemphigus. 22nd World Congress of Dermatology, Seoul, Korea, 2011. 5. 24-29.
 7. Yoshida T, Takae Y, Okada E, Hirai I, Saleh MA, Sato T, Amagai M : The usefulness of type VII collagen ELISA in guiding the tapering of steroids in an epidermolysis bullosa acquisita patient. 22nd World Congress of Dermatology, Seoul, Korea, 2011. 5. 24-29.
 8. Veraitch O, Kobayashi T, Imaizumi Y, Akamatsu W, Amagai M, Okano H, Ohyama M : An efficient method to generate human iPS-derived epithelial progenitors/keratinocyte. The 41st Annual Meeting of European Society for Dermatological Research, Barcelona, Spain, 2011. 9. 7-10.
 9. Amagai M : The establishment of the active mouse model for pemphigus vul-

garis and updates. The 3rd International Academic Meeting on Bullous Disease, 上海, 2011. 10. 15- 19.

10. Saito M, Caughman CY, Tucker DK, Payne AS, Amagai M, Kowalzyk AP : A key role for the polyclonal nature of pemphigus vulgaris IgG in p38 MAPK - dependent Dsg3 endocytosis and desmosome disassembly. The 3rd International Academic Meeting on Bullous Disease, 上海, 2011. 10. 15- 19.
11. Amagai M : Dissection of epidermal barrier function and its dysfunction in atopic diseases. 第61回日本アレルギー学会秋季学術大会 日韓中合同シンポジウム、東京、2011. 11. 10-11.
12. Saleh MA, Ishii K, Yamagami J, Amagai M : Characterization of pathogenic anti-desmoglein 3 monoclonal antibodies isolated from a paraneoplastic pemphigus patient by phage display technique. 第40回日本免疫学会学術集会、幕張、2011. 11. 27-29.
13. Amagai M : Epidermal barrier function and its dysfunction in atopic diseases. The 36th Annual Meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology, Kyoto, Japan, 2011. 12. 9-11.
14. Furukawa F, Ikeda T, Tanikawa A, Amagai M, Kato Y, Momose Y, Arai S, Eto H, Yokogawa N : Therapeutic effects of hydroxychloroquine on Cutaneous Lupus Erythematosus(CLE) using CLE Disease Area and Severity Index (CLASI). The 36th Annual Meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology, Kyoto, Japan, 2011. 12. 9-11.
15. Saito M, Caughman CY, Tucker DK, Payne AS, Amagai M, Kowalzyk AP : A key role for the polyclonal nature of pemphigus vulgaris IgG in p38 MAPK-

dependent Dsg3 endocytosis and desmosome disassembly. The 36th Annual Meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology, Kyoto, Japan, 2011. 12. 9-11.

H. 知的所有権の出願・登録状況（予定を含む）

なし

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

発症前に検出される抗Dsg前駆体抗体の臨床的特徴と
EDTA処理ELISA法を用いた分子生物学的特徴の検討

研究分担者 青山裕美 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科皮膚科学分野 准教授

研究要旨 天疱瘡は表皮細胞間接着因子デスモグレイン（Dsg）に対する自己抗体による自己免疫性水疱症であるが、非天疱瘡患者でも抗Dsg抗体が検出されることがあり、Dsg前駆体に対する抗体が考えられている。われわれは、非天疱瘡患者で抗Dsg抗体が検出された10例を対象に、その臨床的特徴をまとめた。EDTA処理ELISA法を用いてエピトープの解析を行ったところ、すべての症例でEDTA処理をしたELISAプレートへの結合性は完全に保たれた。この結果はDsg前駆体に対する抗体の特徴の一つで、EDTA処理ELISA法を用いてDsg前駆体に対する抗体を簡便にスクリーニングすることができると考えられた。

共同研究者

岩月 啓氏 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科皮膚科学

神谷 浩二 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科皮膚科学

扁平苔癬1例)を対象とした。

b) EDTA処理ELISA法

Dsgリコンビナントタンパクを固層化したELISAプレートのマイクロカップを0.5 mM EDTAにて室温30分処理をし、その後、従来のELISAプロトコールに従い吸光度(OD₄₅₀)を測定した。

c) IgG subclass ELISA

Dsg ELISAを用いて、二次抗体に1:1000希釈でgoat anti-human IgG1-4 (Cygnus Technologies, Southport, NC)を使用した。

d) 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 minimum essential medium (MEM)、0.4 μg/ml ハイドロコルチゾン、20ng/ml EGF、10% FCSを含む培地中で培養した。実験には12 well dishに播種し、コンフルエントの細胞を用いた。

e) 非天疱瘡患者IgG

対象患者血清からProtein-G-column (GE Healthcare, Tokyo, Japan)により精製したIgGを用いた。

f) 細胞間接着能力低下能の測定

シート状に培養したDJM-1細胞に精製IgGを加え、37℃で8時間刺激、24時間刺激をし

A. 研究目的

背景：これまでにわれわれはDsg抗原ELISAプレートをEDTA処理しカルシウム依存性立体構造を変換（EDTA処理ELISA法）することで、天疱瘡患者に検出される抗Dsg抗体のエピトープを区別し、病因性を区別できることを報告してきた。その過程で、抗Dsg抗体は時に非天疱瘡患者でも検出されることがわかってきた。

目的：本研究では非天疱瘡患者に検出される抗Dsg抗体の臨床的特徴を調べ、EDTA処理ELISA法がスクリーニング検査として使用可能か検討した。

B. 研究方法

a) 非天疱瘡患者血清

非天疱瘡患者で抗Dsg抗体が検出された10例（慢性関節リウマチ（RA）6例、健常人1例、Bowen病1例、類天疱瘡（BP）1例、

たものにDispaseを加え、37°C 30分反応させディッシュから細胞を剥がした。回収した細胞をピペットマンで5回ピペッティングを繰り返して物理的的刺激を加えた。その後、最終濃度3%ホルムアルデヒドで固定しcrystal violetで染色し、各細胞コロニーの数を測定した。

C. 研究結果

a) エピトープ解析

非天疱瘡患者に検出される抗Dsg抗体をEDTA処理ELISA法を用いてエピトープの解析をした(図1)。すべての症例でEDTA処理をしたELISAプレートに対する結合性は完全に保たれた。

b) IgG subclass解析

非天疱瘡患者に検出される抗Dsg抗体のIgG subclassを解析した(図2)。すべての症例でIgG1 subclassが優位に検出され、IgG4 subclassは検出感度以下もしくはわずかに検出されるのみであった。また、IgG2, IgG3 subclassは検出されなかった。

c) 抗体の病因性の検討

精製IgGをシート状に培養したDJM-1細胞に加え37°C、8時間、24時間刺激後に物理的的刺激を加え定量化し比較した。細胞の断片数は8時間、24時間刺激ともにnegative controlと同等であり、病因性を示さなかった(図3)。

D. 考察

Dsg前駆体は細胞内から細胞表面に運ばれる過程で、Furinなどの作用でプロペプチド部位が酵素学的に切断され、成熟Dsgとして細胞表面に発現する。Dsg ELISAプレート上の抗原はバキュロウイルス発現系を用いて昆虫細胞で生成されており、成熟Dsgが主体であるが、わずかにDsg前駆体が含まれる。そのためDsg ELISAでは成熟DsgとDsg前駆体に対する抗体を検出し、非天疱瘡患者ではDsg前駆体に対する抗体が検出されていると考えられる。

非天疱瘡で抗Dsg抗体が検出される症例では、臨床的には天疱瘡に特徴的な症状や病理所見を有さず、蛍光抗体間接法は陰性であった。Dsg ELISAを用いた血清解析結果からは、EDTA処理をしたELISAプレートに対する結合性は完全に保たれ、IgG1-Dsg抗体が優位に検出された。また、これらの血清はin vitroで細胞間接着能力低下能を検討したところ病因性を示さなかった。以上の結果は、Dsg前駆体に対する抗体の特徴と考えられた。

天疱瘡では病因性の規定因子の一つにエピトープがあり、一般に、Dsgのカルシウム依存性立体構造を認識する抗体は病因性が高いとされている。天疱瘡患者血清中にはDsgのカルシウム依存性立体構造に対する抗体と非立体構造に対する抗体が検出されるため、EDTA処理をしたELISAプレートに対する結合性は低下する。一方、非天疱瘡患者に検出される抗Dsg抗体はEDTA処理をしたELISAプレートへの結合性は完全に保たれたため、この特徴を利用してEDTA処理ELISA法でDsg前駆体に対する抗体を区別できると考えられた。さらに、この特徴からDsg前駆体はプロペプチドによりEDTA処理でカルシウム依存性立体構造が変換されない可能性や、プロペプチドがカルシウム非依存性の構造で、同部位がDsg前駆体に対する抗体のエピトープである可能性が考えられた。また、天疱瘡の病因性規定因子の一つにIgG subclassがあり、非天疱瘡患者血清中の抗Dsg抗体はIgG1 subclassが優位に検出された。これまでにわれわれは、天疱瘡血清中の抗Dsg抗体は病期に関わらずIgG1 subclassとIgG4 subclassが検出されることを報告した。このことからDsgのカルシウム依存性立体構造を認識する抗体やIgG4 subclassが天疱瘡の発症に関与しており、今後その獲得機序を明らかにすることが病態解明につながると考えられる。さらに非天疱瘡で抗Dsg抗体が検出される症例が今後天疱瘡を発症するのか、慎重な経過観察が必要である。

E. 結論

非天疱瘡患者に検出される抗Dsg抗体はEDTA処理をしたELISA plateへの結合性は完全に保たれ、この特徴からEDTA処理ELISA法でDsg前駆体に対する抗体を簡便にスクリーニングすることができると考えられた。今後、本法を臨床応用するために多施設で症例数を集め検討する必要がある。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表（平成23年度）

学会発表

Kamiya K, Aoyama Y, Shirafuji Y, Hamada T, Morizane S, Fujii K, Iwatsuki K. The epitopes and IgG subclasses of anti-desmoglein antibodies detected in individuals without pemphigus. 第36回日本研究皮膚科学会学術大会・総会、京都、2011年12月9-11日

H. 知的所有権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許事項
特になし
2. 実用新案登録
特になし
3. その他
特になし

Patient		Disease	Anti-Dsg1		Anti-Dsg3	
			ELISA index	EDTA ELISA index	ELISA index	EDTA ELISA index
1	48y, F	RA	297.0	294.7	257.8	270.5
2	43y, F	RA	10.3	-	40.8	43.2
3	46y, F	RA	28.4	32.4	21.4	19.0
4	63y, F	RA	5.5	-	33.6	37.7
5	75y, F	RA	27.0	36.1	11.5	-
6	85y, F	RA	44.0	56.1	14.4	-
7	60y, F	Healthy person	4.8	-	47.7	46.8
8	78y, F	Bowen's disease	362.6	378.9	67.7	75.8
9	77y, F	BP	9.1	-	24.1	27.1
10	65y, M	Lichen planus	120.5	130.5	257.8	270.5

図1 非天疱瘡患者に検出される抗Dsg抗体のエピトープ解析結果
すべての症例においてEDTA処理後のELISAプレートに対する反応性は全く変わらなかった。