



Title	Analysis of correlation between in vivo deposition of IgE autoantibodies in lesional skin and disease course in bullous pemphigoid.
Author(s)	守内, 玲寧
Description	配架番号 : 2182
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第11935号
Issue Date	2015-06-30
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k11935
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/59680
Type	doctoral thesis
File Information	Reine_Moriuchi.pdf



学位論文

Analysis of correlation between
in vivo deposition of IgE autoantibodies in
lesional skin and disease course in
bullous pemphigoid.

(水疱性類天疱瘡における病変皮膚への IgE 自己
抗体の沈着と病勢、治療経過の相関に関する解析)

2015 年 6 月

北海道大学

守内 玲寧

目次

発表論文目録及び学会発表目録	1 頁
緒言	2 頁
略語表	17 頁
実験方法	18 頁
実験結果	28 頁
考察	34 頁
総括および結論	40 頁
謝辞	42 頁
引用文献	43 頁

発表論文目録及び学会発表目録

本研究は以下の論文に発表した。

Reine Moriuchi, Wataru Nishie, Hideyuki Ujiie, Ken Natsuga, Hiroshi Shimizu.
In vivo analysis of IgE autoantibodies in bullous pemphigoid: A study of 100 cases.

J. Dermatol. Sci. 78, 21-25 (2015).

本研究は以下の学会に発表の予定である。

守内玲寧、西江 渉、氏家英之、夏賀 健、清水 宏
水疱性類天疱瘡における IgE 自己抗体の解析
第 402 回日本皮膚科学会北海道地方会 2015 年 10 月

緒言

水疱性類天疱瘡について

ヒトは長い歴史のなかで、細菌やウィルスなどの病原体と闘ってきた。近年の医学の進歩により、それらの病原体の制御がある程度可能となり、寿命の延長が急速に進んだ。しかしながら、寿命の延長は自己を異物として認識する自己免疫性疾患の発症頻度を増加させている。皮膚にも自己免疫性疾患が存在し、その中でも真皮表皮結合タンパク、あるいは表皮細胞間結合タンパクに対する自己抗体を背景に、水疱形成やびらんを生じる群が存在する。それを自己免疫性水疱症という。これまでの皮膚科領域の研究において、数々の自己免疫性水疱症の自己抗原が明らかにされ、その発症メカニズムの解析が進み、新たな治療方法の開発につながっている。しかし、現在の治療法は副腎皮質ステロイドの全身投与が主体となっており、長期間にわたって服用する必要が生じることが多い。このため、ステロイド等による副作用で重篤な感染症に罹患したり、骨粗鬆症により骨折し臥床を余儀なくされ、結果的に予後を悪化させる可能性があり、ステロイドに代わる副作用の少ない治療法の開発が求められている。そのような中で、自己抗体の産生を抑えるモノクローナル CD20 抗体（リツキシマブ）などの新規治療法が考案され、実際に効果を上げている。

水疱性類天疱瘡（bullous pemphigoid, BP）は後天性に生じる自己免疫性水疱症の代表的疾患である。臨床症状としては全身の皮膚にそう痒を伴う浮腫性紅斑の出現、それに引き続いて生じる比較的大型の緊満性水疱、それがやぶれて生じるびらんが挙げられる（図 1）。一般的には 70 代以上の高齢者に多く見られるが、若年者や小児に生じることもある。



図1：水疱性類天疱瘡の典型的な臨床像。浮腫性紅斑が多発、その上に緊満性の水疱およびびらんが生じている。強い痒みを伴う。

BP の病態メカニズムの概略を以下に示す。病変の主座は真皮表皮境界部（dermal-epidermal junction, DEJ）である（図2）。表皮は外胚葉由来、真皮は中胚葉由来であり、一枚岩の構造ではない。この両者を接着するためには連結構造が必要であり、それをヘミデスモゾームという。この連結構造に自己抗体が結合し、炎症が惹起されると表皮と真皮の間の接着が破綻し、ついにはそれらの間に裂隙が生じ、そこに表皮下水疱が生じる。

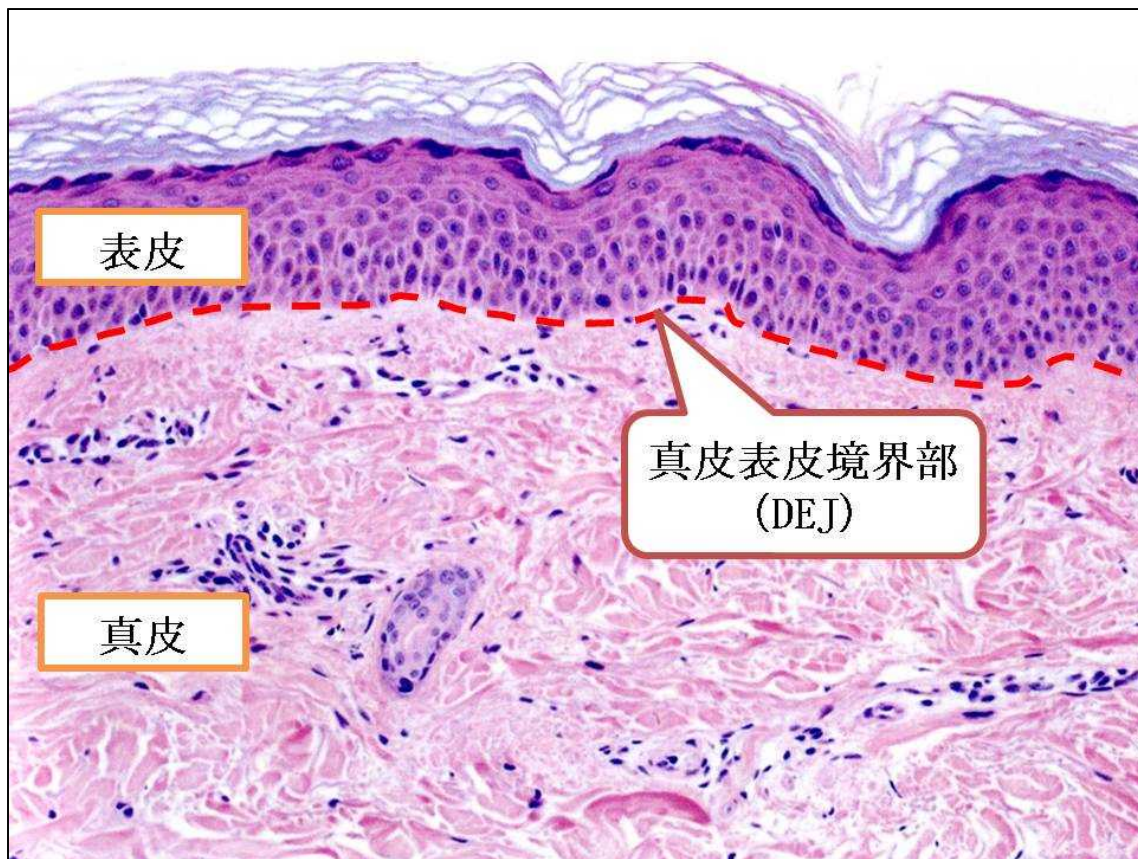


図 2：正常皮膚上層の組織像。表皮は外胚葉由来、真皮は中胚葉由来であり、この両者を結合させる構造、ヘミデスモゾームは DEJ にある。BP の病変の主座はこの DEJ である。

さらに DEJ を細かく観察すると、それがきわめて精緻な構造をしていることがわかる（図 3）。多種の分子が複雑に絡み合い、表皮と真皮を連結している。これらの分子の中で、BP 患者血清中の自己抗体は BP180（別名 BPAG2 あるいは XVII 型コラーゲン，COL17）および BP230（別名 BPAG1）である。特に、大多数の BP 患者血清中の自己抗体は COL17 の non-collagenous 16A (NC16A) ドメインを標的とすることが知られており、この領域に主要な抗原エピトープが存在すると考えられている^{1,2}（図 4）。

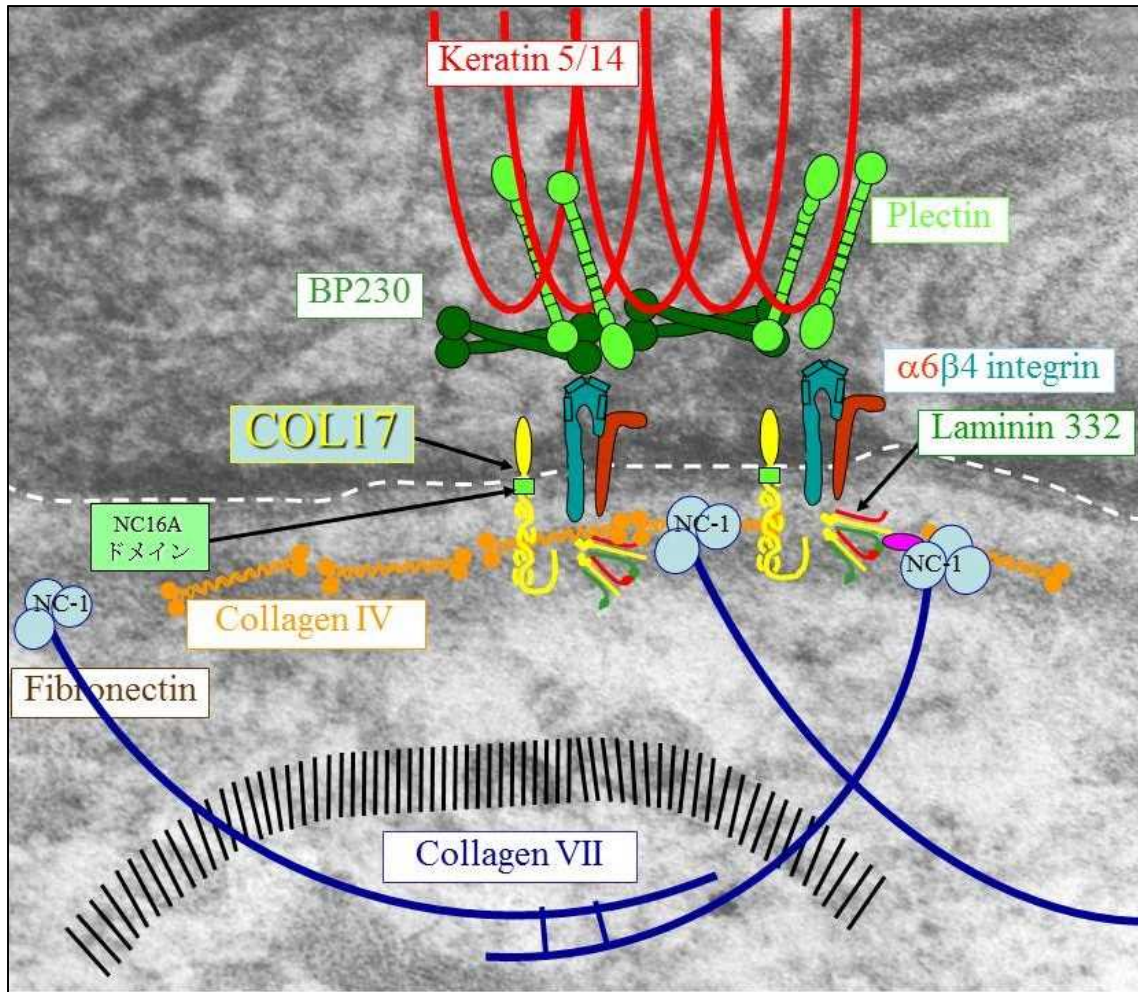


図 3 : DEJ の構造。BP の主要抗原は COL17 および BP230 である。

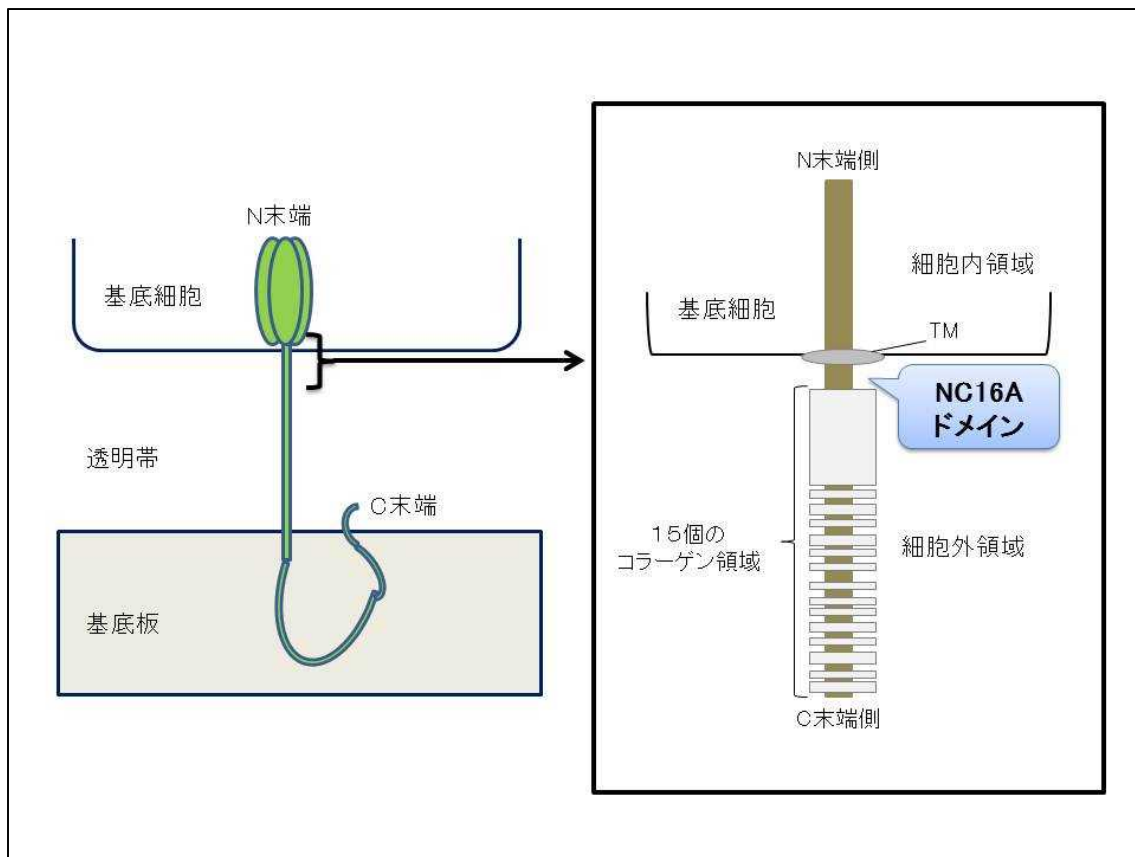


図4：COL17の構造。NC16A ドメインに主要な抗原エпитープが存在すると考えられている。

次にこれまで提唱されてきた、IgG 自己抗体や補体を主体とした、ミクロレベルでのBPの病態メカニズムについて説明する。それは以下のようにまとめられる（図5①～④）³⁻⁵。

- ①リンパ球が産生した、IgG 自己抗体がCOL17、あるいはBP230に結合。
- ②その後、IgG 自己抗体のFc部分にある補体結合部に補体が結合し、活性化する。
- ③それがトリガーとなり、好酸球などの炎症細胞浸潤が惹起されDEJで炎症がおきる。
- ④連結構造が破壊され、表皮と真皮がはがれて表皮下水疱が形成される。

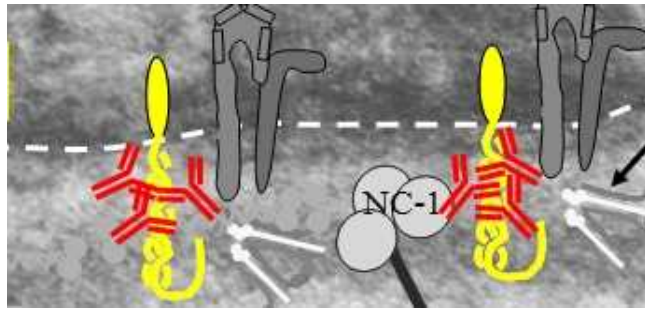


図5 ① : IgG 自己抗体が自己抗原（図は COL17）に結合する。

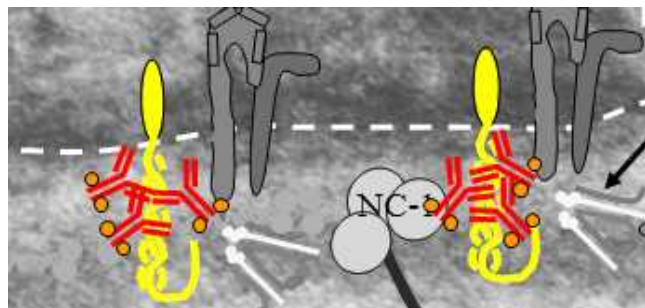


図5 ② : IgG 自己抗体の Fc 領域に補体が結合し、活性化する。

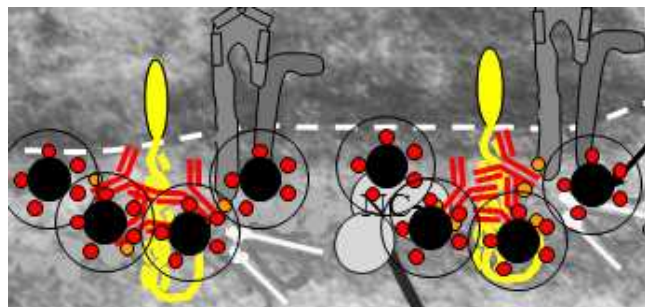


図5 ③ : 炎症細胞浸潤が惹起される。

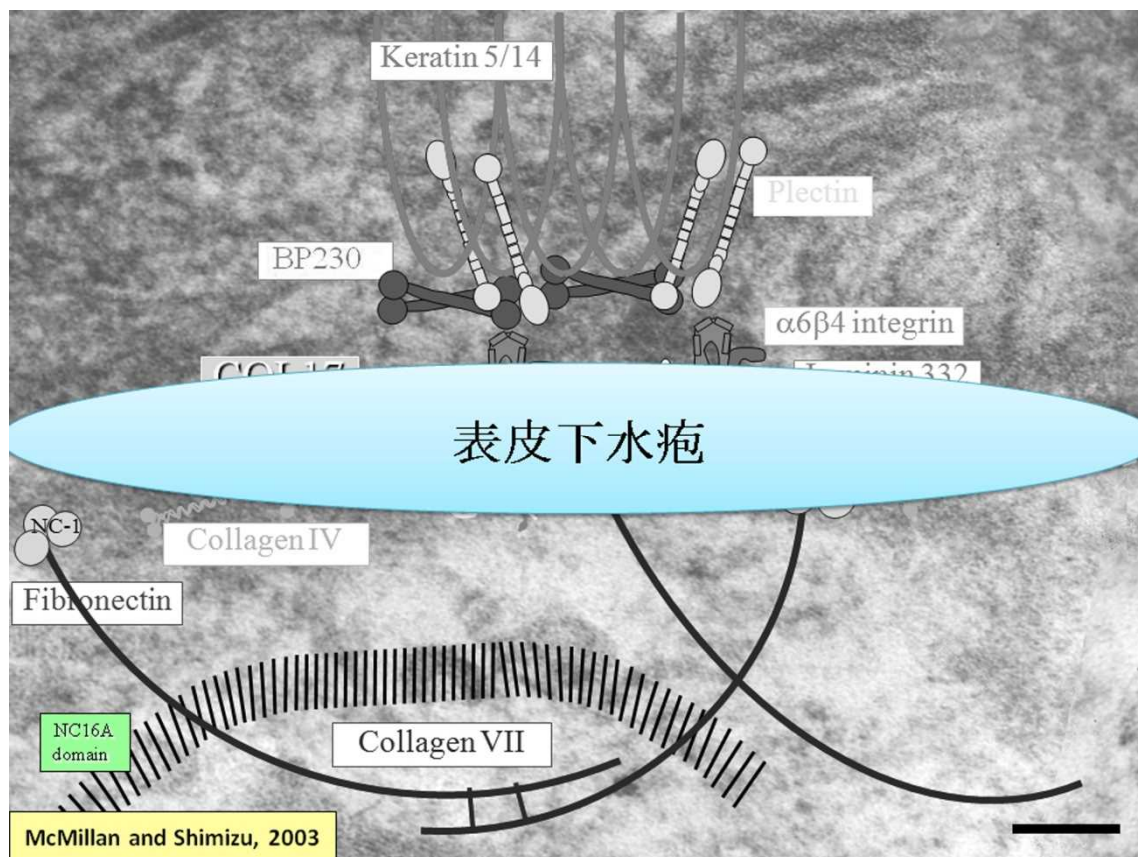


図5 ④：表皮と真皮の連結構造が破壊され、両者の間に裂隙が生じて表皮下水疱ができる。

実際に光学顕微鏡で患者皮膚の病変を観察すると、表皮と真皮が分離とそれに伴う表皮下水疱の形成を見ることができる（図6）。分離していない部分を拡大して見ると、DEJに夥しい好酸球の浸潤がみられ、空胞変性が生じている（図7）。これがさらに進行すると表皮と真皮が分離する。患者皮膚を用いた蛍光抗体直接法（direct immunofluorescence, DIF）を行うと、先に提示したメカニズムを裏付けるかのように、DEJにIgG自己抗体と補体C3の沈着を観察することができる（図8）。なお、蛍光抗体法の実施方法は後述する。

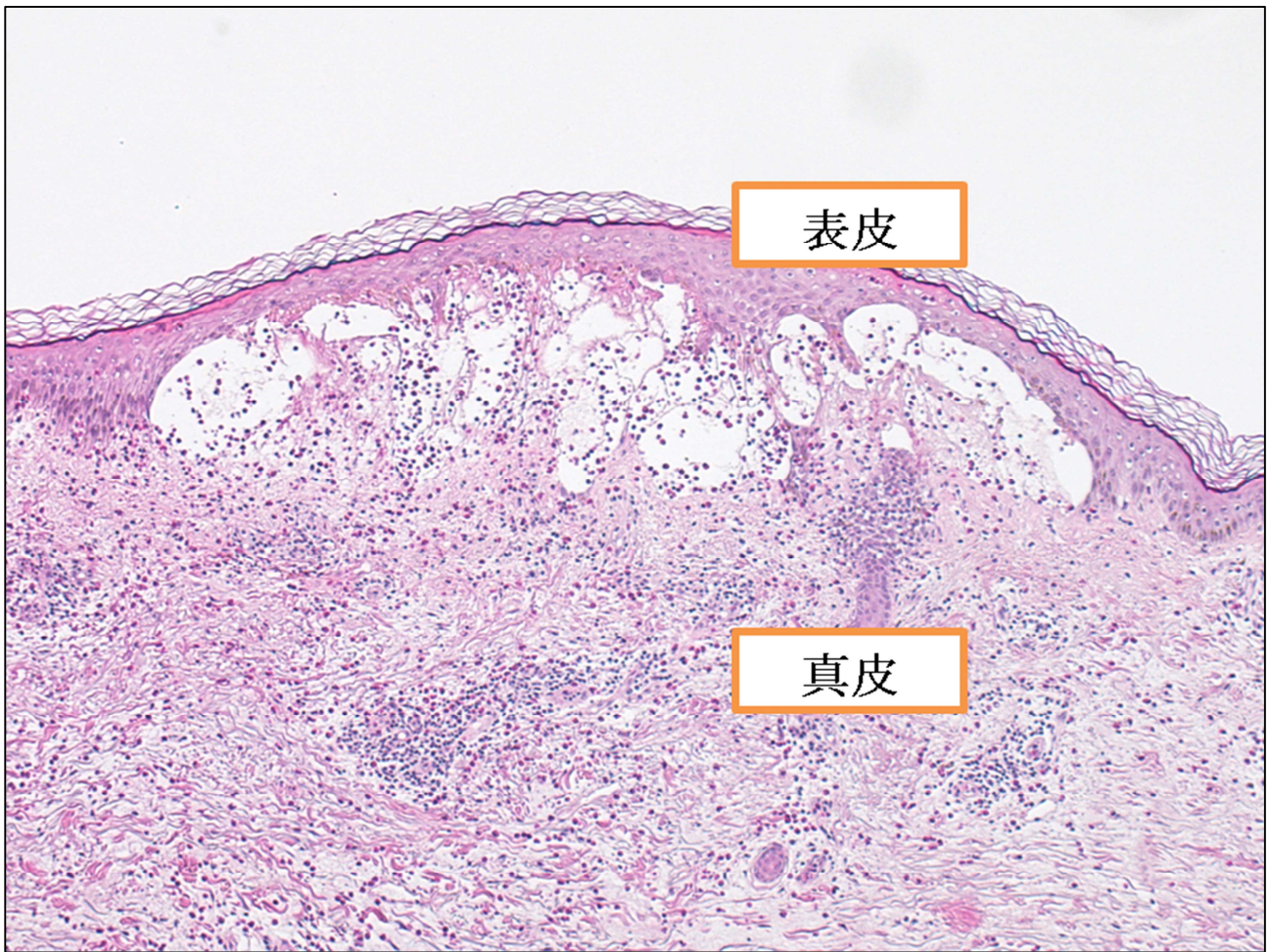


図 6 : BP の病変皮膚の病理組織像。表皮と真皮が分離し、それらの間に裂隙が生じ表皮下水疱を生じている。

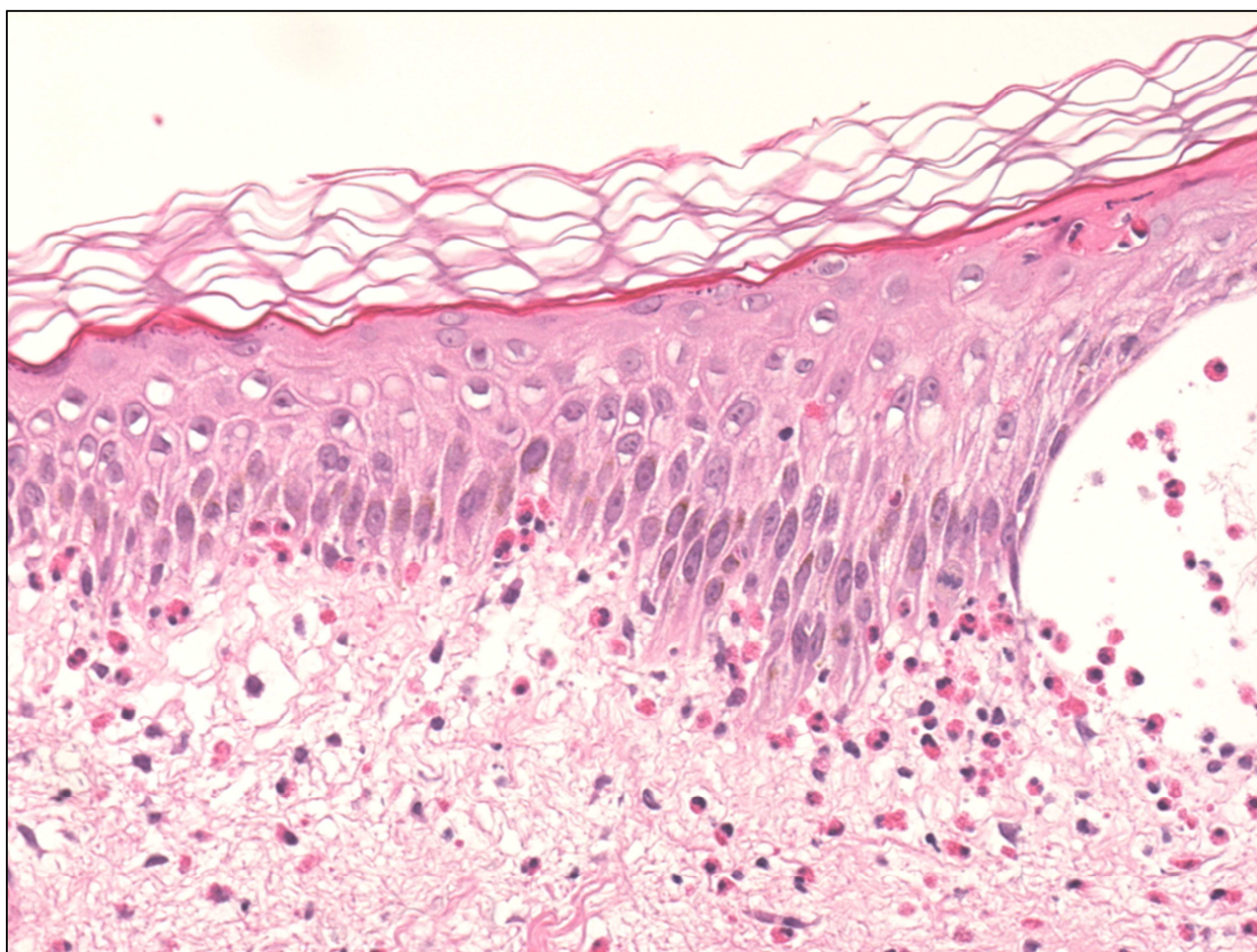


図 7：表皮下水疱の辺縁の病理組織像。DEJ への多数の好酸球の浸潤が見られ、空胞変性が起きている。変性が高度になると、表皮と真皮の連結が外れる。

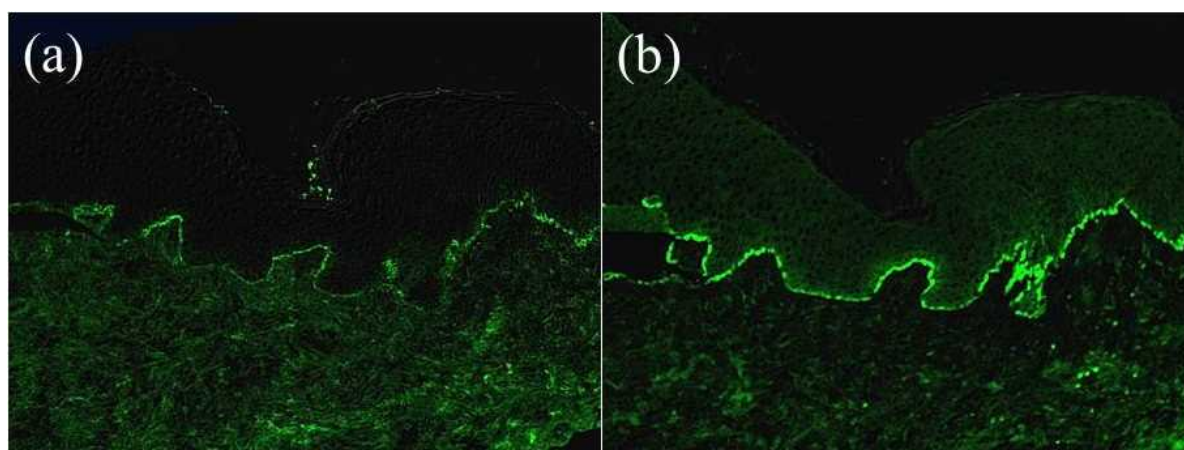


図 8：病変皮膚を用いた DIF の所見。DEJ への (a) IgG 自己抗体 (b) C3 の線状の沈着が観察される。

BP の亜型および尋常性乾癬の合併について

上述のように BP の臨床症状としては紅斑、水疱、びらんが挙げられるが、BP には一見 BP に見えない亜型がある。その一つが結節性類天疱瘡である（図 9 a）⁶。結節性痒疹という、非常に強いそう痒を伴い慢性に経過する結節性病変を主体とする疾患があるが、結節性類天疱瘡はこの結節性痒疹の外見が酷似しており、初診時に自己免疫性水疱症であることを気づかれない場合もある。浮腫性紅斑、びらん・水疱形成が目立たない。もう一つの亜型として、紅皮症型類天疱瘡が挙げられる（図 9 b）⁷。全身の、浮腫性ではない落屑性紅斑が主体の亜型で、これもびらん・水疱形成が目立たない。なぜこれらの亜型でびらん・水疱形成が起きづらいのかは不明である。



図 9 : BP の亜型。(a)結節性類天疱瘡。結節性痒疹に類似した、強いそう痒を伴う結節性病変が主体である。(b)紅皮症型類天疱瘡。全身に落屑性紅斑がみられる。いずれもびらん・水疱形成が目立たない。(b)は文献 7 の図より引用)

また、BP は尋常性乾癬に合併しやすいことが知られている（図 1 0）⁸。尋常性乾癬は代表的な炎症性角化症であり、主に物理的にこすれやすい部位を中心に、銀白色の鱗屑を伴う角化性紅斑が出現する疾患である。Th17 細胞を中心とした免疫応答が考えられており、Th2 細胞を介する液性免疫の異常が想定されている BP とは異なる疾患背景を持つ⁸。なぜ BP が乾癬に合併しやすいのか、免疫学を考える上で非常に興味深い現象である。

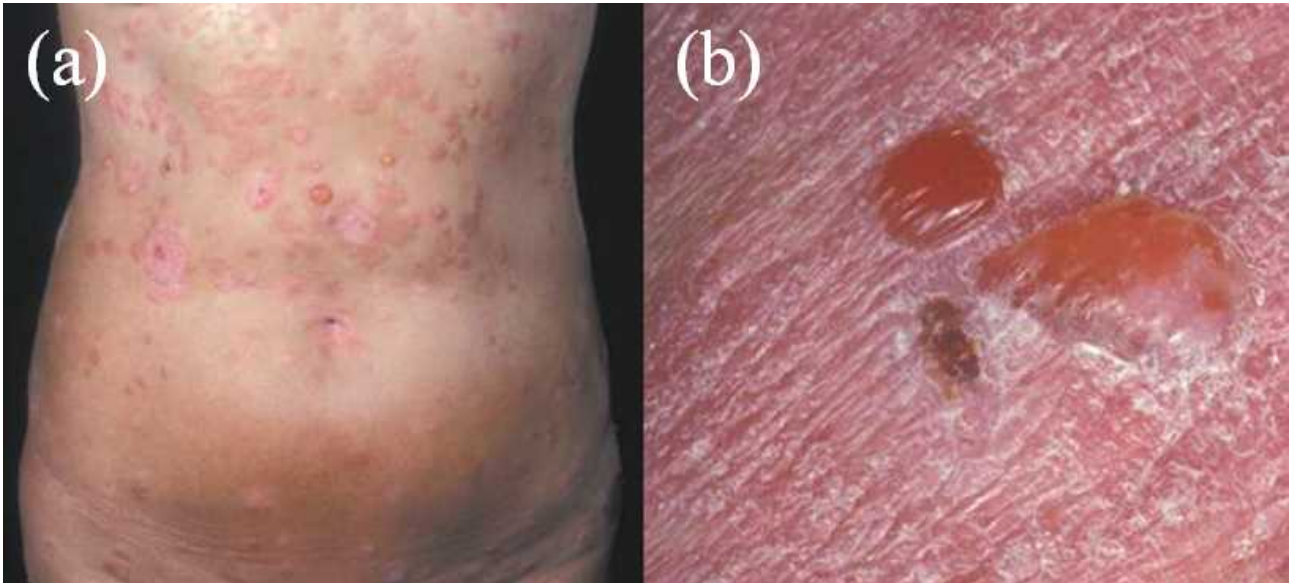


図 1 0：尋常性乾癬に BP が合併した例。(a)腹部に淡紅色の角化性紅斑が多発している。緊満性水疱が所々に見られる。(b)角化性紅斑の上に緊満性水疱が生じている。(文献 8 の図を改変)

水疱性類天疱瘡における、IgE 自己抗体について

以上 BP の疾患概念、そして IgG 自己抗体と補体が主体の病態メカニズムを述べた。一方で、以前より BP 患者血清中の総 IgE 値が高値を示す場合が多いことが経験的に知られていた。さらに BP の初期病変が、IgE が病態に深く関与する蕁麻疹に類似した膨疹様、浮腫性紅斑であること（図 1 1）から、BP の病態には IgE 自己抗体が何らかのかたちで関与しているのでは、と想定されてきた。近年、抗 COL17 IgE 自己抗体が BP の病態に関与している可能性を示唆する報告が相次いでおり^{9,10}、実際に患者血清中の抗 COL17 IgE 自己抗体の存在が免疫ブロット法や、酵素結合免疫吸着検査法（enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA）により確認されている¹¹⁻¹⁵。ELISA で測定した抗 COL17 IgE 自己抗体の量が多いと、臨床症状が重篤になりやすいという報告もあり¹³、IgE 自己抗体の病態への関与が濃厚となりつつある。また疾患の動物モデルも提唱されている。Fairley らは免疫不全マウスである SCID マウスの背部に正常ヒト皮膚を植皮した後、BP 患者血清中から精製した抗 COL17 IgE 自己抗体をそのマウスに投与すると、植皮したヒト皮膚に BP の初期病変に類似した、赤く浮腫性の変化が生じることを示した（図 1 2）¹⁰。さらに最近では、抗ヒト IgE モノクローナル抗体（オマリズマブ）を用いた IgE を標的とし、その量を減少させるという治療戦略も考えられており、実際に良好な結果を得た報告がある（図 1 3）¹⁶。

このように近年の BP の研究領域において、IgE 自己抗体の病態への役割が重視されるようになってきている。しかしながら、未だ BP における IgE 自己抗体の病的意義ははっきりしていない。加えて、これまでの研究は患者血清を用いた *in vitro* の系のものがほとんどであり、実際の生体内における IgE 自己抗体の沈着を観察し、臨床所見や治療経過との相関を解析した *in vivo* の系の研究報告はいまだ少数にとどまる

¹⁷⁻¹⁹。



図 1 1 : 蕁麻疹と BP の皮疹の比較。いずれも浮腫性の紅斑を呈し、類似した外見である。このため、BP の初期病変は「蕁麻疹様紅斑」とも称される。

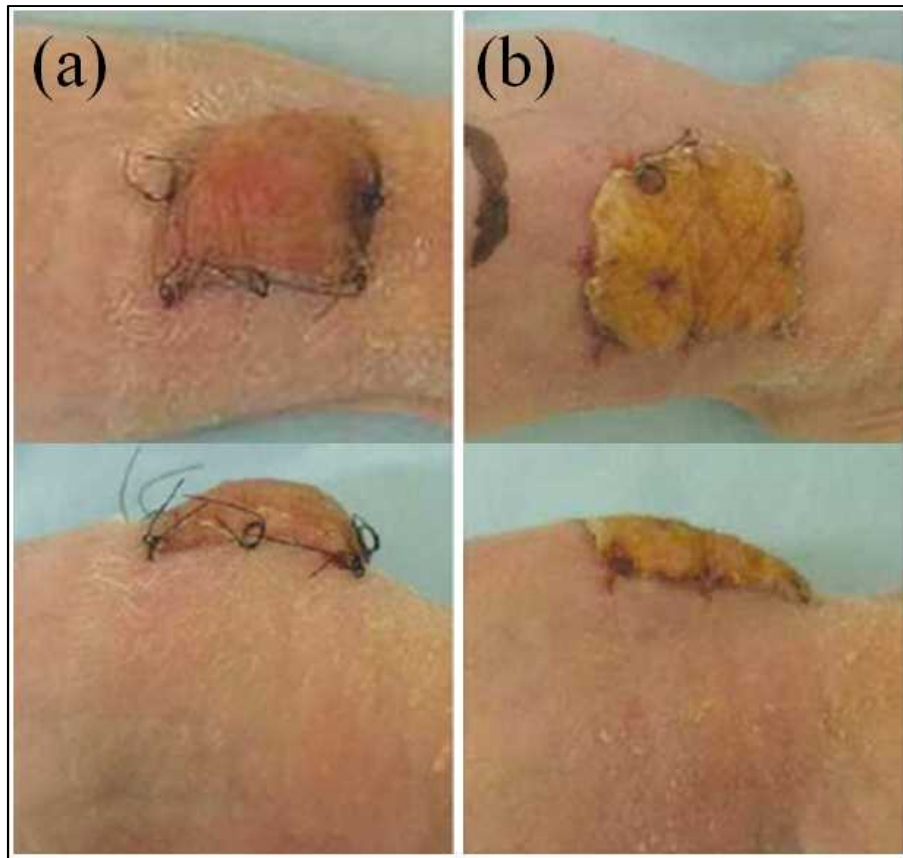


図 1 2 : (a) SCID マウスの背部に正常ヒト皮膚を植皮し、抗ヒト COL17 IgE 抗体を投与すると、植皮片が赤く浮腫状に変化し、BP の初期病変に類似した所見を呈した。(b) ネガティブコントロール。(文献 10 の図を改変)



図 1 3 : 抗ヒト IgE モノクローナル抗体、オマリズマブによる IgE を標的とした新規治療法。(a) 投与前。(b) 投与後。紅斑、びらんが消退し、明らかに改善している。(文献 16 の図を改変)

本研究の目的

上述の問題の解決の一端を担うべく、今回我々は BP 症例 100 例の病変皮膚を用い、生体内での IgE 自己抗体の沈着と臨床所見、治療経過との相関の解析を行った。

本研究の結論

本研究により、BP 患者の病変皮膚を用いた DIF では、18%の症例で IgE 自己抗体の沈着が DEJ に見られることが判った。また、*in vivo*での IgE 自己抗体の沈着は、BP の病勢を反映するとされる ELISA の値や臨床経過と相関しないこと、そして DIF において IgG 自己抗体の沈着がみられず、IgE 自己抗体が沈着する症例では、びらん・水疱形成が僅かとなる非典型的な臨床型を呈する可能性が示唆された。

略語表

本文中および図中で使用した略語は以下の通りである。

BP, bullous pemphigoid

C3, complement component 3

COL17, type XVII collagen

DEJ, dermal-epidermal junction

DIF, direct immunofluorescence

ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay

FITC, fluorescein isothiocyanate

HRP, horseradish peroxidase

IF, immunofluorescence

IIF, indirect immunofluorescence

NC16A, non-collagenous 16A

ssIIF, split-skin indirect immunofluorescence

実験方法

まず、BP 症例の抽出までを述べる。検討の候補症例が BP であると診断することが本研究では不可欠であるため、そのための免疫学的方法論についてを記載した。方法は3つ、すなわち DIF と蛍光抗体間接法 (indirect immunofluorescence, IIF)、そして ELISA が用いられた。

DIF

DIF は、病変皮膚で起きていることをそのまま視覚化させることができるため、診断にきわめて重要であるのみならず、病態の理解にも不可欠な検査法といえよう。以下、その方法を示す (図 1 4)。

本研究で検討する候補となりそうな症例の病変皮膚は、採取された後生理食塩水に浸したガーゼにくるみ、24 時間以内に optimum cutting temperature compound (Muto Pure Chemicals, Japan) に包埋し、 -80°C で保管した。クリオスタットで薄切標本作製し、fluorescein isothiocyanate (FITC) で標識した下記の 2 次抗体を反応させ、まずは IgG, IgA, IgM, C3 の DEJ への沈着を観察した。

使用した 2 次抗体は以下の通りである。

IgG: polyclonal rabbit anti-human IgG-FITC (Dako, Glostrup, Denmark)

IgA: polyclonal rabbit anti-human IgA-FITC (Dako)

IgM: polyclonal rabbit anti-human IgM-FITC (Dako)

C3: polyclonal goat anti-human C3-FITC (MBL, Nagoya, Japan)

上記 4 種類の 2 次抗体は phosphate buffered saline で 100 倍に希釈したのち薄切標本に添加し、 37°C で 30 分間、暗所で反応させた。洗浄後、標本は mounting medium (Thermo Fisher Scientific, U.S.A.) により封入し、蛍光顕微鏡による観察に供した。

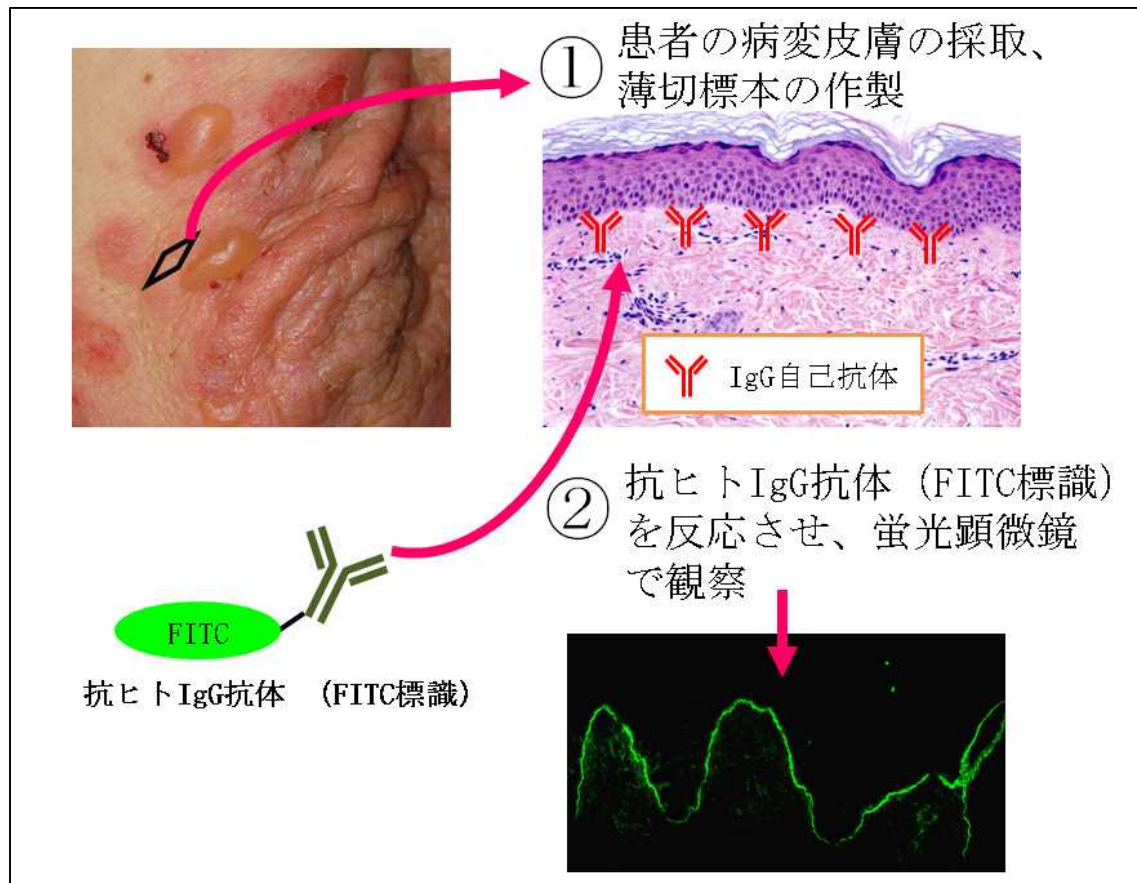


図 1 4 : DIF の原理。図は IgG 自己抗体を検出する際の例である。①病変皮膚を採取し、クリオスタットで薄切標本を作製。②抗ヒト IgG 抗体 (FITC 標識) を薄切標本に添加、反応させ、洗浄後封入し蛍光顕微鏡で観察する。

IIF

DIF が生体内での反応をみる *in vivo* の検査方法であるのに対し、IIF は患者血清を用いた *in vitro* の方法である。用いる薄切標本は患者の病変皮膚ではなく、正常ヒト皮膚である。患者血清を正常ヒト皮膚に添加することにより、COL17 あるいは BP230 に患者由来の自己抗体が結合する。洗浄した後 DIF と同様の手技を行い、蛍光顕微鏡で DEJ に線状の蛍光を観察することにより、患者血清中に自己抗体があることを証明することができる (図 1 5)。患者血清の希釈倍率により、どれほどの量の自己抗体が含まれるか、半定量的に調べることも可能である。

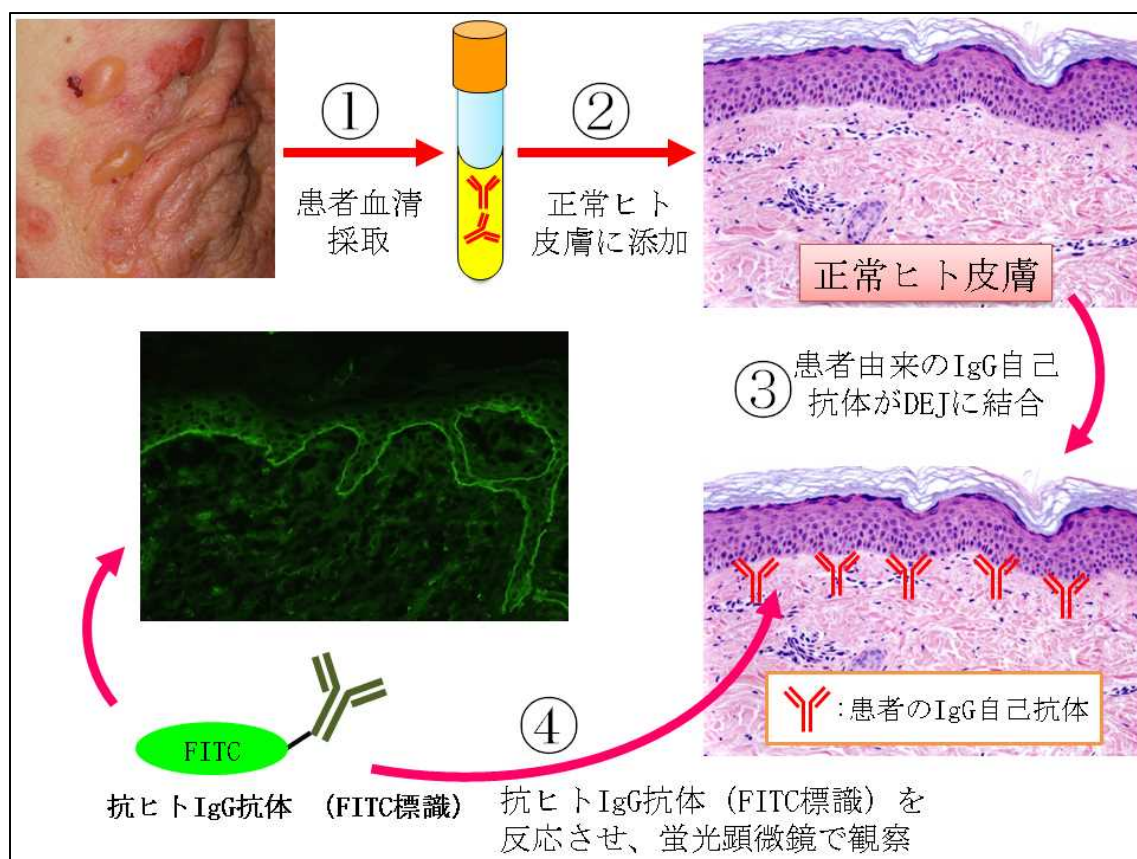


図 1 5 : IIF の原理。図は患者血清中の IgG 自己抗体を検出する際の例である。①患者血清を採取し、②正常ヒト皮膚の薄切切片に添加する。③すると、血清中の IgG 自己抗体が COL17 あるいは BP230 に結合する。④抗ヒト IgG 抗体 (FITC 標識) を薄切標本に添加、反応させ、洗浄後封入し蛍光顕微鏡で観察する。患者血清中に BP の自己抗原に対する抗体が含まれていれば、DEJ に線状の蛍光が観察できる。

IIF には変法がある。正常ヒト皮膚の表皮と真皮を人工的に分離させ、その薄切切片を基質とする方法で、split-skin IIF (ssIIF) と称される。1M 食塩水に正常ヒト皮膚を 24～48 時間浸漬すると、人工的に表皮と真皮が lamina lucida, 透明層で分離する。この場合、COL17 や BP230 といった BP の主要抗原は表皮側に分布する。このため、この処理した皮膚の薄切切片を基質とした IIF、すなわち ssIIF では、BP 患者血清中の自己抗体は表皮側に、まれに表皮側と真皮側の両方に沈着する (図 1 6)。この方法を用いることにより、自己抗原の局在が lamina lucida の上下どちらに存在するのかを簡単に知ることができ、真皮側の分子を抗原とする自己免疫性水疱症、たとえば COL7 を標的とする後天性表皮水疱症などと鑑別することが可能となる。後述の BP の診断基準でもこの ssIIF の項目がある。このため血清が残っていた症例は全

例で ssIIF を実施し、本研究における症例抽出に用いた。実際には、20 倍に希釈した患者血清を上掲の表皮と真皮を分離した正常ヒト皮膚の薄切標本に添加し、37℃で 30 分間反応させ、洗浄後に 100 倍に希釈した抗ヒト IgG 抗体（FITC 標識）を添加し、再び 37℃で 30 分間反応させ、洗浄後封入して蛍光顕微鏡による観察に供した。

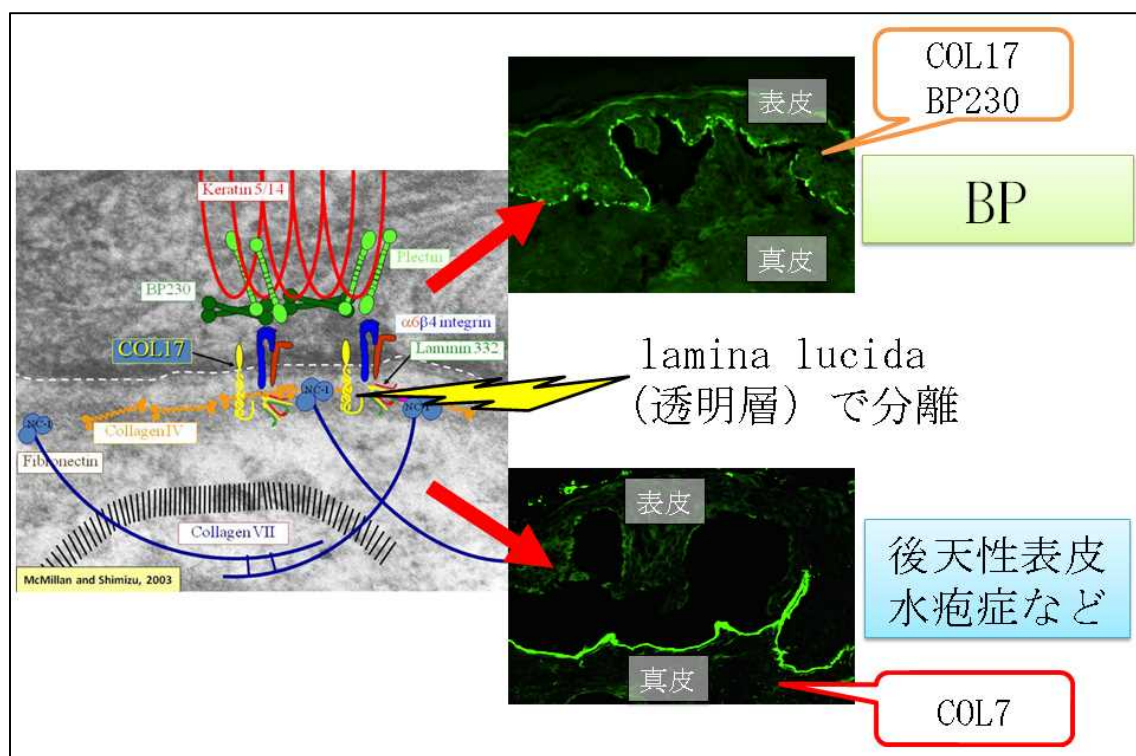


図 1 6 : ssIIF の原理。IIF と手技は同じであるが、1M 食塩水を用い表皮と真皮を lamina lucida（透明層）で分離させた正常ヒト皮膚を基質として使用することが特徴である。この方法では、BP 患者血清中の自己抗体は、表皮側に沈着する。

ELISA

患者血清中に COL17 の NC16A 領域、あるいは BP230 に対する自己抗体を簡便に測定可能な ELISA 法は、BP の診断に非常に有用である。特に COL17 の NC16A 領域に対する IgG 自己抗体の測定値は、臨床経過と相関するため治療の効果判定にも使用でき、BP の診療には欠かすことができない。このため COL17 の NC16A 領域に対する IgG 自己抗体の ELISA での定量は全例で実施した。測定は、すでに市販されている COL17 ELISA キットおよび BP230 ELISA キット（MBL, Nagoya, Japan）^{20,21} を用い、製造元のプロトコル通りに実施した（図 1 7）。まず、101 倍に希釈した患者血清を提供されている

マイクロウェルプレートに添加し、室温で1時間反応させ、血清中のIgG自己抗体を底面に結合しているリコンビナント蛋白に反応させる。洗浄後、添付されている horseradish peroxidase (HRP) で標識された抗ヒトIgG抗体を添加し、室温で1時間反応させる。さらに洗浄後に発色液を添加し、室温で30分発色させ、吸光度を測定し、index値を算出した。9U/ml未満を陰性とした。

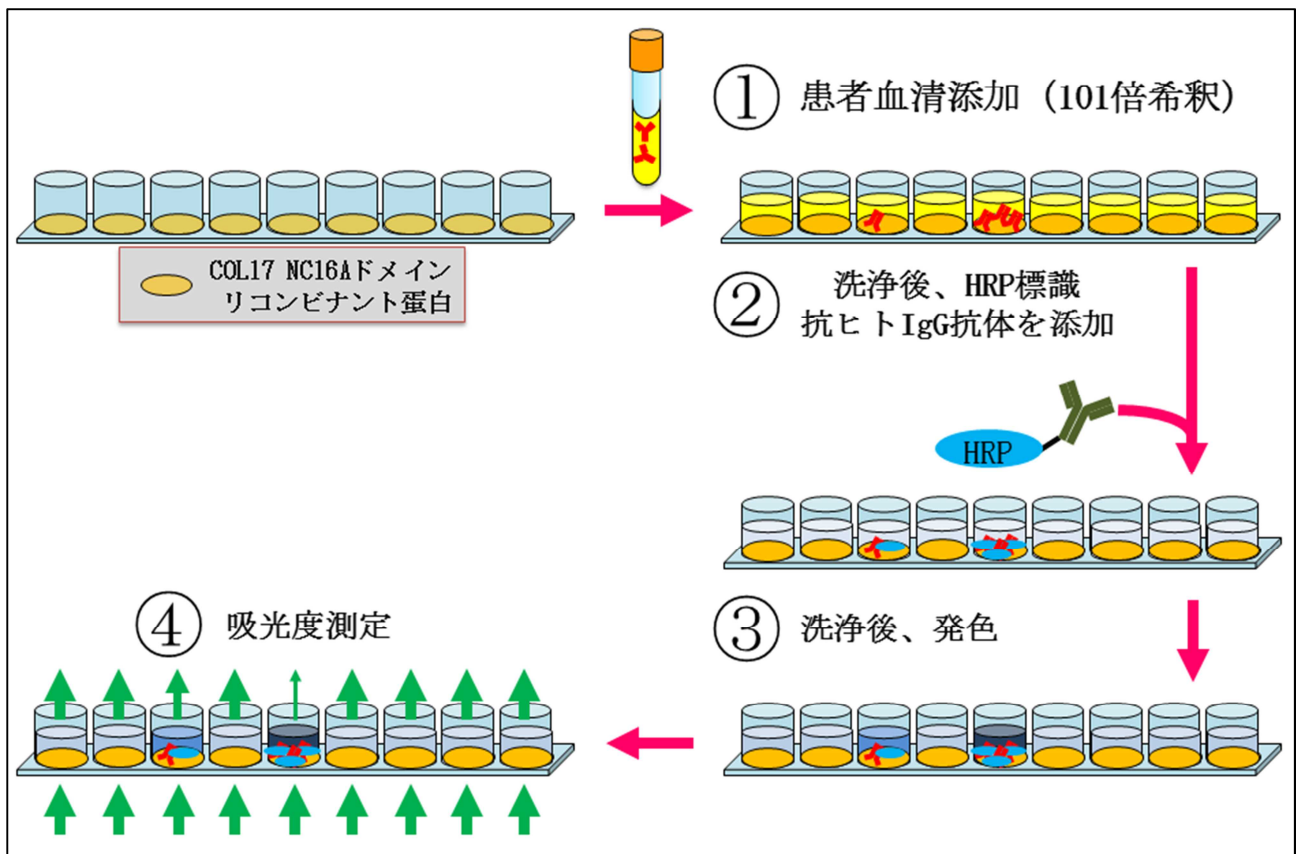


図17：ELISAの原理。図はCOL17 NC16Aドメインに対するIgG自己抗体を測定する場合。

BP患者の抽出

検討対象の候補症例は上述の方法（DIF、ssIIF、ELISA）により検討され、BPの診断基準に則り100症例をBPと診断した。症例は2004年から2013年の間に経験した症例である。診断基準は過去の報告²²を用いた。すなわち、

1. 臨床所見（びらん、湿疹様、蕁麻疹様。水疱の有無は問わない）
2. 水疱部の DIF で IgG 自己抗体あるいは C3 の表皮側への沈着が認められる。
3. 以下の①あるいは②を満たす。
 - ①ssIIF で IgG 自己抗体が表皮側、あるいは表皮側と真皮側両方に沈着する。
 - ②免疫ブロット法か ELISA のいずれかで、COL17 か BP230 に対する IgG 自己抗体が血清中に証明される。
4. 上記 3 を満たさない場合、DIF で水疱部の表皮側、あるいは表皮側と真皮側両方に IgG 自己抗体か C3 の沈着がある。

<補足>

患者血清が得られない場合、以下の 4 項目の臨床所見中、3 項目を満たせば良いものとする。ただし、DIF で IgG 自己抗体か C3 のいずれかの沈着が DEJ に見られることが前提である。

- ① 70 才以上
- ② 萎縮性瘢痕がないこと
- ③ 粘膜病変がないこと
- ④ 頭頸部が水疱病変の主体でないこと

IgE クラスの DIF

以上の方法で BP 患者を抽出したところで、DIF による IgE の観察について述べる。後述の診断基準に則り BP 症例を抽出した後、それらの症例で IgE 自己抗体が DEJ に沈着しているか、観察を試みた。ところが、他の免疫グロブリンクラスや C3 の沈着は上述の比較的単純な方法で容易に観察できるが、IgE の検出は非常に難しく研究開始当初はその沈着を見いだすことができなかった。これはおそらく IgE の量が IgG などに比して極めて少ないことに最大の原因があり、蛍光抗体法での視覚化は困難と考えられた。このことは IgE 自己抗体の DEJ への沈着を *in vivo* で検討した報告が僅かであることにも関わっているように思われる。その後も 2 次抗体の濃度を上げたり、反応させる時間を長くするなどいろいろ条件検討を重ねたが、このような方法では 2 次抗体の非特異的な沈着が増加するため、バックグラウンドが上がりすぎて DEJ に IgE 自己抗体が沈着しているのか判然としなくなり、IgE 自己抗体の *in vivo* での検出は暗礁に乗り上げたかに思われた。

一般的に抗体を用いた検出系でバックグラウンドを下げるためには、検出したいも

のを標識する 2 次抗体の濃度を適度に薄くすればよい。しかし本研究で試みた IgE 自己抗体検出系では、2 次抗体濃度を薄くするとバックグラウンドが下がるとともに、検出したい IgE 自己抗体の存在もさらに視覚化されづらくなるというジレンマがあった。もう一つバックグラウンドを下げる方法として、反応を緩徐にさせる方法がある。37℃など、高めの温度で 2 次抗体を反応させると非特異的な反応も多くなり、バックグラウンドが高くなることが多いとされている。そこで 2 次抗体を 4℃、オーバーナイトで反応させる方法を試み、2 次抗体の濃度の条件検討を併せて行った。すると、2 次抗体を 160 倍に希釈し、4℃、オーバーナイトで反応させるという条件下で IgE 自己抗体がきれいに線状に DEJ に沈着している症例を見いだすことができ、ようやくこの時点で IgE 自己抗体検出系が確立した。なお、用いた 2 次抗体は

IgE: polyclonal goat anti-human IgE-FITC (Acris Antibodies GmbH, Herford, Germany)

である。前述の方法で洗浄、封入し、蛍光顕微鏡による観察に供した。

なお、蛍光強度は強陽性を++、陽性を+、弱陽性を+/-、陰性を-とし（表 1）、二名の訓練された皮膚病理医が評価した。

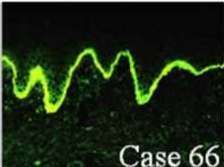
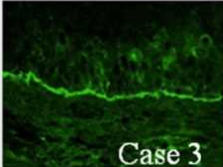
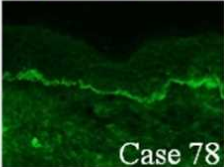
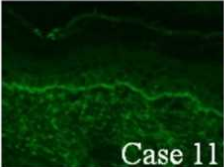
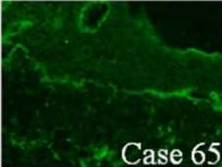
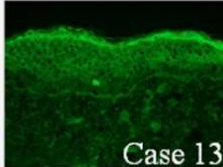
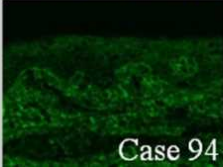
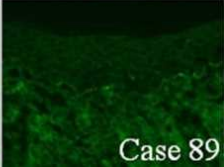
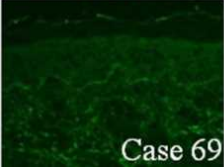
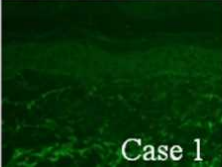
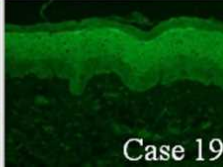
Intensity	IgG	C3	IgA	IgM	IgE
++	NA	 Case 66	NA	NA	NA
+	 Case 3	 Case 78	 Case 11	 Case 65	 Case 13
+/-	 Case 94	 Case 89	 Case 69	 Case 1	 Case 19

表 1：免疫蛍光抗体法の強度。 NA:該当症例なし

IgE クラスの IIF

上記の IgE クラスの DIF で IgE 自己抗体が陽性であった症例は、患者血清中の IgE 自己抗体の量が陰性であった症例に比して多いと推測されたため、血清を用いた IgE クラスの IIF を実施し、血清中の IgE 自己抗体の定性を試みた。しかし、図 1 5 で示した方法を IgE の検出に単純応用することはできない。なぜなら、患者血清中には IgE 自己抗体より遙かに大量の IgG 自己抗体が含まれ、この IgG 自己抗体が IgE 自己抗体検出系に強く干渉するからである。このため患者血清に十分量の Protein G ビーズ (Protein G Sepharose 4 Fast Flow, GE Healthcare, U.K.) を混合し、4°C オーバーナイトで反応させて IgG を吸着したのちビーズを濾過し、IgG を除去した。IgG 除去後の血清を正常ヒト皮膚の薄切標本に添加し、4°C、オーバーナイトで反応させた。洗浄したのち、上述の抗ヒト IgE 抗体を 160 倍に希釈して 4°C オーバーナイトで反応させ、蛍光顕微鏡による観察に供した (図 1 8)。IgG が除去されていることは、IgG 除去後の血清を正常ヒト皮膚に反応させたのちに、抗ヒト IgG 抗体が DEJ に沈着しないことにより確認した。

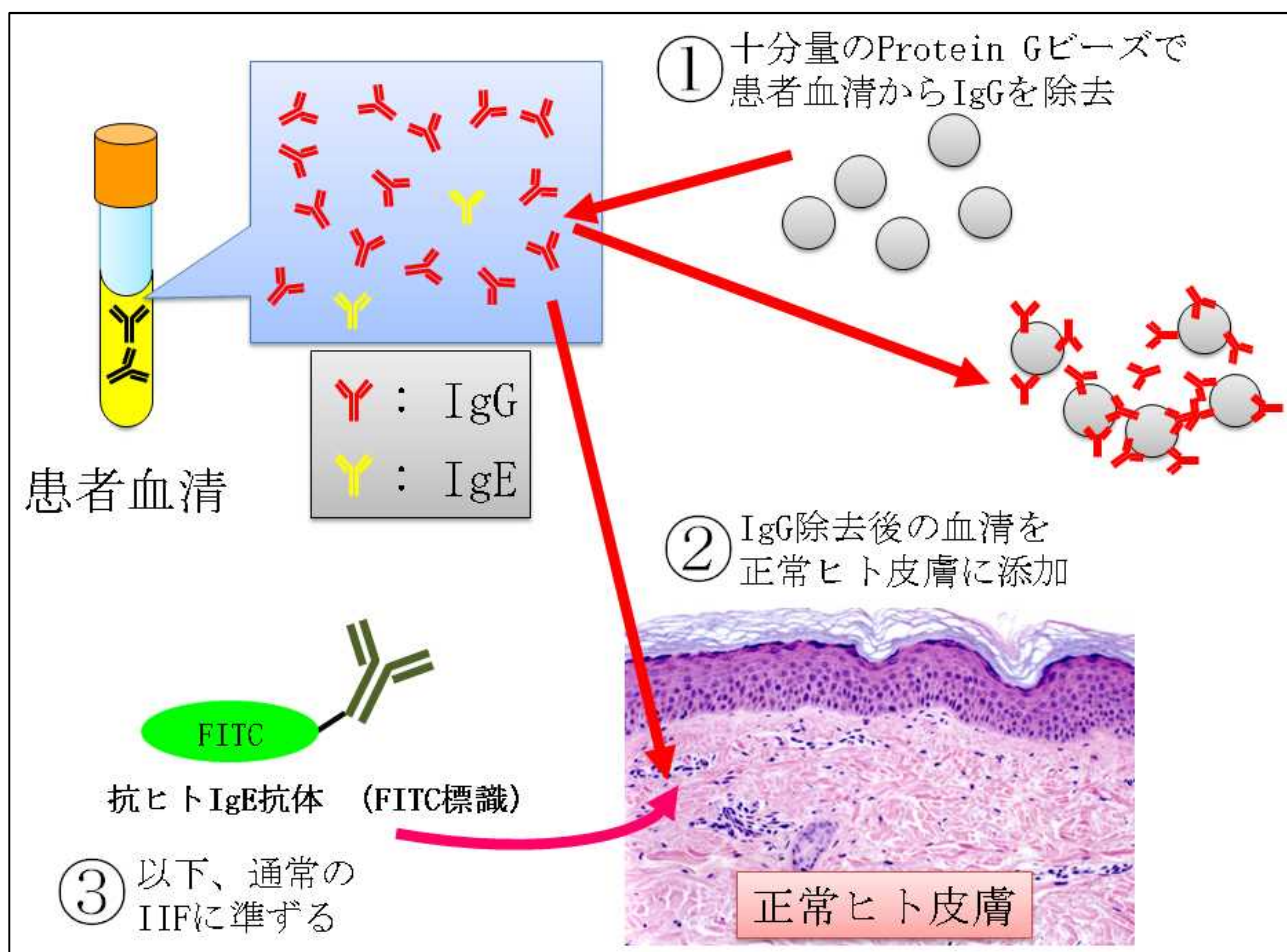


図18 : IgE クラスの IIF 方法。患者血清中に含まれる大量の IgG 自己抗体の干渉が予想されたため、①Protein G ビーズを患者血清に十分量混合し、吸着して除去したのち、②残った血清で IIF を実施した。

臨床症状および治療経過の評価

臨床経過は過去に報告された指標を用いて評価し、以下の5群に分類した²³。

治療強度を漸減中で完全寛解を維持：最小治療以上の治療を受けているものの、病変の新生がなく完全寛解している場合。

最小治療で完全寛解を維持：最小治療で最低でも2ヶ月間完全寛解を維持している場合。

無治療で完全寛解維持：無治療で最低でも2ヶ月間完全寛解を維持している場合。

再発：1ヶ月に4つ以上の新生病変（水疱、湿疹様病変あるいは蕁麻疹様の局面）が発生するか、1週間以内に治癒しない10センチメートル以上の大病変を形成、あるいは病勢のコントロールがついた患者の既存の皮膚病変とそう痒が悪化していく場合。

初期治療に失敗：4週間のプロピオン酸クロベタゾール外用（40g/day 以上）、3週間のプレドニゾロン全身投与（0.75mg/kg/day 以上）、4週間の限量のテトラサイクリン投与、4週間のダプソン投与（1.5mg/kg/day 以上）、4週間のメソトレキセート投与（15mg/week 以上）、4週間のアザチオプリン投与（2.5mg/kg/day 以上）、4週間のミコフェノール酸モフェチル投与（40mg/kg/day 以上）のいずれかを実施したにも関わらず病変が新生したり、既存の病変が拡大を続ける場合。

なお、ここでいう「最小治療」とは、体重kgあたりプレドニゾロン換算で0.1mg/kg/day以下の投与量か、20g/week以下のプロピオン酸クロベタゾールの外用により、寛解を維持できている場合の治療を指す。なお、補助療法としてメソトレキセート投与（5mg/week 以下）、アザチオプリン投与（0.7mg/kg/day 以下）、ミコフェノール酸モフェチル投与（500mg/day 以下）、ミコフェノール酸投与（360mg/day 以下）、あるいはダプソン投与（50mg/day 以下）が併用されていた場合も、最小治療に含まれる。

なお、本研究は、ヘルシンキ宣言に則り、北海道大学大学院医学研究科医学倫理委員会の承認を得た上で、全ての参加者から書面による同意を得て実施した。

実験結果

BP 患者 100 例の臨床所見および、免疫学的、組織学的所見の特徴

抽出された 100 例の内訳は男性 47 名、女性 53 名であり、年齢は 41 歳から 99 歳にわたり、平均は 72.2 歳であった。

臨床所見

BP 患者 100 例の臨床的特徴を表 2 に示す。90%の症例は浮腫性紅斑、水疱、びらんを主体とした典型例であった。亜型である結節性類天疱瘡は 5%、紅皮症型類天疱瘡は 1%、尋常性乾癬合併例は 4%存在した。

典型的BP	結節性 類天疱瘡	紅皮症型 類天疱瘡	尋常性乾癬 合併のBP
90% (90/100)	5% (5/100)	1% (1/100)	4% (4/100)
			

表 2 : BP 症例 100 例の臨床的特徴。90%の症例は浮腫性紅斑、水疱、びらんを主体とした典型的な症例であったが、亜型である結節性類天疱瘡が 5%、紅皮症型類天疱瘡が 1%存在した。尋常性乾癬合併例は 4%だった。

DIF

BP 症例 100 例での DIF の検討では、DEJ に IgG 自己抗体、C3、IgA 自己抗体、IgM 自己抗体がそれぞれ 89%、98%、13%、17%で沈着が見られた。問題の IgE 自己抗体は、18%の症例で沈着が認められた（図 19）。なお、抗ヒト IgE 抗体が IgG に交差反応する可能性については、多数の症例が IgG 自己抗体の沈着は認められるが IgE 自己抗体の沈着は認められない、という実験結果から否定しえた。

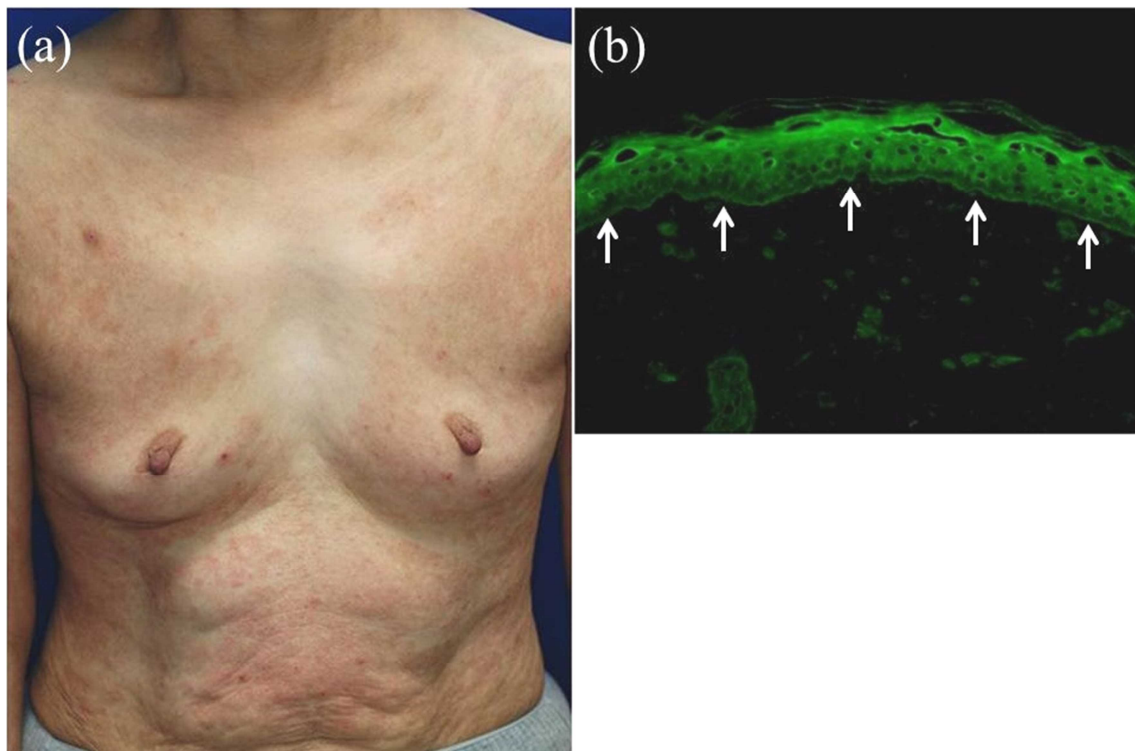


図 19 : DIF で IgE 自己抗体の DEJ への沈着がみられた症例の臨床像。(a) 浮腫性の紅斑が多発している。(b) IgE クラスの DIF の所見。DEJ に線状に IgE 自己抗体が沈着している（矢印）。

ELISA

BP 症例 100 例で実施した ELISA の結果では、COL17 と BP230 に対する IgG 自己抗体が、それぞれ 95%の症例と 64.4%の症例で認められた。COL17 ELISA は、index 値が 2920 から陰性まで幅広く分布していた。3%の症例はいずれの ELISA も陽性を示さなかったが、これらの症例の診断は①臨床症状、②患者血清を用いた ssIIF で表皮側に IgG の

沈着が見られること、③表皮抽出液および患者血清を用いた免疫ブロット法で COL17 に反応する IgG 自己抗体が血清中に存在することを、それぞれ確認することで担保された。COL17 ELISA と BP230 ELISA がいずれも陽性であった症例は 58.9%、COL17 ELISA が陰性で BP230 ELISA が陽性であった症例は 5.6%、COL17 ELISA が陽性で BP230 ELISA が陰性であった症例は 32.2%であった。

IgE クラスの IIF

DIF で IgE 自己抗体が DEJ に沈着が見られた症例の血清を用いた IIF では、16 例中 3 例のみに DEJ に沈着が見られた。

治療

83%の症例は初期治療として、BP に対する標準治療であるプレドニゾロンの全身投与が選択された。治療の結果は概ね良好であったものの、7 例では初期治療に失敗し、16 例では治療を漸減中に再発した。

全症例の年齢、性別や DIF・ELISA・臨床型・治療および経過は表 3 にまとめた。DIF で IgE 自己抗体の沈着が見られた症例については、IgE クラスの IIF の結果も併記した。

Case	年 齡	性 別	DIF					ELISA Index		IIF (IgE)	臨床型	初期治療	追加治療	臨床 經過
			IgG	C3	IgA	IgM	IgE	COL17	BP230					
1	88	F	+	+	+/-	+/-	+	828	133	-	典型	PSL 0.73 mg/kg/day	IVIg CsA DDS, MINO	CR2
2	56	M	+	+	+	-	+	740	59	++	典型	PSL 0.6 mg/kg/day		CR2
3	83	F	+	+	-	-	+	165	119	-	典型	PSL 0.75 mg/kg/day		F
4	47	M	-	+	-	+	+	231	N	+	乾癬合併	PSL 30 mg		CR2
5	86	F	+	+	-	-	+	110	ND	ND	典型	MINO		CR3
6	66	M	+/-	+	-	-	+	90	N	-	典型	PSL 0.5 mg/kg/day		CR1
7	62	F	+	+	-	-	+	73	48	+/-	典型	PSL 30 mg, MINO		RLP
8	76	F	+	+	-	+	+	65	N	-	典型	PSL 30 mg		CR1
9	50	F	-	+	-	+/-	+	56	N	-	紅皮症型	PSL 0.5 mg/kg/day		CR2
10	61	F	-	+	-	-	+	28	112	-	結節性	PSL 0.5 mg/kg/day		CR2
11	70	F	+	+	+	-	+	27	N	-	典型	NA, TC	CR3	
12	69	F	+	+	-	-	+	N	125	-	典型	Topical corticosteroid only	CR3	
13	82	F	+	+	-	-	+	N	93	-	典型	Topical corticosteroid only	CR3	
14	81	F	+	+	-	-	+/-	84	86	-	典型	PSL 15 mg	CR1	
15	41	F	+	+	-	-	+/-	81	N	-	典型	PSL 1.25 mg/kg/day	CR2	
16	73	M	+	+	-	-	+/-	30	98	-	典型	Topical corticosteroid only	Unknown	
17	68	F	+	+	-	-	+/-	26	ND	ND	典型	PSL 0.68 mg/kg/day	CR2	
18	42	F	+	+	+/-	+	+/-	10	N	-	結節性	MINO	CR3	
19	51	F	+	+	-	-	-	2920	24		典型	PSL 1.2 mg/kg/day	SP x2, IVIg	F
20	72	F	+/-	+	-	-	-	2630	9		典型	PSL 0.9 mg/kg/day	SP x1	F
21	82	M	+	+	-	-	-	2604	ND		典型	PSL 0.67 mg/kg/day	CR2	
22	64	M	-	+	-	-	-	1948	26		乾癬合併	PSL 0.75 mg/kg/day	CR1	
23	89	M	+	+	-	-	-	1612	17		典型	PSL 0.5 mg/kg/day	CR1	
24	92	F	+	+	-	-	-	1156	N		典型	PSL 20 mg	CR3	
25	68	F	+	+	-	-	-	1146	ND		典型	PSL 1.0 mg/kg/day	SP x1	CR1
26	68	F	+	+	-	-	-	1036	N		典型	PSL 0.7 mg/kg/day	CR1	
27	75	F	+	+	-	-	-	1020	105		結節性	PSL 1.0 mg/kg/day, MINO	CR1	
28	82	M	+	+	-	-	-	750	N		Sezary syndrome 合併	PSL 1.0 mg/kg/day	SP x2, PPx21, IVIg	F
29	70	F	+	+	-	-	-	724	90		典型	PSL 0.74 mg/kg/day	CR1	
30	80	F	+	+	-	-	-	640	ND		典型	PSL 1.0 mg/kg/day	RLP	
31	74	M	+	+	-	-	-	624	21		典型	PSL 0.63 mg/kg/day	PP x3	CR1
32	75	F	+	+	-	-	-	540	41		典型	PSL 1.0 mg/kg/day	SP x1	CR1
33	72	M	+	+	-	-	-	474	24		典型	PSL 0.86 mg/kg/day	SP x1	CR1
34	65	M	+	+	-	-	-	380	54		典型	PSL 0.85 mg/kg/day	CR1	
35	62	M	+	+	-	-	-	360	N		典型	PSL 0.5 mg/kg/day	CR1	
36	77	M	+	+	-	-	-	320	146		典型	PSL 0.48 mg/kg/day	CR1	

37	69	M	+/-	+	-	+	-	304	40		典型	PSL 0.54 mg/kg/day		RLP
38	42	F	+	+	-	-	-	280	N		典型	PSL 1.1 mg/kg/day		CR1
39	82	F	+	+	-	-	-	276	ND		典型	PSL 0.54 mg/kg/day		CR1
40	92	M	-	+	-	-	-	240	ND		典型	PSL 15 mg		CR1
41	73	M	+/-	+	-	-	-	228	72		典型	PSL 0.48 mg/kg/day		CR1
42	72	F	-	+	-	-	-	222	N		典型	PSL 0.5 mg/kg/day		CR2
43	83	F	+	+	-	-	-	214	N		典型	PSL 0.38 mg/kg/day		RLP
44	71	F	+/-	+	-	-	-	209	N		典型	PSL 0.77 mg/kg/day		CR2
45	73	F	+	+	-	-	-	209	143		典型	PSL 1.5 mg/kg/day	SPx2, CsA, MMF, AZA	F
46	69	F	+	+	-	-	-	209	N		典型	PSL 0.79 mg/kg/day	PP x3	CR3
47	68	F	+	+	-	-	-	200	40		典型	PSL 0.53 mg/kg/day		RLP
48	99	M	+	-	-	-	-	194	ND		典型	PSL 0.66 mg/kg/day		RLP
49	46	M	+/-	+	-	-	-	191	N		典型	PSL 1.2 mg/kg/day		RLP
50	75	F	+	++	-	-	-	177	N		典型	PSL 0.82 mg/kg/day		RLP
51	76	F	+	+	-	-	-	155	ND		典型	PSL 1.3 mg/kg/day, NA, MINO		F
52	77	M	+	+	-	-	-	155	N		典型	PSL 20 mg, MINO		CR1
53	88	F	+	+	-	-	-	152	74		典型	PSL 1.2 mg/kg/day		CR1
54	98	M	+/-	+	+/-	-	-	134	77		典型	PSL 30 mg		CR1
55	65	M	+	+	+/-	+/-	-	112	N		典型	PSL 20 mg		CR1
56	79	M	+	+	-	-	-	103	34		典型	PSL 0.53 mg/kg/day MINO		CR1
57	74	F	+	+	-	-	-	103	101		典型	PSL 0.47 mg/kg/day		RLP
58	53	F	+	+	-	-	-	99	N		典型	PSL 1.0 mg/kg/day		CR2
59	57	F	-	+	-	-	-	98	N		典型	PSL 0.55 mg/kg/day		CR2
60	78	M	+	+	-	-	-	97	N		典型	PSL 1.0 mg/kg/day		RLP
61	80	M	+/-	-	-	-	-	95	N		典型	PSL 15 mg		CR2
62	84	F	+	+	-	-	-	93	78		典型	PSL 10 mg		CR2
63	81	M	+/-	+	-	+	-	91	38		典型	PSL 30 mg		CR1
64	73	F	+	++	-	-	-	88	46		典型	PSL 0.54 mg/kg/day NA, MINO		CR1
65 [†]	67	F	+	+	-	-	-	86	103		典型	NA, MINO, IFX, MTX		CR1
66	80	M	+/-	+	-	-	-	79	84		典型	MINO		CR3
67	66	M	+	+	+/-	-	-	75	54		典型	PSL 20 mg		RLP
68	78	M	+	+	-	-	-	73	82		典型	PSL 0.6 mg/kg/day		RLP
69	69	F	+	+	-	-	-	73	N		典型	PSL 20 mg		RLP
70	72	M	+	+	-	+	-	72	88		典型	PSL 30 mg		CR1
71	65	M	+	+	-	-	-	72	13		典型	PSL 1.0 mg/kg/day		RLP
72	77	F	+	+	-	-	-	68	101		典型	PSL 0.86 mg/kg/day		CR1
73	55	M	+	+	-	-	-	68	N		典型	PSL 10 mg, MINO		CR1
74	81	F	+	+	-	-	-	68	N		典型	PSL 0.75 mg/kg/day		RLP
75	70	M	+	+	-	-	-	67	N		典型	PSL 0.5 mg/kg/day, MINO		CR2
76	63	F	+	+	-	-	-	65	12		典型	PSL 1.0 mg/kg/day	SP x1, PP x3	F

77	80	M	+	+	-	+/-	-	64	80		典型	PSL 0.5 mg/kg/day		CR1
78	67	M	+	+/-	-	-	-	63	86		乾癬合併	MINO		CR3
79	74	M	+	+	+/-	+	-	60	98		典型	PSL 20 mg		CR1
80	77	M	+	+	-	-	-	58	72		典型	PSL 20 mg		CR3
81	73	F	+	+	-	-	-	57	41		典型	PSL 60 mg, NA, MINO		CR1
82	60	M	+	+	-	-	-	52	87		結節性	PSL 0.38 mg/kg/day		CR2
83	59	M	+/-	+	-	-	-	52	66		典型	PSL 0.48 mg/kg/day		CR1
84	75	M	+	+	-	-	-	46	64		典型	PSL 0.50 mg/kg/day		CR1
85	91	M	+	+	-	+	-	44	37		典型	NA, MINO		CR3
86	91	F	+	+	-	-	-	35	96		典型	PSL 2.5 mg		CR3
87	88	M	-	+/-	-	-	-	31	46		典型	PSL 30 mg		CR1
88	76	M	+	+	-	-	-	30	73		典型	PSL 0.55 mg/kg/day NA, MINO		CR1
89	72	M	+	+	-	-	-	29	109		典型	PSL 20 mg		CR2
90	41	F	+/-	+	+/-	+/-	-	26	89		結節性	NA, MINO		CR3
91	70	F	+	+	-	-	-	21	61		典型	Topical corticosteroid only		CR3
92	83	F	+/-	+	-	-	-	19	9		乾癬合併	NA, MINO		RLP
93	78	M	+	+	+	+	-	18	ND		典型	Topical corticosteroid only		CR3
94	47	M	-	-	-	-	-	15	N		典型	PSL 1.0 mg/kg/day		CR1
95	72	F	-	+	-	-	-	N	75		典型	PSL 0.5 mg/kg/day		CR3
96	77	M	+	+	+	+	-	N	35		典型	PSL 10 mg		CR3
97	84	F	-	-	-	-	-	N	19		典型	PSL 0.53 mg/kg/day		CR3
98	82	M	+	+/-	+	+/-	-	N	N		典型	Topical corticosteroid only		Unknown
99	77	F	+	+	+/-	-	-	N	N		典型	MINO		Unknown
100	89	F	+	+	-	+/-	-	N	N		典型	MINO		CR3

AZA, アザチオプリン; CR1, 治療強度を漸減中で完全寛解を維持; CR2, 最小治療で完全寛解を維持; CR3, 無治療で完全寛解維持; CsA, シクロスポリン; DDS, ダブソン DIF, direct immunofluorescence; F, 初期治療に失敗; IFX, インフリキシマブ; IIF, indirect immunofluorescence; IVIg, 免疫グロブリン大量療法; MINO, ミノサイクリン; MMF, ミコフェノール酸モフェチル; MTX, メソトレキセート, N, 陰性; NA, ニコチン酸アミド; ND, 未実施; PP, 血漿交換; PSL, プレドニゾロン; RLP, 再発; SP, ステロイドパルス療法; ssIIF, split-skin IIF; TC, テトラサイクリン

† 関節リウマチ合併のため、IFX を使用した。

表 3 : BP100 症例の DIF、IIF、ELISA、臨床症状の特徴、治療、経過

考察

自己免疫性水疱症の治療は副腎皮質ステロイドの全身投与が標準治療となっているが、緒言でも述べたように副作用が大きな問題となる。副作用の少ない、安全性の高い治療法が求められており、発症のメカニズムの解明はこの問題の解決において非常に重要な課題である。これまで自己免疫性水疱症の発症機序においては、IgG 自己抗体が主要な役割を発揮すると考えられてきた。近年それらの病態に IgE 自己抗体が深く関与しているという報告が相次いでいる²⁴⁻²⁶。IgE 上 (Fc 領域) に存在し、好酸球や肥満細胞、好塩基球細胞膜に発現する高親和 IgE レセプターとの結合部位に対するモノクローナル抗体 (オマリズマブ) を用い、IgE 自己抗体を抑制することにより BP の症状を改善させるという試みもなされるようになった¹⁶。しかし、IgE 自己抗体の BP 発症における役割は未だ不明であり、病変皮膚における *in vivo* での IgE 自己抗体の沈着に関する報告も極めて少ない¹⁷⁻¹⁹。このような問題の解決の一端を担うため、本研究では BP における IgE 自己抗体の生体内での沈着の頻度、およびその臨床症状・経過への影響を検討した。

IgE 自己抗体が DEJ に沈着していることに対する考察

まず、DIF で DEJ に IgE 自己抗体の沈着が見られた 18 例について考察する。18 例を表 3 から抽出し、あらたに表 4 として示す。症例は 41 歳から 88 歳にわたり、男性が 4 例、女性が 14 例と女性に多い傾向があった。DIF では、IgG 自己抗体が 3 例を除き DEJ に陽性であった。この IgG の沈着が見られなかった 3 例は、興味深い特殊な臨床所見を呈したので、後述する。C3 は全例で陽性であり、IgA 自己抗体は 4 例、IgM 自己抗体は 5 例で陽性であった。BP において、DIF で DEJ に IgA 自己抗体や IgM 自己抗体が沈着する例がときおり見られるが、病的意義は不明のままである。これらの沈着と IgE 自己抗体の沈着との関連を検討したが、相関はなかった。ELISA では、病勢を反映するとされる COL17 ELISA は index 値で 828 から陰性と幅広く分布しており、IgE 自己抗体の DEJ への沈着は ELISA の値の上昇に寄与していなかった。臨床型は、典型例が 14 例で、結節性類天疱瘡が 2 例、紅皮症型類天疱瘡が 1 例、

乾癬合併例が 1 例であった。ほとんどの症例で臨床経過は良好であり、2 例を除き比較的簡単に寛解を導入することができた。1 例は初期治療に反応しなかった重篤な症例で、もう 1 例は治療を漸減中に再発した症例である。この再発した症例（case 7）であるが、プレドニゾン全身投与を 30mg から開始し、11mg まで漸減したところで再発しており、その後プレドニゾンの増量のみで病勢のコントロールはつき、分類の定義上では再発に該当するものの、全体を通して治療への反応は良好であった。IgE クラスの IIF で DEJ への沈着が見られた 3 例（case 2, 4, 7）は、そうでない症例に比して循環血漿中の IgE 自己抗体の量が比較的多いと推測された。この 3 例をみると、臨床経過は概ね問題はみられず寛解導入に困難はなかった。Case 7 は再発に該当するが、経過が良好であったことは前に述べた。

Case	年齢	性別	DIF					ELISA Index		IIF (IgE)	臨床型	初期治療	臨床経過
			IgG	C3	IgA	IgM	IgE	COL17	BP230				
1	88	F	+	+	+/-	+/-	+	828	133	-	典型	PSL 0.73 mg/kg/day	CR2
2	56	M	+	+	+	-	+	740	59	++	典型	PSL 0.6 mg/kg/day	CR2
3	83	F	+	+	-	-	+	165	119	-	典型	PSL 0.75 mg/kg/day	F
4	47	M	-	+	-	+	+	231	N	+	乾癬合併	PSL 30 mg	CR2
5	86	F	+	+	-	-	+	110	ND	ND	典型	MINO	CR3
6	66	M	+/-	+	-	-	+	90	N	-	典型	PSL 0.5 mg/kg/day	CR1
7	62	F	+	+	-	-	+	73	48	+/-	典型	PSL 30 mg, MINO	RLP
8	76	F	+	+	-	+	+	65	N	-	典型	PSL 30 mg	CR1
9	50	F	-	+	-	+/-	+	56	N	-	紅皮症型	PSL 0.5 mg/kg/day	CR2
10	61	F	-	+	-	-	+	28	112	-	結節性	PSL 0.5 mg/kg/day	CR2
11	70	F	+	+	+	-	+	27	N	-	典型	NA, TC	CR3
12	69	F	+	+	-	-	+	N	125	-	典型	Topical corticosteroid only	CR3
13	82	F	+	+	-	-	+	N	93	-	典型	Topical corticosteroid only	CR3
14	81	F	+	+	-	-	+/-	84	86	-	典型	PSL 15 mg	CR1
15	41	F	+	+	-	-	+/-	81	N	-	典型	PSL 1.25 mg/kg/day	CR2
16	73	M	+	+	-	-	+/-	30	98	-	典型	Topical corticosteroid only	Unknown
17	68	F	+	+	-	-	+/-	26	ND	ND	典型	PSL 0.68 mg/kg/day	CR2
18	42	F	+	+	+/-	+	+/-	10	N	-	結節性	MINO	CR3

CR1, 治療強度を漸減中で完全寛解を維持; CR2, 最小治療で完全寛解を維持; CR3, 無治療で完全寛解維持; DIF, direct immunofluorescence; F, 初期治療に失敗; IIF, indirect immunofluorescence; MINO, ミノサイクリン; N, 陰性; NA, ニコチン酸アミド; ND, 未実施; PSL, プレドニゾン; RLP, 再発; TC, テトラサイクリン

表 4 : DIF で IgE 自己抗体が DEJ に沈着していた症例。

以上の考察により、以下のごとく結論した。

- ①IgE 自己抗体の DEJ への沈着は、他の免疫グロブリンクラスや補体の沈着とは独立して起きている。
- ②IgE 自己抗体の DEJ への沈着は、病勢を反映するとされる ELISA の数値の増減に寄与しない。
- ③IgE 自己抗体の DEJ への沈着は、臨床経過に影響を及ぼさない。
- ④IgE クラスの IIF による、血清中の IgE 自己抗体の定性の結果は臨床経過に影響を及ぼさない。

これまで *in vitro* の検索で循環血漿中の IgE 自己抗体が多いと、臨床症状が重篤になりやすい可能性を指摘した報告¹³があったが、今回の *in vivo* の検討結果ではそのような関連は見られなかった。本研究では IgE クラスの ELISA は実施していないが、血清中の IgE 自己抗体量が多ければ、DIF で IgE 自己抗体の沈着が DEJ に見られやすいわけではない可能性もある。なお、IgE クラスの IIF の感度が低かったが、この原因はやはり IgE のそもそもの絶対量がきわめて少量であることに起因しているように思われる。微量の血清を用いる IIF では、その血清中に IgE 自己抗体が相当量含まれていないと、DEJ への沈着が視覚化されない可能性がある。この点 DIF は、血流に乗って循環する IgE 自己抗体に長時間さらされた病変皮膚を検体としている。DEJ に比較的多量の IgE 自己抗体が沈着していることが推測され、DIF のほうが IIF より検出感度が高くなる可能性が推測された。

緒言でも述べたが、BP における IgE 自己抗体の生体内での沈着を解析した報告は少数にとどまり、これにはおそらく IgE 自己抗体の視覚化が困難であることが関与していると思われる。近年、Yayli らは BP 症例を 44 例集めて DIF を実施した研究を報告している¹⁹。それによると 41%の症例で DEJ に IgE 自己抗体の沈着が見られており、本研究より陽性率がかなり高かった。この乖離の原因は不明であるが、検出系の違いや、あるいは人種間の差異が関与しているかもしれない。彼らは IgE が沈着していた症例はそうでない症例に比して蕁麻疹様の皮疹の面積が広がったと述べているが、評価方法が示されておらず、また臨床経過や治療成績については記載がなく、IgE 自己抗体の

DEJ への沈着が臨床経過になんらかのインパクトを与えたのかどうかは判然としない。

DIF で IgG 自己抗体の沈着が見られず、IgE 自己抗体の沈着が DEJ に見られた症例に対する考察

Case 4, 9, 10 は、DIF で IgG 自己抗体の沈着が見られず、IgE 自己抗体の沈着が見られた症例である。この 3 例はそれぞれ尋常性乾癬合併例、紅皮症型類天疱瘡、結節性類天疱瘡であり、典型例はなかった。Case 4 と 9 の所見をそれぞれ図 20 と図 21 に示す。

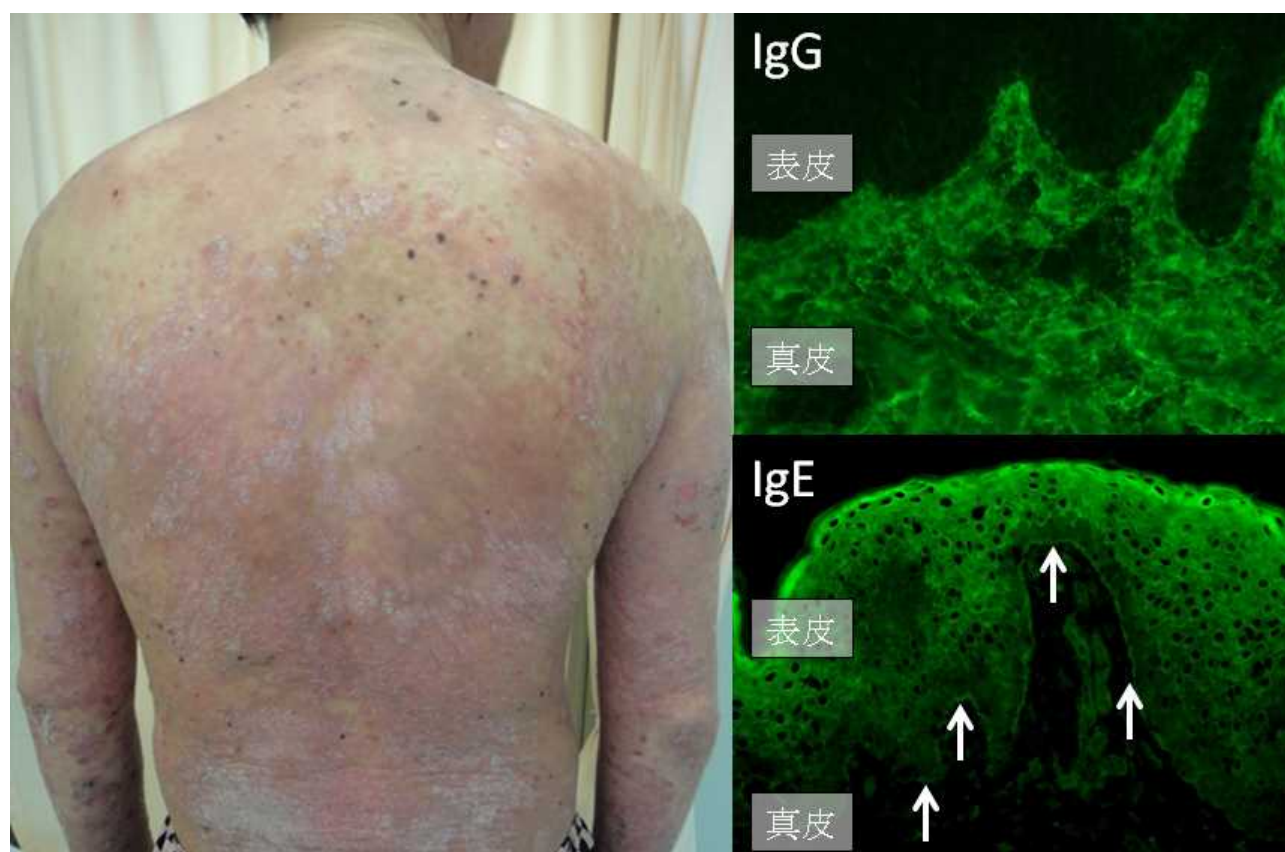


図 20 : Case 4 の所見。尋常性乾癬の合併例である。乾癬の角化性紅斑は目立つものの、浮腫性紅斑はあまり見られない。びらんも点々とある程度で、目立たない。DIF では DEJ に IgG 自己抗体の沈着は見られず、IgE 自己抗体のほうは見られる（矢印）。

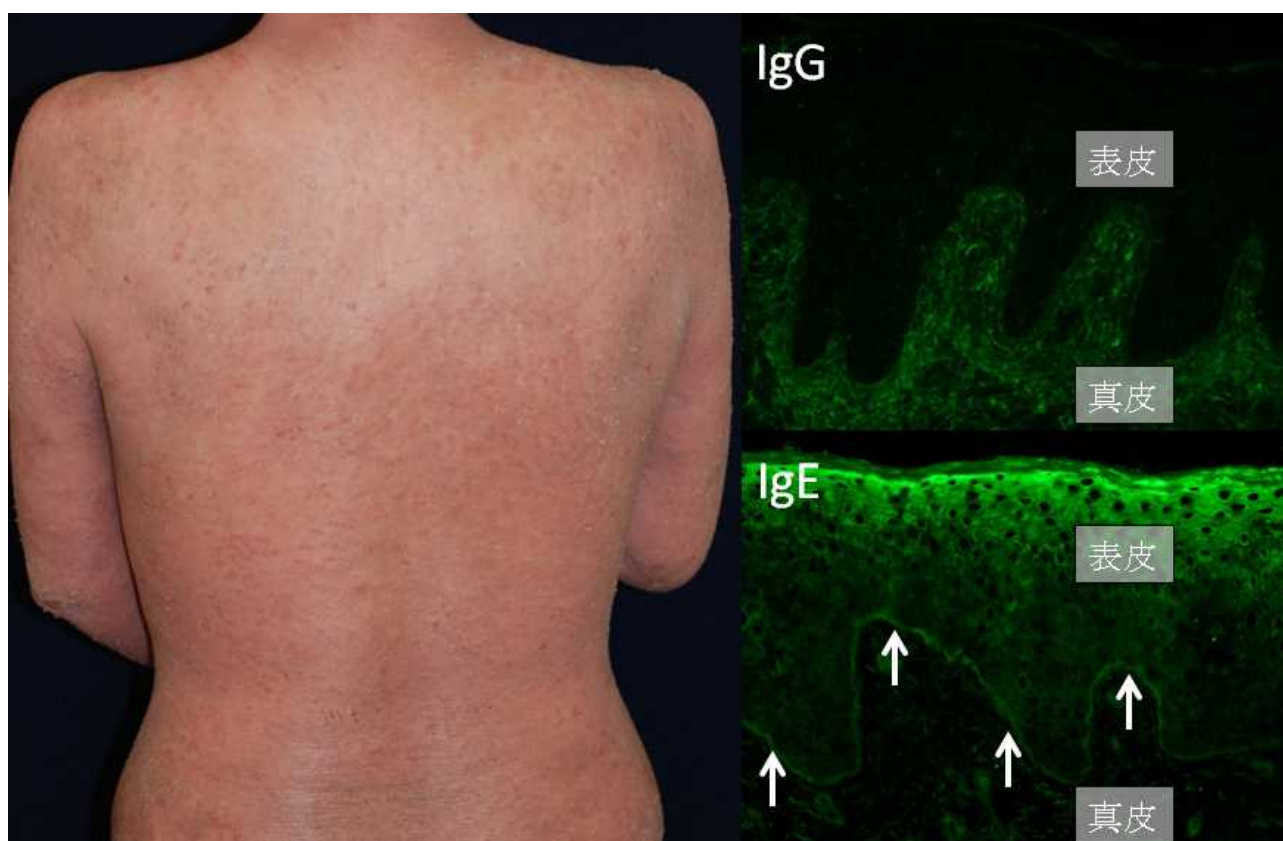


図 2 1 : Case 9 の所見。紅皮症型類天疱瘡の症例である。全身が落屑性紅斑で覆われており、びらんが見られない。Case 4 と同様、DIF では DEJ に IgG 自己抗体の沈着は見られず、IgE 自己抗体のほうは明瞭に見られる（矢印）。

いずれの症例もびらん・水疱がきわめて少ないことが特徴であり、BP の臨床所見としては明らかに非典型的であった。このように、DEJ に IgG 自己抗体の沈着が目立たず IgE 自己抗体の沈着が見られる症例は、びらん・水疱形成もあまり見られないという特徴を持つ可能性が考えられた。なぜこのような非典型的な臨床像を呈したかは不明であるが、動物モデルにおいては IgE 自己抗体がおもに紅斑形成に¹⁰、IgG 自己抗体が水疱形成に関わる可能性が指摘されており²⁷、case 4, 9 のような DIF のパターンだと、水疱形成が少なく、紅斑が主体の臨床症状になるという推測もできる。将来、同様の症例が蓄積されれば BP から独立した疾患概念が確立するかも知れない。このような症例には IgE をターゲットとした治療がより奏功する可能性も考えられる。

本研究の問題点

本研究の問題点は、以下の4点である。それらへの対応も記載した。

1. 本研究全体に通ずる問題として、蛍光抗体法による IgE の検出が難しいことが挙げられる。原因は上述したようにその量が極めて少なく、FITC で標識した 2 次抗体で視覚化するには、相当量の IgE 自己抗体が自己抗原に結合している必要がある。この検出感度の問題は重要であり、将来的により感度の高い蛍光色素が使用可能になれば、IgE 自己抗体の沈着がないとされていた症例が陽性に転じる可能性もある。さらなる検出感度の向上は、より正確な IgE 自己抗体の生体内での沈着と、臨床経過の相関を研究するに当たり非常に重要である。
2. DIF で観察した IgE の対応抗原が、COL17 であるか確認していない。本研究では IgE 自己抗体の検出に蛍光抗体法を使用しているが、免疫ブロット法や IgE クラスの ELISA は実施していない。研究を展開するにあたり、今後は蛍光抗体法のみこだわらず、これらの方法を実施して自己抗原の確定を並行で進める必要がある。
3. DIF の検討は、全て初診時の検体を用いて実施している。このため、同一症例で、病期によって DIF の結果が変化する可能性について検討できていない。同一症例の DIF の結果を時系列で観察することにより、自己抗体の動きがわかり、BP の病態の理解が一層進むと思われる。このため、今後は症例数を集めるだけでなく、時系列で自己抗体の動きを追うスタディも実施されることが望ましい。
4. 本研究ではネガティブコントロールを置いていないため、DIF で見られた IgE が本当に自己抗体と言えるのか不明瞭である。今後の研究を進めるにあたり、正常ヒト皮膚、あるいは BP 症例の非病変皮膚や、アトピー性皮膚炎など IgE が上昇しやすい皮膚疾患の病変皮膚をネガティブコントロールとして設定することが望ましい。

総括および結論

本研究では、BP における *in vivo* での IgE 自己抗体の沈着と臨床経過との相関を、100 例という大規模な症例数で解析した。本研究での新知見は下記に記すとおりである。

- ① IgE 自己抗体の DEJ への沈着は 18%の症例で見られたが、IgE 自己抗体の沈着は BP の病勢を反映するとされる ELISA の値や、臨床経過と相関しなかった。
- ② DIF において IgG 自己抗体の沈着がみられず、IgE 自己抗体が沈着する症例では、びらん・水疱形成が僅かとなる非典型的な臨床型を呈する可能性が示唆された。

これらの新知見の意義として、まず 100 症例という大規模なスタディにより、18%の症例で IgE 自己抗体の沈着が *in vivo* で見られたことを指摘したことが挙げられる。本研究は、BP の *in vivo* における IgE の観察をした研究の中で最大の症例数を扱っており、また日本人における IgE 自己抗体の陽性率を示した最初の研究である。陽性率のみならず臨床経過との比較も重視し、循環血漿中に COL17 に対する IgE 自己抗体が多いと臨床症状が重篤になりやすい可能性が指摘される中、*in vivo* での IgE 自己抗体の沈着がなぜか臨床経過に影響しないことを指摘できたことにも深い意義がある。この結果は、循環血漿中の IgE 自己抗体が多いとその分 DEJ に IgE 自己抗体が多く結合する、という単純な考えを否定するものかもしれない。他の免疫グロブリンクラス、とくに IgG 自己抗体が自己抗原に結合して、IgE 自己抗体が結合できる場所を占拠してしまう可能性など、いろいろな推論を提供できる可能性がある。また、BP において IgE 自己抗体が IgG 自己抗体とは異なる作用を発揮し、その DEJ への沈着のバランスが臨床症状に変化をもたらす可能性を指摘できたことも意義があり、今後同様の症例が蓄積されることにより独立疾患となる可能性についても言及できた。これらの新知見から、今後他の自己免疫性水疱症（たとえば天疱瘡や、他の特殊な類天疱瘡）の研究において、IgE

自己抗体の病原性の研究が進展する可能性があるであろうし、IgG 自己抗体と IgE 自己抗体のバランスで臨床型や治療方法が変化するという議論が起こることも考えられる。今後の課題として、生体内での IgE 自己抗体の検出感度の向上が重要である。

謝辞

稿を終えるにあたり、本研究の機会を与えてくださり多くの御指導と御助言を賜りました、北海道大学大学院医学研究科皮膚科学分野 清水 宏教授に、そして直接御指導いただきました北海道大学大学院医学研究科皮膚科学分野 西江 渉講師に心より感謝いたします。そして本研究にご協力いただきました水疱性類天疱瘡患者さんに深く御礼申し上げます。最後に、北海道大学大学院医学研究科皮膚科学分野の教室員、技術員、秘書各位に心より御礼申し上げます。とくに田邊美香さんからは、技術面での多大なるサポートをいただきました。

引用文献

1. Giudice, G.J. *et al.* Bullous pemphigoid and herpes gestationis autoantibodies recognize a common non-collagenous site on the BP180 ectodomain. *J. Immunol.* 151, 5742-5750 (1993).
2. Nishie, W. Update on the pathogenesis of bullous pemphigoid: an autoantibody-mediated blistering disease targeting collagen XVII. *J. Dermatol. Sci.* 73, 179-186 (2014).
3. Nishie, W. *et al.* Humanization of autoantigen. *Nat. Med.* 13, 378-383 (2007).
4. Liu, Z. *et al.* A passive transfer model of the organ-specific autoimmune disease, bullous pemphigoid, using antibodies generated against the hemidesmosomal antigen, BP180. *J. Clin. Invest.* 92, 2480-2488 (1993).
5. Wu, Y. *et al.* Anti-collagen XVII single-chain Fv antibody blocks the autoimmune reaction mediated by pathogenic autoantibodies in bullous pemphigoid. *J. Dermatol. Sci.* 72, 25-31 (2013).

6. Di Zenzo, G., Marazza, G., Borradori, L. Bullous pemphigoid: physiopathology, clinical features and management. *Adv. Dermatol.* 23, 257-288 (2007).
7. Alonso-Llamazares, J., Dietrich, S.M., Gibson, L.E. Bullous pemphigoid presenting as exfoliative erythroderma. *J. Am. Acad. Dermatol.* 39, 827-830 (1998).
8. Wilczek, A., Sticherling, M. Concomitant psoriasis and bullous pemphigoid: coincidence or pathogenic relationship? *Int. J. Dermatol.* 45, 1353-1357 (2006).
9. Zone, J.J. *et al.* IgE basement membrane zone antibodies induce eosinophil infiltration and histological blisters in engrafted human skin on SCID mice. *J. Invest. Dermatol.* 127, 1167-1174 (2007).
10. Fairley, J.A. *et al.* A pathogenic role for IgE in autoimmunity: bullous pemphigoid IgE reproduces the early phase of lesion development in human skin grafted to nu/nu mice. *J. Invest. Dermatol.* 127, 2605-2611 (2007).

11. Christophoridis, S. *et al.* IgG, IgA and IgE autoantibodies against the ectodomain of BP180 in patients with bullous and cicatricial pemphigoid and linear IgA bullous dermatosis. *Br. J. Dermatol.* 143, 349-355 (2000).
12. Döpp, R. *et al.* IgG4 and IgE are the major immunoglobulins targeting the NC16A domain of BP180 in bullous pemphigoid: serum levels of these immunoglobulins reflect disease activity. *J. Am. Acad. Dermatol.* 42, 577-583 (2000).
13. Messingham, K.A. *et al.* A novel ELISA reveals high frequencies of BP180-specific IgE production in bullous pemphigoid. *J. Immunol. Methods.* 346, 18-25 (2009).
14. Ghohestani, R.F. *et al.* IgE antibodies in sera from patients with bullous pemphigoid are autoantibodies preferentially directed against the 230-kDa epidermal antigen (BP230). *J. Clin. Immunol.* 18, 202-209 (1998).
15. Ishiura, N. *et al.* Serum levels of IgE anti-BP180 and anti- BP230 autoantibodies in patients with bullous pemphigoid. *J. Dermatol. Sci.*

49, 153-161 (2008).

16. Fairley, J.A., Baum, C.L., Brandt, D.S., Messingham, K.A.

Pathogenicity of IgE in autoimmunity : successful treatment of bullous pemphigoid with omalizumab. *J. Allergy Clin. Immunol.* 123, 704-705 (2009).

17. Provost, T.T., Tomasi, T.B. Jr. Immunopathology of bullous

pemphigoid. Basement membrane deposition of IgE, alternate pathway components and fibrin. *Clin. Exp. Dermatol.* 18, 193-200 (1974).

18. Parodi, A., Rebora, A. Serum IgE antibodies bind to the epidermal

side of the basement membrane zone splits in bullous pemphigoid. *Br. J. Dermatol.* 126, 526-527 (1992).

19. Yayli, S. *et al.* Detection of linear IgE deposits in bullous

pemphigoid and mucous membrane pemphigoid: a useful clue for diagnosis. *Br. J. Dermatol.* 165, 1133-1137 (2011).

20. Kobayashi, M. *et al.* BP180 ELISA using bacterial recombinant NC16a

protein as a diagnostic and monitoring tool for bullous pemphigoid. *J. Dermatol. Sci.* 30, 224-232 (2002).

21. Yoshida, M. *et al.* Enzyme-linked immunosorbent assay using bacterial recombinant proteins of human BP230 as a diagnostic tool for bullous pemphigoid. *J. Dermatol. Sci.* 41, 21-30 (2006).
22. Marazza, G. *et al.* Incidence of bullous pemphigoid and pemphigus in Switzerland: a 2-year prospective study. *Br. J. Dermatol.* 161, 861-868 (2009).
23. Murrell, D.F. *et al.* Definitions and outcome measures for bullous pemphigoid: recommendations by an international panel of experts. *J. Am. Acad. Dermatol.* 66, 479-485 (2012).
24. Natsuga, K. *et al.* Circulating IgA and IgE autoantibodies in antilaminin-332 mucous membrane pemphigoid. *Br. J. Dermatol.* 162, 513-517 (2010).
25. Ujiie, H., Nishie, W., Shimizu, H. Pathogenesis of bullous pemphigoid. *Dermatol. Clin.* 29, 439-446 (2011).
26. Messingham, K.N., Pietras, T.A., Fairley, J.A. Role of IgE in bullous pemphigoid: a review and rationale for IgE directed therapies. *G. Ital. Dermatol. Venereol.* 147, 251-257 (2012).

27. Ujiie, H. *et al.* A novel active mouse model for bullous pemphigoid targeting humanized pathogenic antigen. *J. Immunol.* 184, 2166-2174 (2010).