

保険収載されている自己免疫性水疱症の検査法： 抗デスモグレイン 1 抗体、抗デスモグレイン 3 抗体、 抗 BP180 抗体

anti-desmoglein 1, anti-desmoglein 3 and anti-BP180 antibodies : Examinations for autoimmune bullous diseases, covered by national health insurance.

こ が ひろ し いし い のり と はし もと たかし
古 賀 浩 嗣 : 石 井 文 人 : 橋 本 隆
Hiroshi KOGA Norito ISHII Takashi HASHIMOTO

はじめに

自己免疫性水疱症とは、表皮細胞膜および表皮基底膜部領域に存在する蛋白に対する自己抗体が患者体内で産生されることで、水疱をはじめとした種々の皮膚症状を呈する疾患群である。自己免疫性水疱症は大きく 2 群に分けることができる。一つは表皮細胞膜に存在する蛋白に対する自己抗体をもつ天疱瘡群であり、もう一つは表皮基底膜部領域に存在する蛋白に対する自己抗体をもつ類天疱瘡群である。両者ともに稀な皮膚疾患ではあるが、類天疱瘡群の代表的疾患である水疱性類天疱瘡は高齢者を中心に生じ、患者数も比較的多いことから皮膚科医以外が経験することも考えられる。また高齢化に伴い今後患者数も増加することが予想され、診断に必要な検査の需要も高まることが予想される。

自己免疫性水疱症の診断には、臨床症状に加え、病理組織学的検査が必要であることは言うまでもないが、それ以外に皮膚または血中に存在する自己抗体を検出する検査が重要である。具体的には皮膚に沈着した抗体を検出する蛍光抗体直接法や、血中の自己抗体を検出する蛍光抗体間接法および免疫ブロット法といった検査が存在し、これらの結果を総合的に判断して診断を行う。蛍光抗体直接法は外注で検査が可能であるが、病変近傍から採取した凍結皮膚切片が必要となる。また蛍光抗体間接法や免疫ブロット法はそれらの検査が可能な施設でのみ行うことができる。一方で、enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) 法による自己抗体検査は少量の血清で簡易に自己抗体を定量的に検出できることから、患者の負担も少なく非常に有用な検査である。

自己免疫性水疱症の自己抗体には様々なものが知られているが、その中の代表的な自己抗体を検出できる ELISA 法が保険収載されている。抗デスモグレイン 1 (Dsg1) 抗体、抗 Dsg3 抗体検査は 2003 年に保険収載され、抗 BP180 抗体検査は 2007 年に保険収載された。これらの検査は、自己免疫性水疱症の初期診断のみならず経過観察中にも非常に有用な検査法であり、主に診療に携わる皮膚科医、歯科医にとっては広く知られている検査ではあるが、本検査の簡便性、有用性を踏まえると他科の医師にも知っていただきたい検査と考える。また最近、新たな検出系である chemiluminescence enzyme immunoassay (CLEIA) 法が保険収載されたことから、より有益な検査となる事が予想される。本稿ではこれらの検査の対象となる天疱瘡群、類天疱瘡群について述べた後、本検査の有用性、また注意点について述べる。

I. 天疱瘡群、類天疱瘡群について

これらの疾患群は皮膚または粘膜に水疱を主とした病変を形成する疾患群であり、皮膚の細胞接着因子として働く蛋白に対する自己抗体が産生され、皮膚に沈着している事が特徴である^{1,2)}。1965 年に尋常性天疱瘡 (PV) 患者血清中に皮膚を標的とする自己抗体が存在することが発見されたことにより³⁾、その血中抗体が病変形成に強く関与していることが考えられた。PV の自己抗原として 160kDa、130kDa の 2 つの異なる分子量の蛋白が存在していることが分かっていたが、1984 年に前者が Dsg1、1991 年に後者が Dsg3 であることが発見された^{4,5)}。また水疱性類天疱瘡 (BP) にも BP180 (17 型コラーゲン)、BP230 の 2 つの自己抗原が存在することが知られてい

表1 天疱瘡群、類天疱瘡群

疾患名	主要免疫グロブリンサブクラス	自己抗原
天疱瘡群		
尋常性天疱瘡 (PV)		
粘膜優位型	IgG	Dsg3
粘膜皮膚型	IgG	Dsg1 + Dsg3
落葉状天疱瘡 (PF) (紅斑性天疱瘡含む)	IgG	Dsg1
増殖性天疱瘡	IgG	Dsg3, Dsg1, Dsc1-3
疱疹状天疱瘡	IgG	Dsg1 (Dsg3), Dsc1-3
薬剤誘発性天疱瘡	IgG	Dsg1
腫瘍随伴性天疱瘡	IgG	Dsg3, Dsg1, エンボプラキシン, ペリプラキシン, デスマプラキシン, BP230, A2ML1, Dsc1-3
抗 Dsc 天疱瘡	IgG, IgA	Dsc1-3
IgA 天疱瘡		
SPD 型	IgA	Dsc1
IEN 型	IgA	不明
類天疱瘡群		
水疱性類天疱瘡 (BP) (妊娠性疱疹含む)	IgG	BP180 NCI6a, BP230
粘膜類天疱瘡	IgG	BP180 C 末端, ラミニン 332, インテグリン $\beta 4$
ジューリング疱疹状皮膚炎	IgA	表皮トランスグルタミナーゼ (TGM3)
線状 IgA 水疱性皮膚症	IgA	LAD-1, VII 型コラーゲン, ラミニン $\gamma 1$
抗ラミニン $\gamma 1$ 類天疱瘡 (p200 類天疱瘡)	IgG	ラミニン $\gamma 1$

A2ML1: alpha-2-macroglobulin-like-1, Dsg: desmoglein, Dsc: desmocollin, SPD: subcorneal pustular dermatosis, IEN: intraepidermal neutrophilic IgA dermatosis

る。この内、抗 Dsg1 抗体、抗 Dsg3 抗体、抗 BP180 抗体は疾患モデルマウスの確立により、その病原性が証明されている^{6~8)}。抗 BP230 抗体でも同様の試みがなされているが⁹⁾、その病原性についてはまだ明らかではない。天疱瘡群、類天疱瘡群には上記の疾患以外にも多くの疾患が含まれるが、研究者によってその殆どの疾患で自己抗原が同定されている(表1)。

これらの疾患群の中で代表的な疾患として天疱瘡群では PV、落葉状天疱瘡 (PF) が、類天疱瘡群では BP が挙げられる。これらの疾患の特徴的な臨床像を図に示す(図1)。PV では皮膚と粘膜に弛緩性の水疱が生じ、粘膜病変は口腔内が主体であるが、眼球結膜、鼻粘膜も侵されることがある。粘膜病変のみを生じる粘膜優位型と、皮膚と粘膜に病変が生じる粘膜皮膚型がある。一方 PF では通常、皮膚のみに弛緩性の水疱が生じる。水疱は破れやすく、通常は水疱とびらんが混在するが、一般的に PF の方が PV より軽症である。BP では皮膚に緊満性の水疱が形成され、粘膜病変は同群の粘膜類天疱瘡によく見られる特徴ではあるが、BP においても生じることがある。BP でみられる水疱は天疱瘡で見られる水疱よりも破れにくい傾向はあるが、通常、BP

でも水疱とびらんが混在する。BP は高齢者での発症が多く、自己免疫性水疱症の中でも発症頻度は高いことから、介護老人保健施設などで皮膚科医以外が初診を担当する事も少なくないと思われる。

いずれの疾患においても、重症化するとびらん、潰瘍の面積が拡大し、それに伴い滲出液の漏出から生じる電解質異常、低アルブミン血症、さらに皮膚からの細菌感染による敗血症のリスクが高まる。そのため、早期に診断を確定させ、適切な治療を開始することが重要である。そして早期診断に有用であるのが、抗 Dsg1 抗体、抗 Dsg3 抗体、抗 BP180 抗体を測定できる ELISA 法である。

II. ELISA 法による自己抗体検出法について

代表的な ELISA キットとしては、MBL 社より発売されている、MESACUP™ デスマogleインテスト「Dsg1」、MESACUP™ デスマogleインテスト「Dsg3」、MESACUP™ BP180 テストがある。落葉状天疱瘡を疑った場合は抗 Dsg1 抗体を、尋常性天疱瘡を疑った場合は抗 Dsg1 抗体と抗 Dsg3 抗体を保険診療で測定することが可能であるが、経過観察中に両者を同時に測定した場合には一方のみしか算定されな

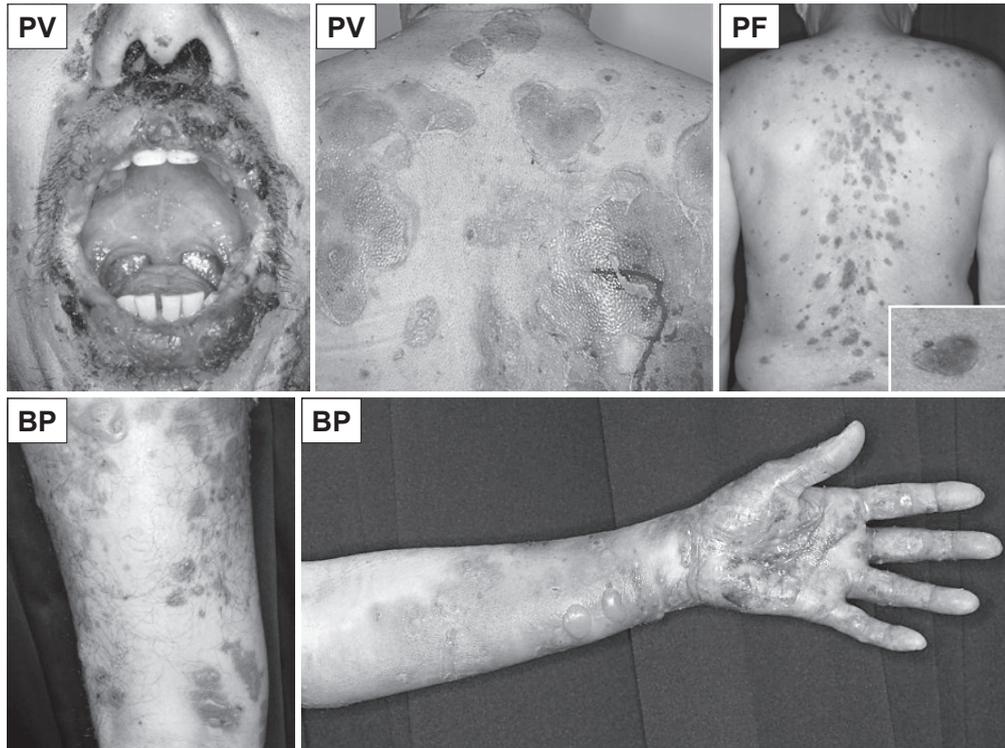


図1 尋常性天疱瘡 (PV)、落葉状天疱瘡 (PF)、水疱性類天疱瘡 (BP) の臨床像

PV：口腔粘膜および背部のびらん、潰瘍。PF：背部のびらん。
BP：四肢に分布する紅斑と緊満性水疱および、びらん

い。一方、水疱性類天疱瘡を疑った場合は抗 BP180 抗体が測定できる。BP の自己抗体である抗 BP230 抗体を検出する BP230 ELISA Kit も MBL 社より販売されているが、現在のところ保険診療では測定することはできない。

Ⅲ. ELISA 法の実際

上記キットに使用されている組み換え蛋白は Dsg1、Dsg3 ではそれぞれの細胞外ドメインを昆虫細胞で発現させたものを使用している。BP180 に関しては、細胞膜に近い細胞外に位置する NC16a (non-collagenous 16a domain) を大腸菌で発現させた蛋白を使用している。BP180 NC16a ドメインは BP 患者血中抗体の主要エピトープであり、そのためこの部位の組み換え蛋白を使用している。BP180 NC16a ドメイン以外にも、粘膜類天疱瘡で見られる BP180 の C 末端に対する自己抗体や、線状 IgA 水疱性皮膚症でも、BP180 の切断産物である LAD-1 に対する自己抗体が知られているが、これらの抗体は上記検査では検出することが出来ないため注意が

必要である。

抗 Dsg1、Dsg3 抗体および抗 BP180 抗体 ELISA 法の実際を図に示す (図2)。各種組み換え蛋白が固相化されたプレートに測定したい患者血清の希釈液、各種抗体を含有する陽性コントロール血清、陰性コントロールとなる標準血清を添加する (一次反応)。反応後にプレートを洗浄し、次にペルオキシダーゼ酵素を標識した抗ヒト IgG モノクローナル抗体を添加する (二次反応)。洗浄後に酵素基質液を添加し (酵素反応)、発色させる。最後に反応停止液を添加して酵素反応を停止した後に、450nm の波長で吸光度を測定する。得られた吸光度は患者血清中の各種組み換え蛋白に対する IgG 抗体の量を反映しており、式によって Index 値が算出される。具体的には各種陽性コントロール血清に含まれる IgG 抗体の値と同等であった時、その Index 値が 100 となる。吸光度と抗体量の相関には直線性が得られる範囲が限定されるため、その吸光度の値が高すぎる場合には、そこから得られる Index 値は正確に抗体量を反映できなくなってしまう。上記 ELISA 法であれば Index 値 150 付近では正確な抗体量を反

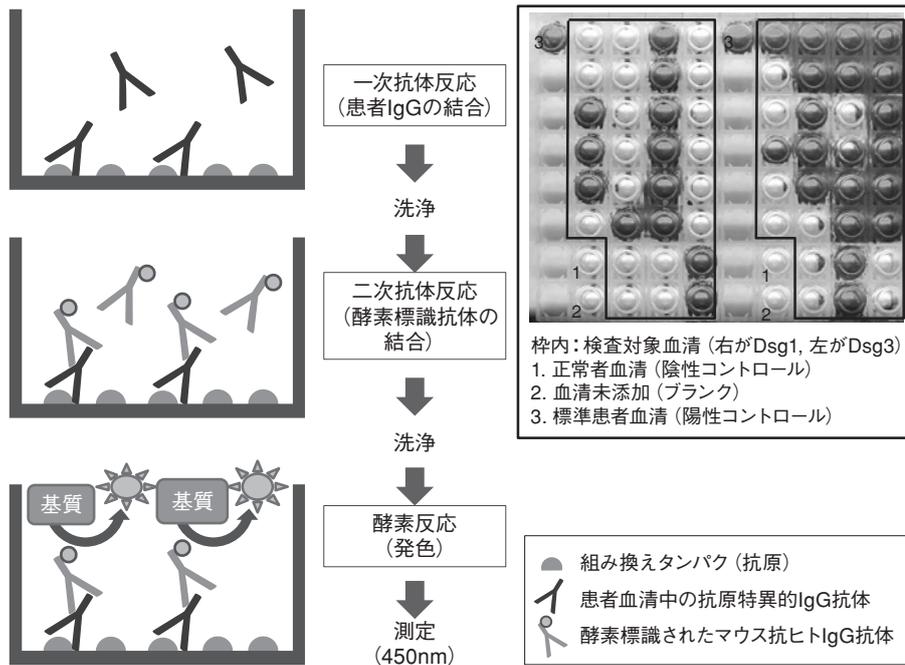


図2 ELISA法の実際

反応の手順 (左図)、および反応停止液添加後のプレート (右図)。
抗体含有量によって発色の程度が異なる。

映できなくなる。しかし、病勢の強い患者では Index 値が 150 を上回ることがしばしば経験することである。この問題は血清の希釈を上げることにより解決できるため¹⁰⁾、抗体価の高い時期の血清で検査を行う場合にはその点を考慮する必要がある。

IV. ELISA 検査の臨床的意義

少量の患者血清から外注で検査を行うことができ、診断の初期検査として有用である。また後述するように病勢の指標ともなり得るため、経過観察中にも有用な検査である。

ELISA 法で測定できる Index 値は患者血清中の特異抗体の量を反映するため、一般的に病勢と関連し、また治療によってその値は低下するため、治療の効果判定としての指標ともなり得る^{11~13)}。経過観察中にも抗体価の再上昇は再燃を予測する因子となり得ると考えられ^{14,15)}、治療が奏功した後にも定期的に測定することが望ましい。但し、前述のように PV 患者であっても初回検査を除き、抗 Dsg1 抗体検査と抗 Dsg3 抗体検査は同時に保険算定する事ができない。ELISA 法の結果の解釈については、抗 Dsg1 抗体が陽性で、抗 Dsg3 抗体が陰性の場合、

落葉状天疱瘡を疑う。また抗 Dsg3 抗体単独陽性もしくは抗 Dsg1 抗体、抗 Dsg3 抗体の両者が陽性の場合、尋常性天疱瘡を疑う。抗 BP180 抗体が陽性の場合には水疱性類天疱瘡を疑う。しかし表 1 に示したようにこれらの検査は他の自己免疫性水疱症でも陽性となる可能性があり、確定診断のためには追加検査が必要になる。また後述の通り、陰性であっても上記疾患を完全に否定することはできない。

V. ELISA 法検査の注意点

今まで述べたように、これらの ELISA 法検査は天疱瘡、類天疱瘡における診断、病勢の評価に非常に有用な検査である。しかし、その結果の解釈には幾つか注意点もある。まず検査の感度の問題がある。PV 患者における抗 Dsg3 抗体 ELISA 法の感度は 96% であり、PF における抗 Dsg1 抗体 ELISA 法の感度は 94% とかなり感度は高い¹⁶⁾。一方で BP 患者における抗 BP180 抗体 ELISA 法の感度は 84.4% とやや低い¹²⁾。つまり BP 患者であっても抗 BP180 抗体 ELISA 法が陰性になる可能性があり、陰性であったからといって BP の可能性を否定することはできない。感度を高める方法として、保険診療では測定

できないが抗 BP230 抗体 ELISA 法と組み合わせることでその感度は 97.1% に上昇するとの報告がある¹⁷⁾。

次に、少数の症例では ELISA 法検査の値が病勢を反映しない事がある¹⁸⁾。理由は幾つか考えられるが、抗 Dsg1、Dsg3 抗体 ELISA 法で検出される抗体には病原性の抗体と非病原性の抗体が存在することがその理由の一つとして考えられる。Dsg は蛋白の成熟の過程に起こるスプライシングによって N 末端にある配列が切断され、成熟した蛋白となる。抗 Dsg 抗体 ELISA 法に使用される組み換え Dsg1、Dsg3 蛋白には前駆体が含まれているため、この前駆体に存在する配列に対する抗体も検出されてしまう。実際に患者血清中に Dsg1 前駆体に対する抗体が存在することが示されており、成熟 Dsg 蛋白で行う ELISA 法の結果は、Dsg 前駆体蛋白で行う ELISA 法の結果よりも鋭敏に病勢と相関するとの報告がある¹⁹⁾。しかし現在の抗 Dsg1、Dsg3 抗体 ELISA 法では両者に対する抗体が検出されてしまう。この問題を改善させるべく、2013 年 7 月より MESACUP™-2 デスマグレインテスト「Dsg1」、MESACUP™-2 デスマグレインテスト「Dsg3」が発売になっている。このキットでは Dsg 組み換え蛋白の発現を CHO 細胞（哺乳類細胞）で行っており、翻訳後修飾の効率が高い事から成熟 Dsg 蛋白のみが使用されている。同様の組み換え蛋白が後述するステイシア MEBLux™ テスト Dsg1、ステイシア MEBLux™ テスト Dsg3 にも使用されるため、CLEIA 法ではこの問題は改善されるであろう。また Dsg は N 末端でカルシウム依存性の立体構造を形成することが知られており、研究結果からはその立体構造に対する抗体が病原性を持っており、一方、細胞外ドメインの C 末端側にある非立体構造部分に対する抗体は病原性を持っていないと考えられている^{20,21)}。しかし現在の抗 Dsg1、Dsg3 抗体 ELISA 法では両者を区別することなく検出してしまう。このように、ELISA 法で得られる結果は時として病勢を正確に反映しないことがあることを知っておかなければならない。近年、キレート剤である EDTA で前処理をすることによって立体構造を変化させ、それらに対する抗体が反応できない状態にすることによって線状エпитープに対する抗体、つまり非病原性の抗体のみを検出する ELISA 法が考案された²²⁾。この ELISA 法

で得られた Index 値を、通常の ELISA 法で得られた値から差し引くことによって、病原性のある抗体の Index 値を間接的に測定する事ができる。病原性のある抗体の量を評価できるため、より有用な検査であるといえるが、この方法は今のところ外注検査では行うことはできず、ELISA 法を施行できる施設であれば可能である。

VI. 新規保険収載された検査法： chemiluminescence enzyme immunoassay (CLEIA) 法

今まで抗 Dsg1、Dsg3 抗体および抗 BP180 抗体 ELISA 法について述べてきたが、新たな検出法である CLEIA 法が 2013 年 7 月に保険収載されたことにより、今後は CLEIA 法による検出に移行していく事が予想される。MBL 社より CLEIA 法のキットであるステイシア MEBLux™ テスト Dsg1、ステイシア MEBLux™ テスト Dsg3、およびステイシア MEBLux™ テスト BP180 が 12 月より販売されている。これらのキットには専用の全自動機器が必要になるが、より短時間で測定することが可能となり、さらに ELISA 法より広い測定範囲を有していることから、高い抗体価の検体でもさらなる血清希釈を行わずに測定することが可能となる。また前述の通り、従来の抗 Dsg 抗体 ELISA 法で含まれていた Dsg 前駆体蛋白が含まれなくなることも変更点の一つである。SRL 社では 2013 年 12 月より CLEIA 法へ移行している。

おわりに

今まで述べたように、抗 Dsg1、Dsg3 抗体および抗 BP180 抗体 ELISA 法は自己免疫性水疱症の初期診断、治療効果判定、経過観察のいずれの時期においても有用で、かつ簡便な検査といえる。しかし簡便が故に、検査の仕組みとその結果の解釈の仕方を理解せずに、得られたその数値だけに気を取られてしまいがちである。すると検査の性質から生じる問題点を見逃し、誤った解釈に陥る可能性もある。大切な事は検査値のみで判断することなく、常に患者の症状に目を配り、病理学的所見など他の所見も踏まえて総合的に判断していく事である。そうするこ

とで結果について誤った解釈を防ぐことができ、よりの確な診療を行うことができるはずである。新たに CLEIA 法が導入され、これらの検査法がより多くの自己免疫性水疱症の診療の場で活用されていくことが期待される。

文 献

- 1) Bystryń JC, Rudolph JL. Pemphigus. *Lancet*. **366**(9479): 61-73, 2005.
- 2) Schmidt E, Zillikens D. Pemphigoid diseases. *Lancet*. **381**(9863): 320-332, 2013.
- 3) Beutner EH, Lever WF, Witebsky E, Jordon R, Chertock B. Autoantibodies in pemphigus vulgaris : response to an intercellular substance of epidermis. *JAMA*. **192** : 682-688, 1965.
- 4) Koulu L, Kusumi A, Steinberg MS, Klaus-Kovtun V, Stanley JR. Human autoantibodies against a desmosomal core protein in pemphigus foliaceus. *The Journal of experimental medicine*. **160**(5): 1509-1518, 1984.
- 5) Amagai M, Klaus-Kovtun V, Stanley JR. Autoantibodies against a novel epithelial cadherin in pemphigus vulgaris, a disease of cell adhesion. *Cell*. **67**(5): 869-877, 1991.
- 6) Roscoe JT, Diaz L, Sampaio SA, et al. Brazilian pemphigus foliaceus autoantibodies are pathogenic to BALB/c mice by passive transfer. *J Invest Dermatol*. **85**(6): 538-541, 1985.
- 7) Amagai M, Tsunoda K, Suzuki H, Nishifuji K, Koyasu S, Nishikawa T. Use of autoantigen-knockout mice in developing an active autoimmune disease model for pemphigus. *J Clin Invest*. **105**(5): 625-631, 2000.
- 8) Liu Z, Diaz LA, Troy JL, 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**(5): 2480-2488, 1993.
- 9) Kiss M, Husz S, Janossy T, et al. Experimental bullous pemphigoid generated in mice with an antigenic epitope of the human hemidesmosomal protein BP230. *Journal of autoimmunity*. **24**(1): 1-10, 2005.
- 10) Cheng SW, Kobayashi M, Kinoshita-Kuroda K, Tanikawa A, Amagai M, Nishikawa T. Monitoring disease activity in pemphigus with enzyme-linked immunosorbent assay using recombinant desmogleins 1 and 3. *Br J Dermatol*. **147**(2): 261-265, 2002.
- 11) Daneshpazhooh M, Chams-Davatchi C, Khamesipour A, et al. Desmoglein 1 and 3 enzyme-linked immunosorbent assay in Iranian patients with pemphigus vulgaris : correlation with phenotype, severity, and disease activity. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology : JEADV*. **21**(10): 1319-1324, 2007.
- 12) Kobayashi M, Amagai M, Kuroda-Kinoshita K, et al. BP180 ELISA using bacterial recombinant NC16a protein as a diagnostic and monitoring tool for bullous pemphigoid. *J Dermatol Sci*. **30**(3): 224-232, 2002.
- 13) Schmidt E, Dahnrich C, Rosemann A, et al. Novel ELISA systems for antibodies to desmoglein 1 and 3 : correlation of disease activity with serum autoantibody levels in individual pemphigus patients. *Exp Dermatol*. **19**(5): 458-463, 2010.
- 14) Feng S, Wu Q, Jin P, et al. Serum levels of autoantibodies to BP180 correlate with disease activity in patients with bullous pemphigoid. *International journal of dermatology*. **47**(3): 225-228, 2008.
- 15) Bracke S, Speeckaert R, Van Geel N, De Bacquer D, Lambert J. Evaluation of commercially available ELISA assays as a tool for monitoring and managing pemphigus patients : a prospective study. *European journal of dermatology : EJD*. **23**(1): 33-39, 2013.
- 16) Ishii K, Amagai M, Hall RP, et al. Characterization of autoantibodies in pemphigus using antigen-specific enzyme-linked immunosorbent assays with baculovirus-expressed recombinant desmogleins. *Journal of immunology(Baltimore, Md : 1950)*. **159**(4): 2010-2017, 1997.
- 17) Yoshida M, Hamada T, Amagai 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**(1): 21-30, 2006.
- 18) Belloni-Fortina A, Faggion D, Pigozzi B, et al. Detection of autoantibodies against recombinant desmoglein 1 and 3 molecules in patients with pemphigus vulgaris : correlation with disease extent at the time of diagnosis and during follow-up. *Clinical & developmental immunology*. **2009** : 187864, 2009.
- 19) Yokouchi M, Saleh MA, Kuroda K, et al. Pathogenic epitopes of autoantibodies in pemphigus reside in the amino-terminal adhesive region of desmogleins which are unmasked by proteolytic processing of prosequence. *J Invest Dermatol*. **129**(9): 2156-2166, 2009.
- 20) Tsunoda K, Ota T, Aoki M, et al. Induction of pemphigus phenotype by a mouse monoclonal antibody against the amino-terminal adhesive interface of desmoglein 3. *Journal of immunology(Baltimore, Md : 1950)*. **170**(4): 2170-2178, 2003.
- 21) Amagai M, Karpati S, Prussick R, Klaus-Kovtun V, Stanley JR. Autoantibodies against the amino-terminal cadherin-like binding domain of pemphigus vulgaris antigen are pathogenic. *J Clin Invest*. **90**(3): 919-926, 1992.
- 22) Kamiya K, Aoyama Y, Shirafuji Y, et al. Detection of antibodies against the non-calcium-dependent epitopes of desmoglein 3 in pemphigus vulgaris and their pathogenic significance. *Br J Dermatol* 2012.