

口腔内に発症した尋常性天疱瘡における棘融解発生の研究

日本大学大学院松戸歯学研究科歯学専攻

口腔外科学

芹澤 多恵

(指導： 小宮 正道 教授)

目次

参考論文

Abstract

第1章

諸言
対象および方法
結果
考察

第2章

諸言
対象および方法
結果
考察
結論

総括

参考文献

参考論文

本論文は、主となる参考論文「Ultrastructural Observation of Acantholysis in Pemphigus Vulgaris Developing in the Oral Cavity」 International Journal of Oral-Medical Sciences 発行予定および副となる参考論文「Acantholysis may precede elevation of circulating antidesmoglein 3 antibody levels in pemphigus vulgaris presenting with desquamative gingivitis」 Clinical and Experimental Dental Research: Vol. 5 (3), 2019. をまとめたものである。

Abstract

Pemphigus vulgaris (PV) is an autoimmune, blistering disease that affects the mucosa and skin. Acantholysis is a loss of cell adhesion in the deep epithelium, right above the basal layer. The current theory favors the concept that the involvement of anti-desmoglein 3 (Dsg 3) antibody is essential is widely accepted because the mechanism of acantholysis in PV is caused by autoantibodies against Dsg 3 impairing normal function of desmosomes. However, there are some hypothesis caused by cell shrinkage. In addition, a few cases of active PV in the oral cavity had no detectable anti-Dsg 3 antibody.

The aim of the first chapter of this study was to evaluate the differences in clinical and laboratory findings, whether or not the anti-Dsg 3 antibodies were detected. This study was based on a retrospective review of 10 PV cases. The evaluation of the circulating autoantibody titers to Dsg 3 was conducted by using ELISA. An index value of 20 U/ml or more was used as the cutoff for a positive reaction. Only five of the 10 PV cases had a positive anti-Dsg 3 antibody. There were no differences in clinical, cytological, histopathological, and direct immunofluorescence findings, whether or not the anti-Dsg 3 antibodies were present. Of the five patients with a negative reaction at the time of diagnosis, the anti-Dsg 3 antibody became positive in the follow-up period in three cases. In the remaining two cases, the anti-Dsg 3 antibody was consistently negative for 18

months. Therefore, PV acantholysis may precede the elevation of circulating anti-Dsg 3 antibody levels. The diagnosis of PV should be considered based on comprehensive clinical, histopathological, and immunofluorescent criteria.

In chapter 2 study, ultrastructural retrieval was performed by quantitative image analysis and quantitative imaging findings of PV in five cases using a transmission electron microscope, and the occurrence of acantholysis was searched. Ultrastructural images revealed tonofilament aggregation around the nucleus, suggesting that cytoskeletal changes may be involved in the occurrence of acantholysis. We observed significant expansion of the intercellular space (ICS), demonstrating that acantholysis occurred in PV. Furthermore, disappearance of desmosomes was observed in the expanded ICS, and desmosomes were clearly affected by acantholysis. However, there was no significant difference in the major axis of control and PV desmosomes, suggesting that intact desmosomes were also present. These results suggest that Dsg adhesion function inhibition is not directly caused by desmosome separation and disappearance, but that cytoskeletal degeneration, including tonofilament aggregation, may be involved, and that desmosome separation and disappearance are a final phenomenon.

第 1 章 剥離性歯肉炎を呈する尋常性天疱瘡の棘融解は抗 Dsg3 抗体価の上昇に先行する可能性がある

諸言

尋常性天疱瘡（以下、PV）は粘膜および皮膚に影響を及ぼす自己免疫性水疱症である。PV はまれな疾患であるが、未治療のまま放置すると生命を脅かす状態になるため、早期に診断し治療することが重要である。口腔のびらんや Nikolsky 現象などの病変は PV の最も一般的な初期症状であり、最終的に未治療の PV 患者で発症する¹⁻³⁾。初期病変が歯肉に限局する場合もあり、剥離性歯肉炎が疾患の一般的な症状である¹⁻³⁾。歯肉でみられる Nikolsky 現象は PV と診断された症例の 90%以上で陽性反応を認めた⁴⁾。この症状は、正常とみられる歯肉への機械的な刺激によって上皮剥離を生じる。病理組織学的には、棘融解による上皮内水疱形成を特徴とし、水疱内には細胞間接着を失い丸みを帯びた Tzanck 細胞がヘマトキシリン・エオジン染色切片にて認められる。Tzanck 細胞の有無は PV の推定診断に有用である。

PV 患者の口腔粘膜, 皮膚, および循環血液中にはケラチノサイト表面上の様々な抗原に対する自己抗体を有する可能性がある。これらの抗体は、蛍光抗体直接法（以下、DIF）検査あるいは蛍光抗体間接法で検出される^{1-2,5-7)}。現在、PV 自

己抗体は病因であり，それらが上皮の棘融解を引き起こすという理論を支持する根拠が存在する⁸⁾。PV 自己抗体とされるデスモグレイン（以下，Dsg）は，デスモゾームの接着成分となる膜貫通糖タンパク質である。カドヘリン様配列を認めるカドヘリンスーパーファミリーの一員であり，隣接細胞に付着するために Dsg の N 末端を細胞外コアへ，C 末端を細胞質内へ伸長しケラチノサイトの細胞間接着を担う。Dsg には 4 つのアイソフォーム（Dsg 1～4）が存在し，表皮および粘膜の表層には Dsg 1 が，下層には Dsg 3 が高頻度に発現すると言われている。Dsg は PV 患者の主要な自己抗原であると考えられているが，病因論は依然として議論の対象である⁹⁻¹⁷⁾。そのため，現在では PV の血清学的診断として ELISA 法による抗 Dsg 3 抗体および抗 Dsg 1 抗体の定量が実施されている。口腔粘膜に限局した PV 患者のほとんどは，血清中に抗 Dsg 3 抗体のみを有するのに対し，口腔粘膜および皮膚病変を伴う病態が進行した患者は，抗 Dsg 3 抗体および抗 Dsg 1 抗体の両方を有する場合がある^{1-2, 11)}。落葉状天疱瘡（以下，PF）は，主に表皮に影響を及ぼすやや軽度の天疱瘡であり，血清は抗 Dsg1 抗体のみを有すると言われている^{7, 11)}。ELISA 法は PV の補助診断のための有用な方法であるが，血清抗体価は必ずしも疾患の活動性に関連するとは限らない。少数の PV 患者が口腔内に活動性疾患があるにも関わらず，検出可能な抗 Dsg 3 抗体を持たない可能性があることが過去の文献で散見された^{5, 7, 18-23)}。現在の天疱瘡の病因

論は、抗 Dsg3 抗体が PV の棘融解を引き起こすのに必須であるという考えが支持されている^{9, 17)}。しかし、抗 Dsg 3 抗体陰性の PV が抗 Dsg 3 抗体陽性の PV と同様または相違のある臨床所見や検査所見であるのかは明らかになっていない。本研究の目的は、抗 Dsg 3 抗体の検出の有無により、臨床的、病理組織学的および免疫学的検査所見の相違を評価することである。

対象と方法

本研究は 2002 年～2015 年の間に日本大学松戸歯学部付属病院にて PV と診断された 10 人（男性 1 人，女性 9 人，年齢分布 24～73 歳（平均年齢 46.3 歳））の診療録を対象に後ろ向き研究したものである（表 1）。これらの患者の診療録から病変部位，Nikolsky 現象の有無，擦過細胞診，生検，DIF 検査所見および Dsg 自己抗体価の情報を抽出した。また，各症例における重症度分類は pemphigus disease area index（以下，PDAI）を用いて，病変部の数と大きさについて合計 90 の口腔粘膜部位（頬粘膜，硬口蓋，軟口蓋，上歯肉，下歯肉，舌，口腔底，口唇，後咽頭）をスコアで評価した^{24,25,26}。Nikolsky 現象は，病変の辺縁を歯科用探針で擦過することにより周囲の正常とみられる組織のびらんが拡大すること，あるいは病変から離れている明らかに影響を受けていない歯肉を擦過し，びらんが誘発されることで判断した⁴。擦過細胞診では，病変部を擦過し細胞を塗抹した標本を 95%エタノールにて直ちに浸漬固定した。塗抹標本は Papanicolaou 染色をし，Tzanck 細胞の有無について評価した。また，病変部の歯肉周囲組織を含めた生検を施行し，ヘマトキシリン・エオジン染色（以下，HE）および DIF 検査にて細胞間に沈着した IgG の評価を行った。抗 Dsg 3 抗体および抗 Dsg 1 抗体価は ELISA 法を用いて評価した。Amagai et al.¹¹）によって推奨されたように，抗 Dsg3 抗体および抗 Dsg1 抗体は基準値を 20.0 U/ml 未満とした。ELISA の Dsg

定量は、診断時および診断時に Dsg 3 が陰性であった 5 症例を対象に経過観察中に行った。

なお、本研究は日本大学松戸歯学部倫理審査委員会の承認（承認番号：EC14-011-1）を得て行った。

また、全症例を皮膚科へ対診したところ、2 例（症例 2,3）の皮膚病変が確認された。さらに、初診時から 3 か月後（症例 7）および 10 か月後（症例 1）の経過観察中に、2 例の新たな皮膚病変の発症を認めたが 1 例（症例 8）は皮膚症状を認めなかった。皮膚科へ対診したうちの 3 例（症例 1,2,3）は皮膚科医によりステロイドの全身治療が行われた。しかし、皮膚科医により経過観察が行われていた 2 例（症例 7,8）はステロイドの全身投与は行われなかった。また、本院では 5 例（症例 4,5,6,9,10）が、局所的なステロイド塗布およびプラークコントロールにより管理された。

結果

10例の臨床および検査結果を表1および表2に示す。すべての患者は、疼痛を伴う易出血性の紅斑性歯肉病変を訴えた。さらに、3人の患者（症例2, 4, 6）は歯肉以外の病変（頬粘膜、舌または口底部）を有していた。口腔粘膜のPDAIは2～18点の範囲、平均値は5.8点であったため、PVの重症度は軽度から中等度であった。全症例においてNikolsky現象陽性、病理組織学的に棘融解による上皮内水疱形成、DIF検査にてIgGの沈着は「フィッシュネット様」のパターンを呈した（表1、図1および図2）。擦過細胞診におけるTzanck細胞の存在は、細胞診が行われた9例すべてにおいて確認された。対照的に、診断時の抗Dsg3抗体価の定量では、10例のうち5例（症例1～5）のみが28～426 U/mlの陽性反応を示した（表2）。残りの5例（症例6～10）では、抗Dsg3抗体価の結果は非常に低く、5～19 U/mlの範囲で陰性であった（表2）。また、抗Dsg1抗体価の定量はPV10例中8例で実施し、診断時は2例（症例3, 7）が陽性であった（表2）。

診断時に陰性反応を呈した5例の抗Dsg3抗体価を経過観察中に継続し定量した（表3）。そのうち3例（症例6, 7, 8）は経過観察中に抗体価は増加し陽性となり、残り2例（症例9, 10）は診断後の18か月間は一貫して陰性であった。

考察

本研究では、軽度から中等度の口腔内の PV 患者では、抗 Dsg 3 抗体の有無に関わらず、臨床的、病理組織学および DIF 所見に相違がみられないことを確認した。その結果、臨床的、病理組織学および DIF 所見は全て PV 診断基準を満たしていたが、診断時には 10 例のうち 5 例のみが Dsg 3 に対して陽性反応を示したことから、抗 Dsg 3 抗体は必ずしも PV 病変発症に関連するとは限らない（表 1, 2）^{5, 7, 18-23}。少数の PV 患者は口腔内でびらん症状がみられたが、検出可能な抗 Dsg 3 抗体を有していなかった^{5, 7, 18-23}。過去の研究では、抗 Dsg 3 抗体が陰性である PV 所見に関する詳細な報告は渉猟し得た限りではなかったため、抗体価の数値と重症度の関連は不明である。本研究では、軽度から中等度の口腔内にみられる PV 患者における抗 Dsg 3 抗体の有無に関わらず、臨床的、細胞学的、病理組織学的または DIF 所見に差異がないことが明らかになった。

PV の病因は Dsg 3 に対する自己抗体がデスモゾームの正常な機能を障害することにより棘融解を引き起こすため、抗 Dsg 3 抗体の存在は必須であるという理論が一般的に広く受け入れられている^{10, 17}。しかしながら本研究で示されたように、口腔粘膜の Nikolsky 現象、擦過細胞診における Tzanck 細胞の存在、HE における棘融解による上皮内水疱形成および DIF における IgG の細胞間沈着は、抗 Dsg 3 抗体が陽性および陰性症例すべてにおいて確認された（表 1, 2）。さら

に、経過観察中に抗 Dsg 3 抗体が増加し、その後診断時に陰性の抗 Dsg 3 抗体が認められた 3 例（症例 6, 7, 8）は陽性となった（表 3）。これらの結果は、Dsg 3 に対する自己抗体が口腔粘膜における棘融解の原因であるという既存の理論と矛盾し、棘融解は、Dsg 3 自己抗体の検出の前にすでに発症していた可能性が考えられる。抗 Dsg 3 抗体は棘融解の「原因 (Cause)」ではなく「疾患の証人 (witnesses of disease)」であるとする研究者もいる¹⁰⁾。PV の病因論を考えると、本研究で示されたデータは、この仮説を排除するものではない。

PV 症例において抗 Dsg3 抗体の抗体量が非常に少ない場合、ほとんどの抗体は上皮内に結合し循環血液中の抗 Dsg3 抗体はほとんど検出されない可能性も考えられる。しかし、ELISA の感度は非常に高く偽陰性はまれであることが報告されていることから、ELISA で検出できないレベルの抗 Dsg 3 抗体を有する可能性は低い¹¹⁾。現在、Dsg 3 は棘融解の病因となる多くの自己抗体のうちの 1 つに過ぎないと言われている^{9, 10, 13-16)}。従って Dsg3 が ELISA によって検出されなかった PV 患者は、他の標的抗原を有する可能性が考えられる。PV の一部の症例で Dsg 以外の抗体が棘融解の原因とされる場合、ケラチノサイト表面上の様々な抗原に対する自己抗体が DIF 検査によって検出されるが、ELISA 検査は陰性であった⁹⁾。これらの結果から、抗 Dsg 3 抗体が長期経過観察中に検出されなかった 2 例（症例 9, 10）に当てはまる可能性が推察される（表 3）。

棘融解は抗 Dsg3 抗体が Dsg 3 へ結合しデスモゾーム機能の直接阻害を引き起こすため、抗 Dsg3 抗体がデスモゾームの分離の主要な原因であると最初に考えられてきた^{9,27)}。しかし PV 病変の電子顕微鏡学的研究では、デスモゾーム周囲の細胞間隙が拡大し、最終的にデスモゾームの接着機能が喪失すると示唆されている²⁸⁾。デスモゾームに存在する Dsg の細胞接着分子の阻害は、棘融解の原因あるいは初期症状として生じるのではなく、最終的に細胞分離が生じた結果であると考えられる²⁸⁾。現在は、病原性のある Dsg 以外の自己抗体がケラチノサイト表面上の受容体に作用することによりシグナル伝達を開始し、より複雑な過程を介して棘融解をもたらすという仮説も考えられている^{9,29)}。この理論は PV に関連する 1 つ以上のケラチノサイトの変化（細胞収縮、細胞間剥離、および／またはアポトーシス促進シグナルなど）を誘導する Dsg 以外の抗体によって棘融解が生じると報告されている^{9,29)}。これらは本研究に示された棘融解後に抗 Dsg 3 抗体価の上昇が発生した理由となる可能性がある（表 3）。

Koga et al.²²⁾ は口腔病変があるが血清中に抗 Dsg 3 抗体が検出されない 5 人の日本人 PV 患者について報告した。すべての患者は抗 Dsg 1 抗体に陽性反応を示し、他の臨床的、病理組織学および DIF 所見は、PF ではなく PV と一致していた。Koga et al.²²⁾ の研究は、抗 Dsg 1 抗体の抗原性の多様性は、口腔粘膜における棘融解の原因の 1 つであり得ることを示唆している。今回の研究では、

抗 Dsg 1 抗体で陽性反応を示した患者は 2 人のみだった (表 2)。口腔病変を有するが抗 Dsg 3 抗体が陰性の患者 (症例 7) は、抗 Dsg 1 抗体が陽性であった。しかし、HE では PV 患者の病理組織学的特徴である基底細胞層の直上で棘融解が確認されたため、患者は PF を有していないと考えられる。

本研究では、剥離性歯肉炎を呈した一部の PV 患者において診断時に抗 Dsg 3 抗体価が陰性の患者が存在した。また、診断時は陰性だったが、経過観察中に抗 Dsg 3 抗体価の上昇がみられた患者も存在した。従って、PV の棘融解は循環血液中の抗 Dsg 3 抗体価の上昇に先行して発症する可能性がある。さらに、18 か月間の経過観察中、陰性のままであった患者が存在したことから、PV の場合、Dsg 以外の抗体が棘融解の原因となる可能性が示唆された。

ELISA は、天疱瘡の診断のための高感度で用い易い検査である。しかし、PV と診断された症例に抗 Dsg 3 抗体価が上昇しなかった症例もみられたことから、抗 Dsg 3 抗体のみでは PV の診断根拠とはならないことが示唆された。

表 1 尋常性天疱瘡の 10 症例の臨床および検査所見

症例	年齢	性別	Nikolsky現象	Tzanck細胞	棘融解	IgG	PDAI
1	73	男性	+	+	+	+	4
2	46	女性	+	+	+	+	18
3	29	女性	+	+	+	+	10
4	46	女性	+	+	+	+	4
5	55	女性	+	+	+	+	3
6	53	女性	+	+	+	+	2
7	24	女性	+	NP	+	+	7
8	45	女性	+	+	+	+	4
9	37	女性	+	+	+	+	2
10	55	女性	+	+	+	+	4

NP：実施されていない。

PDAI：天疱瘡重症度判定基準

表 2 尋常性天疱瘡 10 症例の診断時の抗 Dsg 3 抗体および抗 Dsg 1 抗体価

症例	抗Dsg 3抗体*	抗Dsg 1抗体*
1	426 (+)	7 (-)
2	320 (+)	5 (-)
3	125 (+)	43 (+)
4	56 (+)	5 (-)
5	28 (+)	NP
6	19 (-)	5 (-)
7	12 (-)	21 (+)
8	5 (-)	5 (-)
9	5 (-)	NP
10	5 (-)	6 (-)

* 基準値：抗 Dsg 1 抗体および抗 Dsg 3 抗体 < 20.0 U/ ml

NP：実施されていない。

表 3 診断時に陰性であった 5 症例の経過観察中の抗 Dsg 3 抗体価

症例	診断時の 抗Dsg 3抗体価	経過観察期間 (月)				
		3	6	9	12	18
6	19 (-)	NP	52 (+)	NP	101 (+)	128 (+)
7	12 (-)	24 (+)	NP	7 (-)	NP	40 (+)
8	5 (-)	5 (-)	NP	36 (+)	110 (+)	129 (+)
9	5 (-)	5 (-)	NP	5 (-)	NP	5 (-)
10	5 (-)	5 (-)	5 (-)	NP	NP	5 (-)

NP：実施されていない。

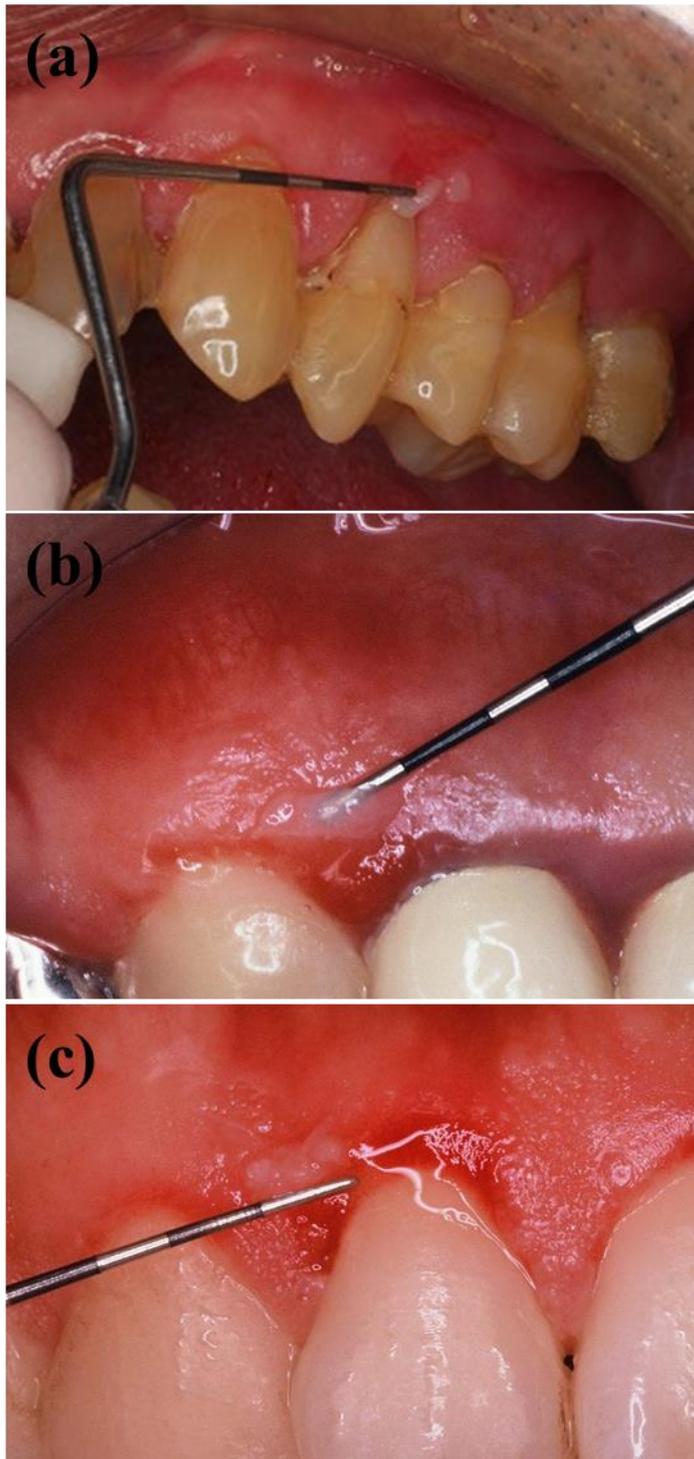


図1 尋常性天疱瘡における付着歯肉の Nikolsky 現象陽性を呈する剥離性病変

(a) 抗 Dsg 3 抗体価が高値の症例 1 (表 2 参照)。

(b) 抗 Dsg 3 抗体価が陰性の症例 8 (表 2 参照)。抗 Dsg 3 抗体価は経過観察

中に増加し、診断後 9 か月で陽性となる (表 3 参照)。

- (c) 抗 Dsg 3 抗体価陰性の症例 9 (表 2 参照)。抗 Dsg 3 抗体価は診断後 18 か月間一貫して陰性である (表 3 参照)。

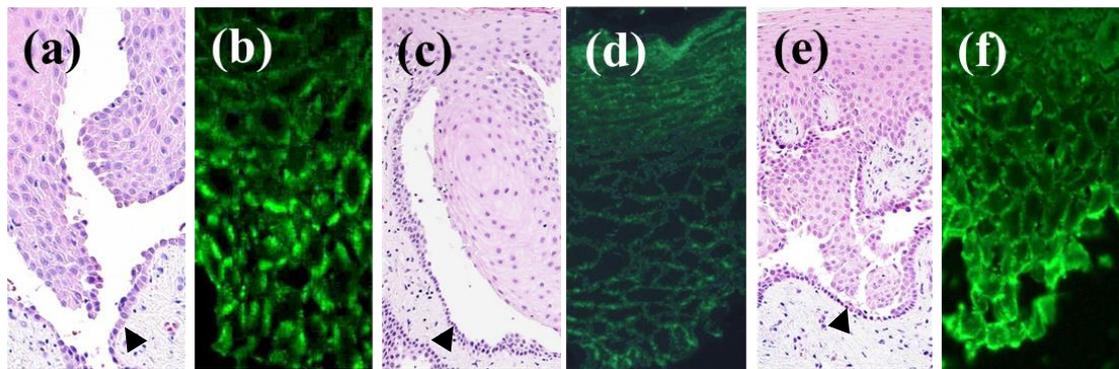


図2 尋常性天疱瘡の病理組織学的および蛍光抗体直接法の特徴 (original magnification×200)

(a) 症例1, (c) 症例7および (e) 症例10において棘融解による上皮内水疱形成を示す (HE)。

下方が基底膜側である。▲：基底細胞。

(b) 症例1, (d) 症例7および (f) 症例10で「フィッシュネット様」のパターンを呈するIgGの細胞間沈着を示す (DIF)。

抗Dsg3抗体価が陽性 (症例1) または陰性 (症例7および10) の場合においても, 棘融解およびIgGの細胞間沈着を示す。

第2章 口腔内に発症した尋常性天疱瘡における棘融解の超微細構造学的観察

諸言

PV は、粘膜および皮膚に影響を及ぼす自己免疫性水疱症である^{11, 30)}。水疱形成の要となる棘融解は、基底層直上の上皮細胞における細胞接着の喪失であり、PV 患者の病理組織学的特徴である³¹⁾。この疾患は、厚生労働省難治性疾患克服研究事業で平成 19 年度に医療費の受給を申請した患者が 4085 人とされる、非常にまれな疾患である²⁶⁾。PV 患者の約 60%以上が初期症状として上皮内水疱やびらんなどの口腔内病変を発症すると報告されている^{3, 10)}。しかし、初期病変が歯肉に限局すると歯周疾患などと誤診され、診断までに時間を要することも少なくない³⁰⁾。診断の遅延が時には患者の生命予後に大きな影響を与える場合があり、病変の進行を防ぐには初期にみられる口腔病変をわれわれ歯科医師が早期発見し、診断することが重要である^{2, 32, 33)}。PV の病因論は従来、自己抗体の結合によりデスモグレインの機能が空間的に直接阻害されることで棘融解が生じ、細胞の形態的变化はみられないとされてきた²⁶⁾。しかし、近年の報告では病原性自己抗体がデスモゾームに付着することにより細胞内へシグナル伝達が生じ、最終的にケラチノサイトがアポトーシスに至り、細胞形態が変化することで棘融解が起こると述べられている^{10, 34)}。このように、PV における棘融解の

発生機序については統一した見解がなく，病態についても不明な点が多い^{35,36)}。

本研究は，PVの棘融解によって生じるケラチノサイトの微細変化を，透過型電子顕微鏡（以下，TEM）を用いてPVに関連する超微細構造的変化を観察することを目的とした。

対象および方法

対象症例

2011年3月～2018年9月に、日本大学松戸歯学部附属病院にて日本皮膚科学会のPV診療ガイドライン（臨床的，病理組織学的および免疫学的検査）に基づきPVと診断された5症例（男性1名，女性4名，平均年齢55.4歳，年齢分布37～73歳，中央値56歳）を対象とした（表1）²⁶⁾。対象者の臨床症状は歯肉，頬粘膜および軟口蓋部でびらんまたは上皮が容易に剥離するNikolsky現象を認めた（図1）。蛍光抗体直接法は，歯肉の生検材料にて全症例で細胞間にIgGの沈着がみられた（図2）。血清抗Dsg3抗体価（ELISA法）の同定では，4症例に陽性反応を示した（表1）。

また，コントロールは歯肉の良性腫瘍切除材料に含まれた健常上皮4症例（男性2名，女性2名，平均年齢63.75歳，年齢分布48～70歳，中央値68.5歳）を対象とした。

なお，本研究は日本大学松戸歯学部倫理委員会の承認を得て行った（EC 17-17-006-1号）。

病理組織学的検索

生検材料は 10%中性緩衝ホルマリン水溶液にて固定し、通法に従ってパラフィン包埋を行った。4 μ m に薄切し切片標本を作製した。ヘマトキシリン・エオジン重染色（以下、HE）を施し観察を行った。病理診断は PV 診療ガイドライン診断基準（棘融解による上皮内水疱を認める）に準拠した²⁶⁾。

超微細構造的検索

電子顕微鏡的検索

生検時の組織切除材料を通法通り 2.5%グルタルアルデヒドおよび 1%四酸化オスミウムにて 2 時間以上二重固定した後、エタノール上昇系列にて脱水、プロピレンオキシドを用いて置換、エポキシ樹脂 (Epon812) にて包埋を行った。その後、0.5 μ m 厚に準超薄切切片を作製し Toluidine Blue 染色を行い、光学顕微鏡にて基底層、有棘層および棘融解を含む組織構造を検索し、検鏡した。

さらに、80 nm厚で超薄切切片を作製し、ウラン・鉛二重染色を行い TEM（日本電子 JEM-1200EX II）にて観察した。また、一部の組織切除材料では 80 nm厚で超薄切切片を作製し、塩基性ビスマス 40 倍希釈液による電子染色（グリコーゲン染色）を 20 分間施し、TEM にて観察した。

画像観察

組織の観察には画像解析ソフト ImageJ 1.52p (NIH, Bethesda, MD) を用いて細胞の面積, 周長, 長径, 短径, 核/細胞質 (N/C) 比およびグレーレベル同時生起行列を用いて細胞外周の複雑性の特徴量である単純さ (以下, Correlation) および乱雑さ (以下, Entropy) を算出した。

基底細胞または有棘細胞を検索し, 2,500 倍で撮影した。撮影された画像は, マニュアルトレース法によって関心領域 (細胞, 核, 核小体) および非関心領域に分け, 二値画像を作成した (図 3)。二値画像からそれぞれの面積, 周長, 長径および短径を算出した。同様に 5,000 倍で撮影した画像を二値化し, Correlation および Entropy を算出し, 30,000 倍で撮影した画像を二値化し, デスモゾームの長径を算出した。

5,000 倍で撮影した画像にて細胞接着部位の上皮細胞間隙 (以下, ICS) の距離を計測した。

画像形態計測

各症例において複数の細胞を任意の場所で測定し, 計測値の中央値を各症例の値とした。さらに, PV およびコントロールの中央値および四分位範囲を各症例値から算出した。計測した PV およびコントロールの比較には Mann-Whitney

U 検定を行った。有意水準は 5%とした。統計処理には、統計ソフトウェアの SPSS Statistics 20.0 (IBM, 東京, 日本) を用いた。

結果

病理組織学的検査結果

全症例において基底細胞の墓石状配列を認め、また、棘融解による上皮内水疱がみられた。水疱内には細胞間接着を失った Tzanck 細胞の単独あるいは数個集合した遊離を認めた (表 1, 図 4)。

微細構造および超微細構造的結果

画像所見

コントロールの Toluidine Blue 像では、上皮は基底層、有棘層、顆粒層、角質層の 4 層に分けられ、基底膜下には結合組織が広がっていた。基底膜は基底細胞と密接に結合しているのが確認できた。基底細胞は立方体から円柱状細胞を呈し、有棘細胞では、下層側では多角形が多く、上層へ向かうに従い扁平状であった。また、明瞭な細胞間橋を認めた (図 5A)。正常組織の基底細胞は紡錘形を呈し、核はクロマチンに富む縦軸方向に伸びる楕円形を示し、核小体は明瞭であった。また、基板とヘミデスモゾームから構成される基底膜を認めた (図 5B)。細胞間には細胞間接着を担うデスモゾーム構造や微絨毛を認めた。細胞質内には多量のトノフィラメントを認め、デスモゾームへ収束するにつれ密度と量が増加していた (図 5C)。さらに、デスモゾームにより結合された無傷の ICS を細

胞間で認めた (図 5D, E)。

PV の Toluidine Blue 像では、基底層を 1 層残し墓石状配列を呈す棘融解による上皮内水疱が認められた。水疱内および上皮上層には赤血球や好酸球の炎症性細胞浸潤がみられた (図 6A)。PV は丸みを帯びた細胞、核および核小体のみられた。細胞核は均一であり、核膜、核質および核小体より構成されていた。巨大な核小体は、糸状からなるが全体としては球状を呈し、境界膜を有することなく核質内に存在していた。核質は染色質 (DNA 蛋白複合体) と核基質からなり、染色質はクロマチン顆粒として認められ、核膜に沿って存在し凝集傾向を示した。基底細胞は基底膜と多数のデスモゾームによって密接に結合していた。細胞同士が接する基底細胞の上方縁や側方縁には多数の発達したデスモゾームおよび微絨毛を認めたが、棘融解が生じる基底細胞の上方縁および側方縁には不完全に発達したデスモゾームや微絨毛を認め、それらが消失する部位も存在した (図 6B, C)。デスモゾームが一部付着する部位も存在し、トノフィラメントと結合していた (図 6D)。細胞質内の核周囲にはトノフィラメントが凝集し、厚く不規則な電子密度の束となり、個々のフィラメントの判別は難しいものだった。また、ICS が拡大した部位ではデスモゾームおよび微絨毛の消失が認められた (図 6E)。デスモゾームが消失している ICS 内には、細胞膜の分離がみられた (図 6F)。また、Tzanck 細胞の細胞質内のトノフィラメントは密な部位と疎な

部位が存在し、核周囲は暗く、他の細胞と比較すると細胞質内の電子染色に濃淡の差が生じていた（図 7A）。ICS が拡大した細胞の側方縁では微絨毛は消失傾向にあり、細胞は滑らかな曲線を描くようにみられた（図 7B）。

また一部の症例では、核膜外に多数の電子密度の高いグリコーゲンと形態や大きさが類似した円形顆粒状構造物を認めた（図 8A）。無染色像ではグリコーゲン顆粒の沈着は認められなかった（図 8B）。グリコーゲン染色ではウラン・鉛二重染色でみられた核周囲に凝集するグリコーゲン様顆粒は染色されなかったが、細胞質内には豊富なグリコーゲンが沈着していた（図 8C, D）。

画像形態計測結果

PV およびコントロール細胞の画像解析結果を表 2 に示す。

PV およびコントロールに有意差は認められなかった。しかし、面積、長径、短径は PV の方が中央値は大きく、周長は PV の方が小さかった。

また、PV およびコントロールの N/C 比、Correlation および Entropy では、各中央値の差はほとんど認められずその差も有意とはならなかった。

PV およびコントロールの ICS は有意差が認められた ($p = 0.016$)（図 9）。

また、各中央値の四分位範囲は、コントロールよりも PV の方が大きく、サイズの変数が大きかった。

考察

PVの棘融解発生機序には様々な仮説がある³⁷⁾。Amagai et al.¹⁰⁾は、Dsg 3などの病原性自己抗体がデスモゾームへ結合することにより細胞内へシグナル伝達が生じ、最終的にケラチノサイトがアポトーシス促進遺伝子の発現によりアポトーシスが誘導され、デスモゾームの破壊が引き起こされると報告している。また、このケラチノサイトが崩壊することでデスモゾームが保持力を失い分離することで細胞が収縮されるという仮説を立てた¹⁰⁾。Alex et al.³⁸⁾は、初期の棘融解の発生はDsg以外の抗体によって引き起こされ、細胞骨格の崩壊およびデスモゾームの分離は後期に生じるシグナル伝達(ケラチノサイトへPV自己抗体が結合することで誘導される)により引き起こされると述べている。また、ケラチノサイトは時間の経過と共に収縮することで細胞容積が減少すると報告している³⁸⁾。さらに、Bystryn et al.³⁹⁾は、PV自己抗体によりデスモゾーム接着の消失が生じる結果として棘融解が起こるのではなく、ケラチノサイトの細胞骨格の破壊により細胞の崩壊とそれに続いて生じる細胞収縮の結果として棘融解が起こると仮説を立てた。このように、PVにおける棘融解の機序については未だ意見が一致せず、結論は得ていない^{35,36)}。

PVの画像所見では、細胞によって核周囲にコントラストの差が生じていたが、トノフィラメントの凝集による電子染色の濃淡の差であると考えられる^{31,35,40)}。

また、拡大した ICS の中には細胞膜の分離がみられ、その周囲にある微絨毛は減少していた。これらの現象は、過去の文献で散見された細胞骨格の変化や細胞の損傷を意味しており、棘融解の発生に細胞の形態的变化が関与する可能性が示唆された^{31, 35)}。また一部の症例でみられた核周囲に沈着した電子密度の高い円形顆粒状構造物の凝集は、形態学的には正常組織の細胞質でみられるグリコーゲン顆粒に類似していた。しかし、グリコーゲン染色では核周囲に顆粒の沈着は認められず、比較したコントロールの核周囲にも同様の顆粒の凝集がみられなかったことから、トノフィラメントの凝集と同様に PV の細胞内変性による細胞形態変化であると推察した。

また画像形態計測結果では、PV 細胞は周長を除いて大きくなる傾向があるため、PV は丸くコントロールは楕円または紡錘形の細胞が多く観察できたと考えられる。さらに、細胞周囲の複雑性の特徴量である単純さおよび乱雑さを評価する、Correlation および Entropy には有意差はみられなかったが、PV では周長のみが小さいこと、あるいは TEM 画像から、PV は細胞外周が滑らかであるのに対し、コントロールでは複雑な細胞外周であると推察した。

また、ICS に着目した文献が散見され、Hashimoto et al.⁴¹⁾ は ICS が保存される場合、PV 病変部の細胞は互いに付着し、デスモゾームなどその他の構造は正常に維持されていたが、ICS が崩壊すると棘融解が発生することを発見し、ICS

が最初に棘融解に至るプロセスに関与していることを示唆した。その後の研究により、ICS は最初にデスモゾーム以外の領域で損傷し、続いてデスモゾーム領域で損傷が起こり、デスモゾームが分離したことが明らかになった⁴²⁾。Chung et al.⁴³⁾ も同様に、PV 自己抗体により *in vitro* で誘発された表皮棘融解の実験では、初期にデスモゾーム以外の領域で ICS の拡大および破壊がみられ、後にデスモゾームが消失したと報告した。本研究において、PV およびコントロールの ICS を計測したところ、中央値は PV の方が 1.51 μ m 大きく、有意差 ($p=0.016$) が認められた。この結果から、PV は TEM で観察した場合においても ICS は拡大し、棘融解が生じたことが明らかとなった。

画像形態計測結果により ICS のみに有意差があることが明らかになった。この要因にはコントロールよりも PV の方が四分位範囲は大きく、細胞の大きさや形態が多様であり各細胞の個体差が大きく、細胞収縮が開始した可能性が示唆された。

デスモグレインの接着機能阻害は、自己抗体によるデスモゾーム接着の喪失が棘融解を起こす原因であると考えられてきた^{12, 17)}。Kárpáti et al.⁴⁴⁾ は、PV を引き起こすと言われる PV 抗原は、カドヘリン細胞接着分子のデスモグレインサブファミリーの 1 つであり、デスモゾームに局在すると報告した。河田ら⁴⁰⁾ は、棘融解は細胞間を結合するデスモゾームの破壊が先行し、デスモゾームの形成

は細胞質内の多数の円形顆粒状構造物の集積が関連する可能性がある」と推察した。しかし、PV 初期病変における電子顕微鏡学的検索では、細胞間接着の喪失はデスモゾーム間で生じ、デスモゾームの分離は最終的に至ると報告した文献が散見された^{38,39)}。Wilgram et al.³⁵⁾ は、PV における棘融解はデスモゾームの損傷の結果として起こるのではなく、トノフィラメントの凝集およびデスモゾームからの分離が先行し、続いてデスモゾームの消失に起因し棘融解が生じると報告した。Takahashi et al.^{37,45)} は、マウスの表皮培養細胞に PV を誘発させ、PV 自己抗体が表皮細胞へ結合しデスモゾーム接合部間の ICS が広がり、続いてデスモゾームの分裂、最後に完全な表皮細胞剥離がみられたと報告した。Diercks et al.²⁸⁾ は、デスモゾーム内のデスモグレイン接着の立体障害の場合に予想されるように、デスモゾームに変化はみられなかったことを報告した。また、これらの著者はケラチノサイトが崩壊した後にデスモゾームの切断が起こることを発見し、シグナル伝達後の細胞内メカニズムの変化が細胞骨格の変化に関連し、PV はデスモゾームの病気ではないことを示唆した²⁸⁾。

本研究において、PV の正常とみられるデスモゾームおよびコントロールのデスモゾームの長径の中央値に有意差はみられなかった。Wier et al.³⁶⁾ も同様に、粘膜優位型 PV およびコントロールのデスモゾームの距離を比較し、有意差はなかったと報告した。本研究の TEM 像では棘融解発生部位でデスモゾームの消失

がみられたことから、棘融解の影響を受けたデスモゾームの存在が明らかとなった。しかし、デスモゾームの中央値に有意差がなかったことから、なかには影響を受けない無傷のデスモゾームが存在したことが過去の文献および本研究結果から考えられる。これらの結果から、デスモゾームの分離や消失は棘融解の直接的な原因ではなく、最終的に生じる現象であると推察できる。

結論

画像所見により，核周囲ヘトノフィラメントが凝集していたことからケラチノサイトの細胞骨格の変化が生じていることが推察された。また，画像形態計測ではICSに有意差を認めた。超微細構造学的画像所見からはPVのデスモゾームの分離および消失が明らかになった。これらの結果から，棘融解はデスモゾームの分離および消失が直接的な原因ではなく，ケラチノサイトの細胞骨格の変化が関与する可能性があり，デスモゾームの分離および消失は最終的に生じる現象であることが示唆された。

表 1 尋常性天疱瘡 5 例の初診時の臨床的，病理組織学的および免疫学的所見

症例	年齢	性別	臨床症状			病理組織学的検査	免疫学的検査	
			部位	びらん	Nikolsky現象	棘融解	IgG	抗Dsg 3抗体*
1	45	女	歯肉	+	+	+	+	1890 (+)
			頬粘膜	+	+			
			軟口蓋	+	+			
2	37	女	歯肉	+	+	+	+	5.0 (-)
3	73	女	歯肉	+	+	+	+	6170 (+)
4	66	男	歯肉	+	+	+	+	555 (+)
5	56	女	歯肉	+	+	+	+	28 (+)

* 基準値：抗 Dsg 3 抗体 < 20.0 U/ ml

表 2 PV およびコントロールの画像形態計測結果

		PV (n=5)		コントロール (n=4)		*p
面積						
(μm^2)	細胞	41.98	(24.91- 46.25)	32.70	(25.83- 43.19)	0.905
	核	14.80	(8.47- 16.31)	13.83	(11.62- 16.94)	0.905
	核小体	0.98	(0.88-1.32)	0.79	(0.59- 1.10)	0.556
周長						
(μm)	細胞	49.42	(39.05- 62.65)	52.92	(42.61- 64.60)	0.905
	核	15.98	(14.08- 17.49)	15.75	(15.24- 17.32)	1.000
	核小体	4.45	(4.39- 5.19)	4.05	(3.79- 4.44)	0.190
長径						
(μm)	細胞	9.31	(8.01- 9.39)	8.02	(7.67- 10.41)	0.905
	核	5.58	(4.67- 5.61)	4.95	(4.83- 5.53)	1.000
	核小体	1.26	(1.26- 1.50)	1.22	(1.19- 1.29)	0.413
	デスモゾーム	0.41	(0.18- 0.46)	0.32	(0.29- 0.34)	0.730
短径						
(μm)	細胞	5.95	(4.68- 6.04)	4.50	(4.25- 5.06)	0.730
	核	3.61	(2.73- 3.84)	3.28	(2.88- 3.67)	1.000
	核小体	1.05	(0.74- 1.08)	0.81	(0.61- 1.01)	0.413
N/C 比		0.36	(0.32- 0.39)	0.32	(0.30- 0.33)	0.286
Correlation		0.0022	(0.0015- 0.0022)	0.0015	(0.0014- 0.0016)	0.286
Entropy		0.0515	(0.0393- 0.0672)	0.0509	(0.0467- 0.0559)	0.905

結果は各グループの中央値（四分位範囲，25%－75%）である。

*Mann-Whitney U 検定により有意差は認められない。

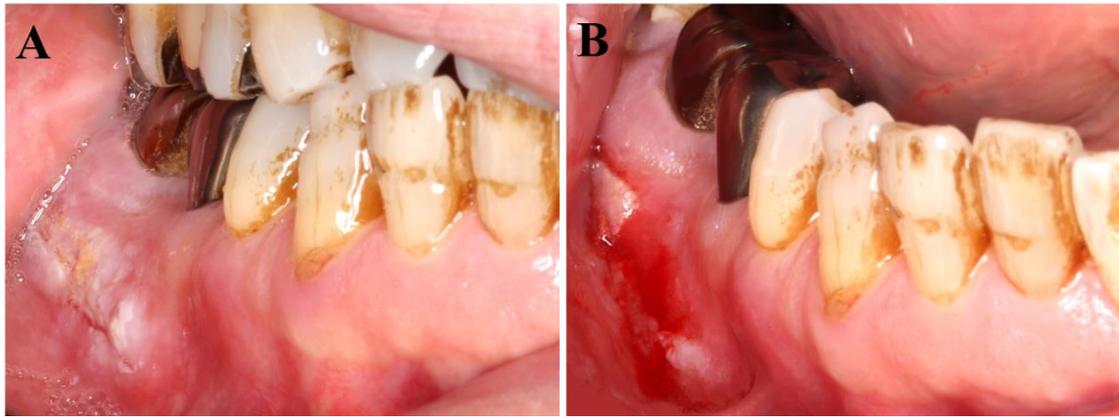


図1 尋常性天疱瘡 (PV) の口腔内写真

(A) 歯肉頬移行部にびらんを認める。

(B) 歯肉頬移行部に上皮が剥離した Nikolsky 現象を認める。

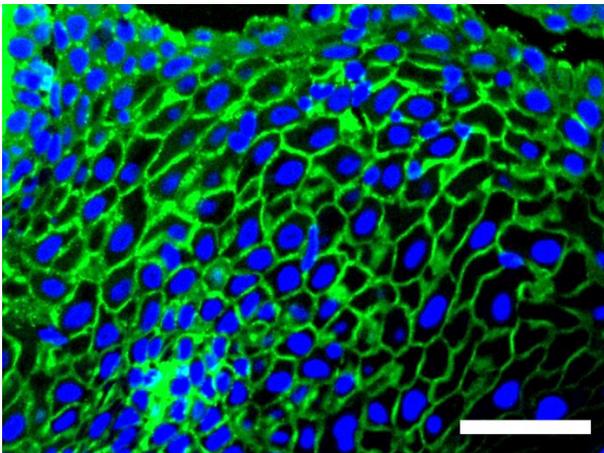


図2 PV の蛍光抗体直接法

IgG は上皮細胞間に沿って沈着する。

スケールバー= 25 μm 。

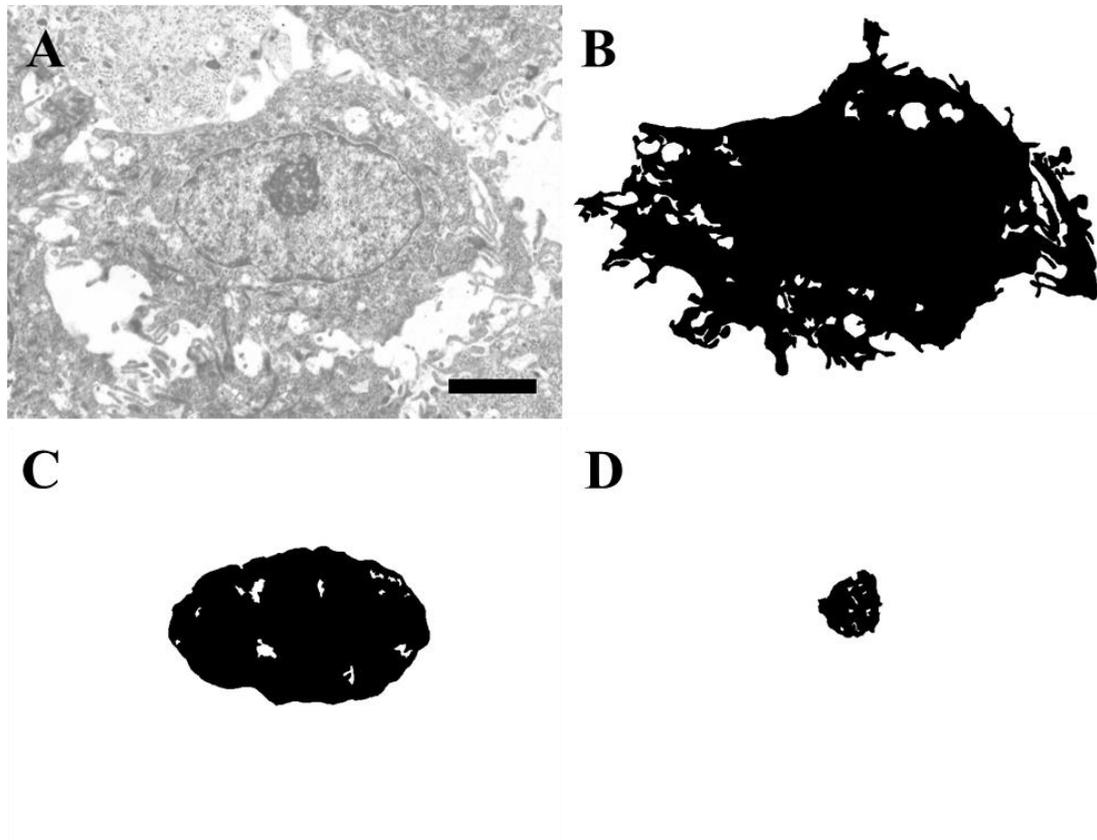


図3 PV 棘融解部位の二値画像

(A) PV 細胞の透過型電子顕微鏡画像。ICS は、棘融解により拡大を認める。

スケールバー= 2 μm 。

(B) 細胞の二値画像。

(C) 核の二値画像。

(D) 核小体の二値画像。

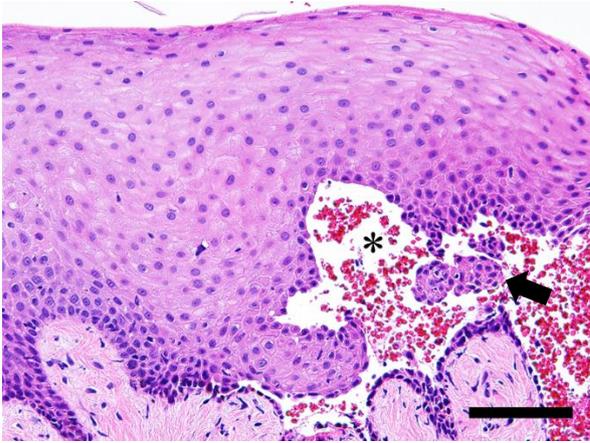


図 4 PV の病理組織学的所見 (HE)。基底層直上に棘融解による上皮内水疱が観察される (*)。さらに、水疱内には細胞間接着を失った Tzanck 細胞を認める (矢印)。

スケールバー= 50 μm 。

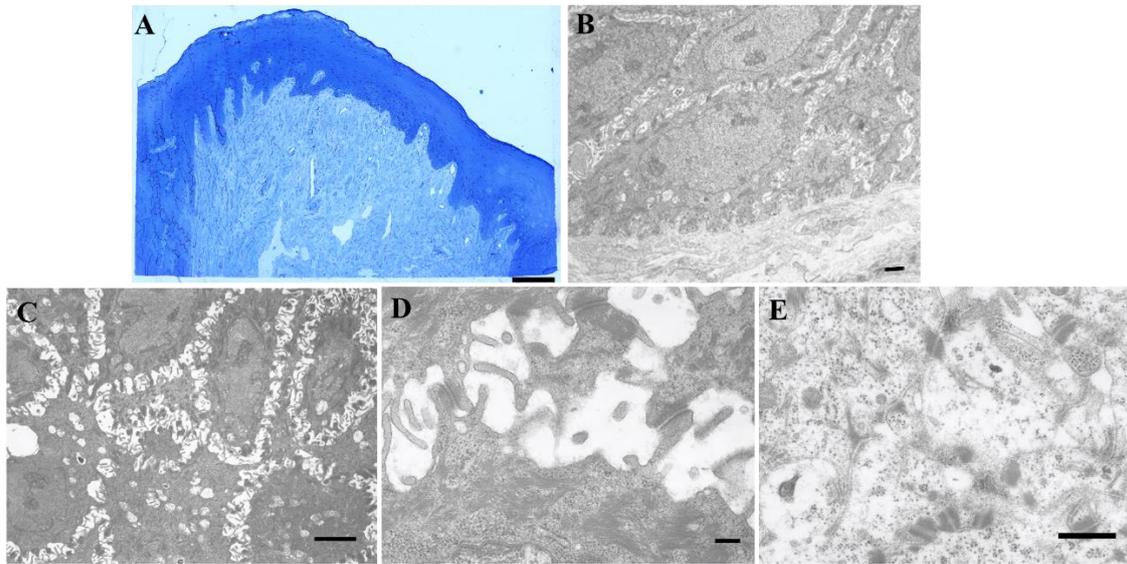


図5 コントロールの画像所見

(A) 上皮及び結合組織の準超薄切切片像 (Toluidine Blue 染色)。

スケールバー= 100 μm 。

(B) 超薄切切片の TEM 像。基底層の紡錘形細胞，核および核小体を認める。

スケールバー= 1 μm 。

(C) 細胞間にデスモゾーム結合を認める。スケールバー= 2 μm 。

(D, E) 多数のデスモゾーム結合が細胞間に観察される。スケールバー= 200 nm。

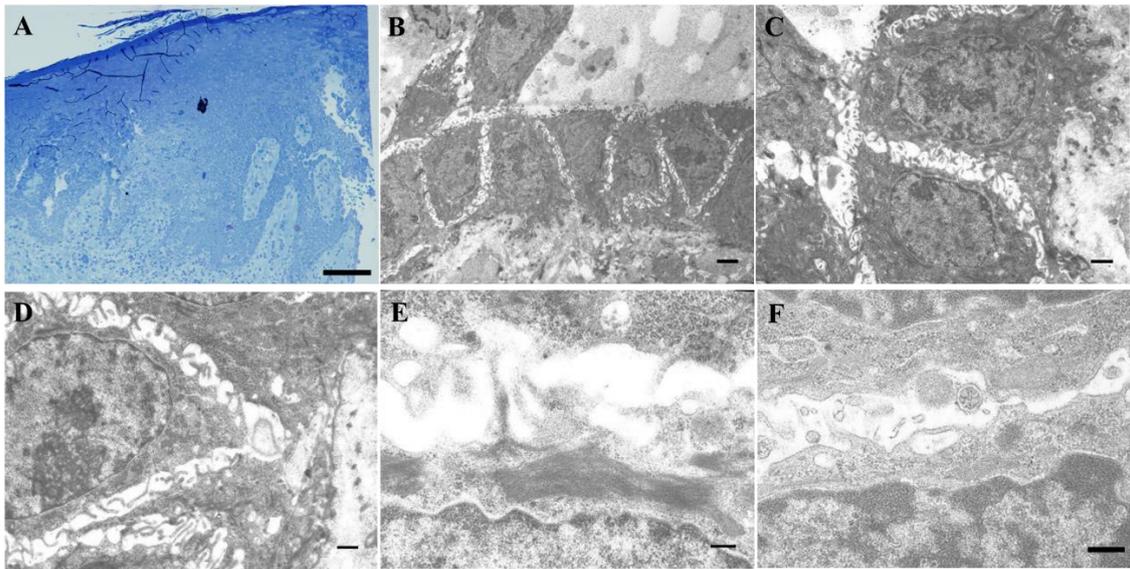


図 6 PV の画像所見

- (A) 棘融解による上皮内水疱，核および核小体が濃染される Tzanck 細胞の準超薄切切片像 (Toluidine Blue)。スケールバー= 100 μm 。
- (B) 超薄切切片の TEM 像。丸みを帯びた細胞および核を認める。
スケールバー= 2 μm 。
- (C) 細胞間接着部位は微絨毛の発達を認めるが，棘融解発生部位では ICS の拡大に伴い微絨毛は減少する。スケールバー= 1 μm 。
- (D) 細胞間接着部位の拡大像。スケールバー= 500 nm。
- (E) 細胞間の拡大像。細胞間隙は拡大し，デスモゾーム結合は消失している。
また，核周囲にはトノフィラメントの凝集を認める。スケールバー= 200 nm。
- (F) 細胞間の拡大像。ICS 内に細胞膜の断端様構造を認める。
スケールバー= 200 nm。

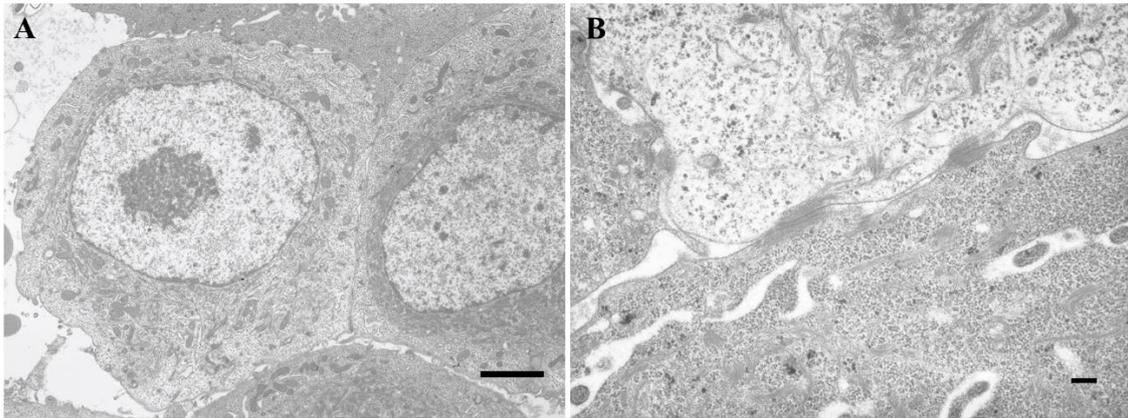


図 7 Tzanck 細胞の TEM 像

(A) 細胞質内は濃淡の差を認める。スケールバー= 2 μm 。

(B) ICS は拡大し微絨毛の消失傾向を認める。スケールバー= 200 nm。

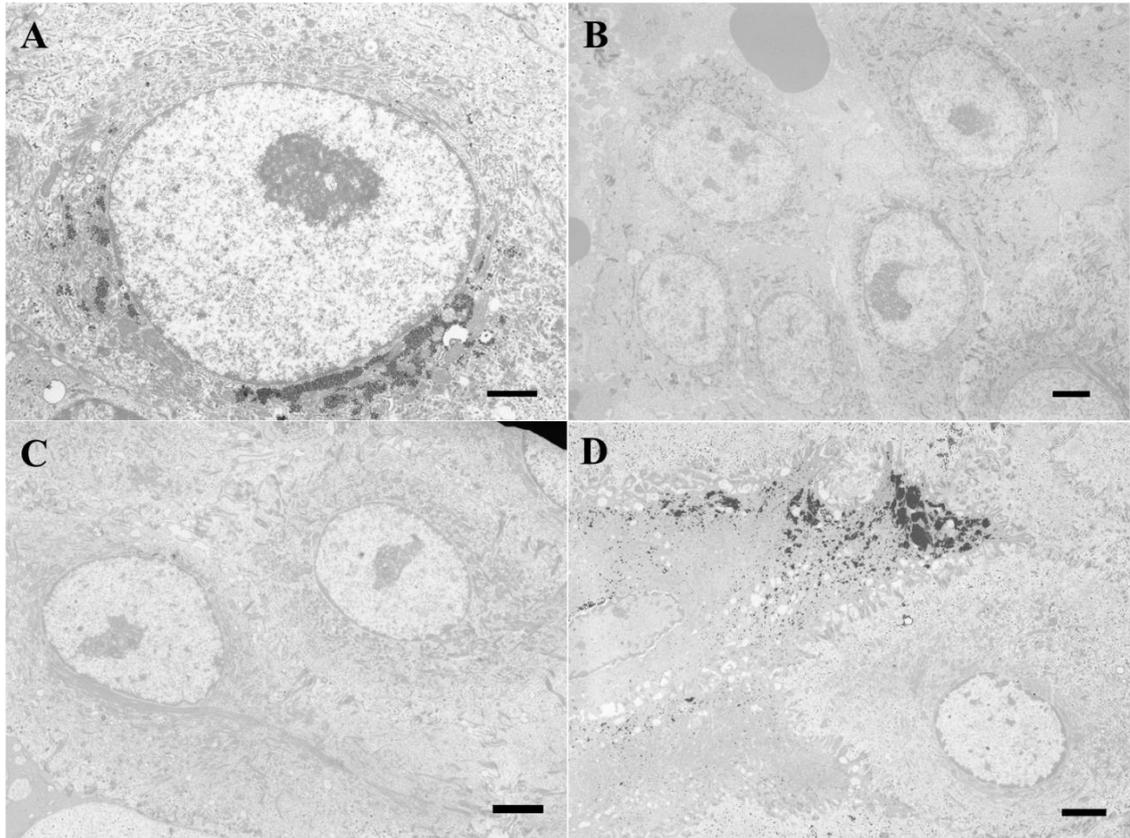


図 8 PV の核周囲に沈着した顆粒の TEM 像

(A) ウラン・鉛二重染色像。核周囲に電子密度の高い円形顆粒状構造を認める。

スケールバー= 1 μm 。

(B) 無染色像。核周囲にグリコーゲンの沈着は認められない。

スケールバー= 2 μm 。

(C) グリコーゲン染色像。核周囲にグリコーゲンの沈着は認められない。

スケールバー= 2 μm 。

(D) グリコーゲン染色像。細胞質内にグリコーゲンの陽性反応を認める。

スケールバー= 2 μm 。

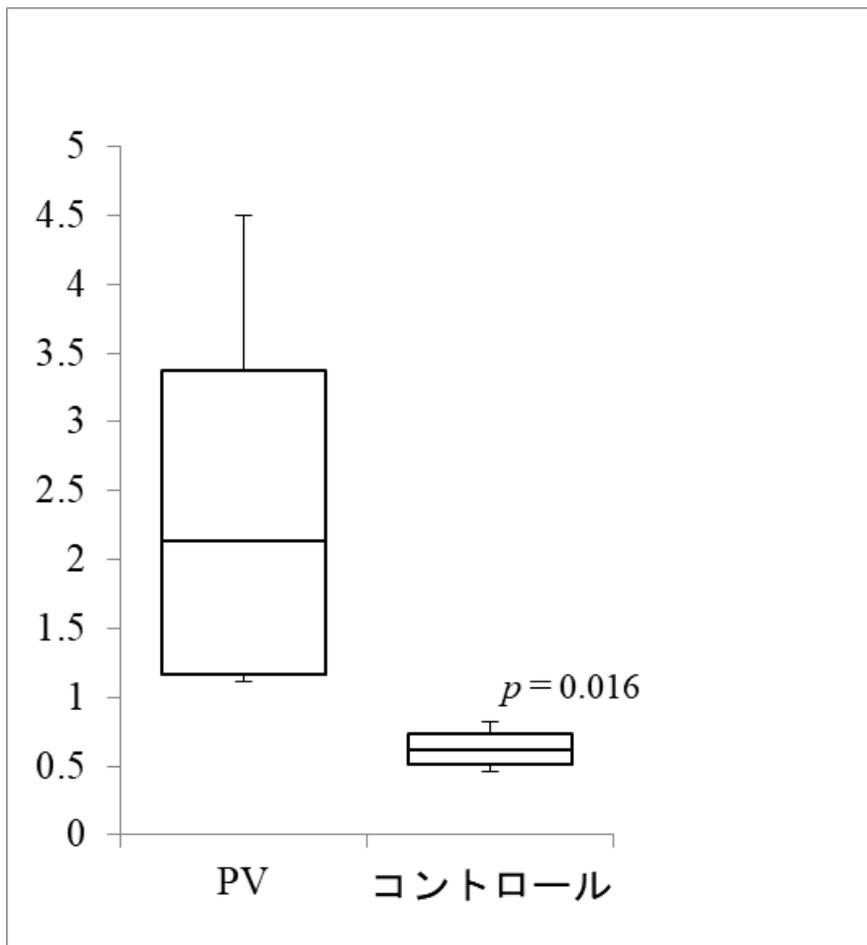


図9 PVおよびコントロールにおける上皮細胞間隙の画像形態計測結果

PVおよびコントロールの上皮細胞間隙に有意差を認める。

総括

尋常性天疱瘡の棘融解の誘発には抗 Dsg 3 抗体の検出が必須であるという理論が支持されているが、異なる仮説も散見され、口腔内にみられる PV には抗 Dsg 3 抗体価が陰性の症例も存在する。そこで本研究の第 1 章では、臨床所見および検査所見に対する相違を評価した後ろ向き研究を行った。第 2 章では、透過型電子顕微鏡にて画像観察および画像形態計測による超微細構造的検索を実施し、棘融解の発生について検討した。

これらの研究から、抗 Dsg 3 抗体が陰性であった患者も存在したことから、必ずしも棘融解の発生に関与するわけではないことが推察され、棘融解の発症は血清抗体価の上昇に先行して生じている可能性が示唆された。さらに、棘融解はデスモゾームの分離および消失が直接的な原因ではなく、ケラチノサイトの細胞骨格の変化が関与する可能性が示唆された。本研究は尋常性天疱瘡における病因の解明の一助になると考えられる。

参考文献

- 1) Endo H, Rees TD, Matsue M, Kuyama K, Nakadai M, Yamamoto H: Early detection and successful management of oral pemphigus vulgaris: a case report. *J Periodontol*, 76: 154–160, 2005.
- 2) Endo H, Rees TD, Hallmon WW, Kuyama K, Nakadai M, Kato T, Kono Y, Yamamoto H: Disease progression from mucosal to mucocutaneous involvement in a patient with desquamative gingivitis associated with pemphigus vulgaris. *J Periodontol*, 79: 369–375, 2008.
- 3) Endo H, Rees TD: Diagnosis and management of desquamative gingivitis. *InTech*, 11: 171-188, 2011.
- 4) Mignogna MD, Fortuna G, Leuci S, Ruoppo E, Marasca F, Matarasso S: Nikolsky's sign on the gingival mucosa: a clinical tool for oral health practitioners. *J Periodontol*, 79: 2241-2246, 2008.
- 5) Avgerinou G, Papafragkaki DK, Nasiopoulou A, Markantoni V, Arapaki A, Servitzoglou M, Katsambas A, Stavropoulos PG: Correlation of antibodies against desmogleins 1 and 3 with indirect immunofluorescence and disease status in a Greek population with pemphigus vulgaris. *J Eur Acad Dermatol Venereol*, 27: 430-435, 2013.

- 6) Lamey PJ, Rees TD, Binnie WH, Wright JM, Rankin KV, Simpson NB: Oral presentation of pemphigus vulgaris and its response to systemic steroid therapy. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*, 74: 54–57, 1992.
- 7) Zagrodniuk I, Weltfriend S, Shtruminger L, Sprecher E, Kogan O, Pollack S, Bergman R: A comparison of anti-desmoglein antibodies and indirect immunofluorescence in the serodiagnosis of pemphigus vulgaris. *Int J Dermatol*, 44: 541-544, 2005.
- 8) Anhalt GJ, Labib RS, Voorhees JJ, Beals TF, Diaz LA: Induction of pemphigus in neonatal mice by passive transfer of IgG from patients with the disease. *N Engl J Med*, 306: 1189-11896, 1982.
- 9) Ahmed AR, Carrozzo M, Caux F, Cirillo N, Dmochowski M, Alonso AE, Gniadecki R, Hertl M, López-Zabalza MJ, Lotti R, Pincelli C, Pittelkow M, Schmidt E, Sinha AA, Sprecher E, Grando SA: Monopathogenic vs multipathogenic explanations of pemphigus pathophysiology. *Exp Dermatol*, 25: 839-846, 2016.
- 10) Amagai M, Ahmed AR, Kitajima Y, Bystryn JC, Milner Y, Gniadecki R, Hertl M, Pincelli C, Kurzen H, Fridkis-Hareli M, Aoyama Y, Fruscić-Zlotkin M, Müller E, David M, Mimouni D, Vind-Kezunovic D, Michel B, Mahoney M, Grando S: Are desmoglein autoantibodies essential for the immunopathogenesis of pemphigus

vulgaris, or just "witnesses of disease"? *Exp Dermatol*, 15: 815-831, 2006.

- 11) Amagai M, Tsunoda K, Zillikenes D, Nagai T, Nishikawa T: The clinical phenotype of pemphigus is defined by the anti-desmoglein autoantibody profile. *JAAD*, 40: 167-170, 1999.
- 12) Amber KT, Valdebran M, Grando SA: Non-desmoglein antibodies in patients with pemphigus vulgaris. *Front Immunol*, 9: 1190, 2018.
- 13) Cirillo N, Cozzani E, Carrozzo M, Grando SA: Urban legends: pemphigus vulgaris. *Oral Dis*, 18: 442-458, 2012.
- 14) Di Zenzo G, Borradori L, Muller EJ: The pathogenesis of pemphigus: Controversy vs complexity. *Experimental Dermatology*, 26: 1271–1273, 2017.
- 15) Grando SA: Pemphigus autoimmunity: Hypotheses and realities. *Autoimmunity*, 45: 7–35, 2012.
- 16) Sardana K, Garg VK, Agarwal P: Is there an emergent need to modify the desmoglein compensation theory in pemphigus on the basis of Dsg ELISA data and alternative pathogenic mechanisms? *Br J Dermatol*, 168: 669-674, 2013.
- 17) Stanley JR, Nishikawa T, Diaz LA, Amagai M: Pemphigus: is there another half of the story? *J Invest Dermatol*, 116: 489-490, 2001.
- 18) Belloni A, Faggion D, Pigozzi B, Peserico A, Bordignon M, Baldo V, Alaibac M:

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. *Clin Dev Immunol*, 2009: 187864, 2009.

- 19) Daneshpazhooh M, Chams-Davatchi C, Khamesipour A, Mansoori P, Taheri A, Firooz A, Mortazavi H, Esmaili N, Dowlati Y: Desmoglein 1 and 3 enzyme-linked immunosorbent assay in Iranian patients with pemphigus vulgaris: correlation with phenotype, severity, and disease activity. *J Eur Acad Dermatol Venereol*, 21: 1319-1324, 2007.
- 20) Jamora MJ, Jiao D, Bystryk JC: Antibodies to desmoglein 1 and 3, and the clinical phenotype of pemphigus vulgaris. *J Am Acad Dermatol*, 48: 976-977, 2003.
- 21) Khandpur S, Sharma VK, Sharma A, Pathria G, Satyam A: Comparison of enzyme-linked immunosorbent assay test with immunoblot assay in the diagnosis of pemphigus in Indian patients. *Indian J Dermatol Venereol Leprol*, 76: 27-32, 2010.
- 22) Koga H, Ohyama B, Tsuruta D, Ishii N, Hamada T, Dainichi T, Natsuaki Y, Sogame R, Fukuda S, Karashima T, Tada J, Yamashiro M, Uezato H, Chan PT, Hashimoto T: Five Japanese cases of antidesmoglein 1 antibody-positive and antidesmoglein 3 antibody-negative pemphigus with oral lesions. *Br J Dermatol*, 166: 976-80, 2012.
- 23) Sharma VK, Prasad HR, Khandpur S, Kumar A: Evaluation of desmoglein enzyme-

- linked immunosorbent assay (ELISA) in Indian patients with pemphigus vulgaris. *Int J Dermatol*, 45: 518-522, 2006.
- 24) Ormond M, McParland H, Donaldson ANA, Andiappan M, Cook RJ, Escudier M, Hullah E, Higham J, McMillan R, Taylor J, Shirlaw PJ, Challacombe SJ, Setterfield JF: An Oral Disease Severity Score validated for use in oral pemphigus vulgaris. *Br J Dermatol*, 179: 872-881, 2018.
- 25) Shimizu T, Takebayashi T, Sato Y, Niizeki H, Aoyama Y, Kitajima Y, Iwatsuki K, Hashimoto T, Yamagami J, Werth VP, Amagai M, Tanikawa A: Grading criteria for disease severity by pemphigus disease area index. *J Dermatol*, 41: 969-973, 2014.
- 26) 天谷雅行, 谷川瑛子, 清水智子, 橋本隆, 池田志孝, 黒沢美智子, 新関寛徳, 青山裕美, 岩月啓氏, 北島康雄: 天疱瘡診療ガイドライン. *日皮会誌*, 120: 1443- 1460, 2010.
- 27) Stanley JR, Amagai M: Pemphigus, bullous impetigo, and the staphylococcal scalded-skin syndrome. *N Engl J Med*, 355: 1800–1810, 2006.
- 28) Diercks GF, Pas HH, Jonkman MF: The ultrastructure of acantholysis in pemphigus vulgaris. *Br J Dermatol*, 160: 450-474, 2009.
- 29) Bystryn JC, Grando SA: A novel explanation for acantholysis in pemphigus vulgaris: the basal cell shrinkage hypothesis. *J Am Acad Dermatol*, 54: 513-516, 2006.

- 30) Endo H, Rees TD, Niwa H, Kuyama K, Oshima M, Serizawa T, Tanaka S, Iijima M, Komiya M, Ito T: Desquamative gingivitis: Early sign of mucous membrane pemphigoid and pemphigus vulgaris, *InTech*, 10: 3-17, 2018.
- 31) Kobayashi T, Kaneko C, Sugishima S, Kusakawa J, Kameyama T: Scrape cytology of oral pemphigus report of a case with immunocytochemistry and light, scanning electron and transmission electron microscopy. *Acta Cytol*, 43: 289-294, 1999.
- 32) Popescu I, Statescu L, Vata D, Andrese E, Patarascu A, Grajdeanu I, Solovastru L: Pemphigus vulgaris - approach and management. *Exp Ther Med*, 18: 5056-5060, 2019.
- 33) España A, Fernandez S: Exploring beyond the oral mucosa in patients affected with autoimmune blistering diseases: the importance of endoscopic procedures. *J Eur Acad Dermatol Venereol*, 31: 791-797, 2017.
- 34) Schiltz JR, Michel B, Papay R: Pemphigus antibody interaction with human epidermal cells in culture. *J Clin Invest*, 62: 778-788, 1978.
- 35) Wilgram G, Caulfield J, Lever W: An electron microscopic study of acantholysis in pemphigus vulgaris. *JID*, 36: 373-382, 1961.
- 36) Wier G, Pas H, Kramer D, Diercks G, Jonkman MF: Smaller desmosomes are seen in the skin of pemphigus patients with anti-desmoglein 1 antibodies but not in

- patients with anti-desmoglein 3 antibodies. *J Invest Dermatol*, 134: 2287–2290, 2014.
- 37) Liu Z, Li N, Diaz LA: Immunopathological mechanisms of acantholysis in pemphigus vulgaris: an explanation by ultrastructural observations. *J Invest Dermatol*, 122: 13-14, 2004.
- 38) Chernyavsky AI, Arredondo J, Kitajima Y, Sato-Nagai M, Grando SA: Desmoglein versus non-desmoglein signaling in pemphigus acantholysis: characterization of novel signaling pathways downstream of pemphigus vulgaris antigens. *J Biol Chem*, 282: 13804–13812, 2007.
- 39) Bystryn JC, Grando SA: The cause of acantholysis in pemphigus: further support for the ‘basal cell shrinkage’ hypothesis. *Br J Dermatol*, 161: 702, 2009.
- 40) 河田政昭, 藤崎誠, 山下憲子, 杉原一正, 山下佐英: 透過型および走査型電子顕微鏡による尋常性天疱瘡の超微細構造に関する研究. *日口外誌*, 35: 1105-1111, 1989.
- 41) Hashimoto K, Lever WF: An electron microscopic study on pemphigus vulgaris of the mouth and the skin with special reference to the intercellular cement. *J Invest Dermatol*, 48: 540-552, 1967.
- 42) Hashimoto K, Lever WF: An ultrastructural study of cell junctions in pemphigus vulgaris. *Arch Dermatol*, 101: 287-298, 1970.

- 43) Hu CH, Michel B, Schiltz JR: Epidermal acantholysis induced in vitro by pemphigus autoantibody. *Am J Pathol*, 90: 345–361, 1978.
- 44) Kárpáti S, Amagai M, Prussick R, Cehrs K, Stanley JR: Pemphigus vulgaris antigen, a desmoglein type of cadherin, is localized within keratinocyte desmosomes. *J Cell Biol*, 122: 409-415, 1993.
- 45) Takahashi Y, Patel HP, Labib RS, Diaz LA, Anhalt GJ: Experimentally induced pemphigus vulgaris in neonatal BALB/c mice: a time-course study of clinical, immunologic, ultrastructural, and cytochemical changes. *J Invest Dermatol*, 84: 41-46, 1985.