

アレルギー性眼疾患の重症化にかかわる眼局所免疫機構の解析

研究課題番号(10671659)

平成10年～平成12年度科学研究費補助金(基盤研究(C)(2))研究成果報告書

平成13年3月

研究代表者 高村悦子
(東京女子医科大学 医学部 助教授)



(10671659)
基盤研究(C)(2)

かかわる眼局所免疫機構の解析
アレルギー性眼疾患の重症化に

(東京女子医科大学医学部助教授)
高村悦子

平成十三年三月

H12
kce
Tak

平成10年～平成12年度科学研究費補助金(基盤研究(C)(2))研究成果報告書
平成13年3月

1. 課題番号(10671659)

2. アレルギー性眼疾患の重症化にかかわる眼局所免疫機構の解析

3. 研究組織 研究代表者 高村悦子(東京女子医科大学 医学部 助教授)

4. 研究経費	平成10年度	900千円
	平成11年度	700千円
	平成12年度	900千円
	計	2500千円

5. はしがき

アレルギー性眼疾患はスギ花粉症の増加、アトピー性皮膚炎、喘息の増悪化とともに、眼科領域においても患者数の増加、重症化、遷延化が問題となってきた。ダニ、花粉などをアレルゲンとする即時型アレルギーを主体とするアレルギー性眼疾患には、季節性アレルギー性結膜炎、通年性アレルギー性結膜炎、春季カタル、アトピー性角結膜炎などが含まれるが、このうち結膜の増殖性変化および角膜上皮障害を伴う重症型のアレルギー性眼疾患である春季カタルとアトピー性角結膜炎においては、いまだに、重症化のメカニズムに関して、免疫学的な解析は充分にはなされていない。

結膜組織および涙液中への好酸球の出現は、他のアトピー性疾患と同様、アレルギー性眼疾患においても共通した所見の一つである。結膜局所への好酸球の浸潤はアレルゲンの点眼による誘発テストによっても確認されており、好酸球はアレルギー性眼疾患を特徴づける炎症細胞の一つと考えられている。また、春季カタルに伴う難治性の角膜上皮障害には結膜組織、涙液中に存在する活性化好酸球から放出される好酸球顆粒蛋白が関与している可能性が示唆されており、アレルギー性眼疾患においても喘息と同様に好酸球が疾患の重症化に重要な役割を演じている可能性がある。

一方、これら炎症細胞の角結膜局所への集積には、ケモカインが重要な役割を演じていることが、アトピー性皮膚炎や気管支喘息においてすでに明らかになってきているが、アレルギー性眼疾患においてもケモカインであるRANTESやIL-8が涙液中、結膜組織中に存在することが報告されてきている。最近、RANTES,IL-8, MCP-1は炎症性サイトカインの刺激によりヒト結膜上皮初代培養細胞から誘導できることが明らかとなり、また、角膜上皮は活性化好酸球のケモカインであるIL-8の産生能を有していることから、結膜上皮細胞および角膜上皮細胞がこれらのケモカインより好酸球を眼表面へ動員し、活性化好酸球により角膜上皮障害をきたす可能性が考えられる。

今回、細胞レベルでの炎症細胞の定量的評価に加え、重症なアレルギー性眼疾患における角膜上皮障害の病態を解明する目的で、1) アレルギー性炎症に関与するサイトカインの眼局所での局在、2) 結膜上皮内のケモカインの存在と炎症細胞の関連、3) 点眼誘発テストによる眼局所でのサイトカインの産生を免疫学的、分子生物学的に検討し、季節性アレルギー性結膜炎の病態と比較することにより春季カタル、アトピー性角結膜炎などにおける角膜上皮障害に関与するケモカイン、炎症細胞について分析する。得られた成績をもとに眼局所での炎症に直接効果をもたらす新たな点眼薬の開発への可能性を試みる。

6. 研究発表

1) 原著論文、学会誌等発表

1. Nomura K, Takamura E :
Tear IgE concentrations in allergic conjunctivitis.
Eye. 12: 296-298,1998
2. Fukada Y, Takamura E, Fukagawa K, Nomura K, Yukari J, Takano J, Miyoshi T, Nakamura M, Urayama K, Sai M, Tsubota K, Shimmura S, Oguchi Y and Saito H.
Chemokine expression in the supernatants of allergic conjunctival epithelial samples correlate with the infiltration of inflammatory cells.
Invest ophthalmol Vis Sci: 39, 547, 1998
3. 檜垣祐子、高村悦子、川島眞
アトピー性皮膚炎患者にみられた重症の角結膜病変について
臨床皮膚科 52 : 18-21、1998
4. 高村悦子、野村圭子
アレルギー性結膜炎における抗原特異的IgE抗体
眼科臨床医報 92 : 1083-1088、1998
5. 野村圭子、高村悦子
通年性アレルギー性結膜炎の診断におけるハウスダスト抗原の検討
眼科臨床医報 92 : 1086-1085、1998
6. 高村悦子
治療薬の最前線と問題点ー抗アレルギー点眼薬、初期療法
アレルギー・免疫 6 : 22-28、1999
7. Yukari J, Takamura E, Fukagawa K, Takano Y, Hori S, Tsubota K
Localization of eosinophils and eotaxin expression in the tarsal conjunctivitis. Invest ophthalmol Vis Sci: 40, 682, 1999
8. Yukari J, Fukagawa K, Takano Y, Fujishima H, Saito H, Nakajima T, Takamura E, Hori S, Tsubota K
Eotaxin is produced from corneal keratocytes but not from corneal epithelial cells. Invest Ophthalmol Vis Sci 41:365,2000

2. 学会発表

1. 深田祐加、野村圭子、高村悦子、中川尚
春季カタルにみられる角膜プラークの治療法
第22回角膜カンファランス、1998年2月13日-15日、賢島

2. Fukada Y, Takamura E, Fukagawa K, Nomura K, Yukari J, Takano J, Miyoshi T, Nakamura M, Urayama K, Sai M, Tsubota K, Shimmura S, Oguchi Y and Saito H.
Chemokine expression in the supernatants of allergic conjunctival epithelial samples correlate with the infiltration of inflammatory cells.
Annual meeting of the association for research in vision and ophthalmology. May 10-15, 1998, Fort Lauderdale, USA

3. 高村悦子、深田祐加、弓狩純子、野村圭子、堀貞夫、熊埜御堂隆
重症な角膜所見を呈するアトピー性角結膜炎の1例
第52回日本臨床眼科学会、1998年10月23日～25日、神戸

4. 深川和己、加藤直子、榛村重人、浦山久美子、島崎潤、坪田一男、深田祐加、高村悦子、斉藤博久、中島敏治、平井浩一
IL-4による角膜上皮・実質細胞のRANTESおよびEotaxinの産生
第52回日本臨床眼科学会、1998年10月23日～25日、神戸

5. 見好貴公、桂弘、深川和己、榛村重人、島崎潤、坪田一男、弓狩純子、高村悦子、斉藤博久、中島敏治、平井浩一
ヒト結膜線維芽細胞のエオタキシン産生
第52回日本臨床眼科学会、1998年10月23日～25日、神戸

6. 深川和己、斎藤博久、北條みどり、見好貴公、榛村重人、坪田一男、高村悦子、深田祐加
重症アレルギー性結膜炎患者の結膜上皮中IL-8,RANTES, MCP-1と好酸球・好中球浸潤
第10回日本アレルギー学会春季臨床大会 1998年4月23日、名古屋

7. 弓狩純子、高村悦子、深田祐加、堀貞夫、藤島浩、坪田一男、斉藤博久：
アトピー性角結膜炎の上眼瞼結膜における好酸球とエオタキシンの局在
第23回角膜カンファランス、1999年2月11日-13日、賢島

8. 深川和己、加藤直子、榛村重人、坂田実紀、浦山久美子、坪田一男、弓狩純子
深田祐加、高村悦子、斉藤博久、中島敏治、平井浩一
アトピー性角結膜炎患者涙液中のEotaxin濃度と好酸球
第23回角膜カンファランス、1999年2月11日-13日、賢島
9. Yukari J, Takamura E, Fukagawa K, Takano Y, Hori S, Tsubota K
Localization of eosinophils and eotaxin expression in the tarsal conjunctivitis.
Annual meeting of the association for research in vision and ophthalmology. May 9-14, 1999, Fort Lauderdale, USA
10. 深田祐加、高村悦子、真鍋宣子、弓狩純子、堀貞夫、檜垣祐子
アトピー性角結膜炎の増悪化への眼瞼皮膚炎の関与
第53回日本臨床眼科学会 1999年10月7日～10日 東京
11. 弓狩純子、高村悦子、堀貞夫、深川和己、高野洋之、藤島浩：
アトピー性角結膜炎の上眼瞼結膜における好酸球とエオタキシンの関与
第24回角膜カンファランス、2000年2月16日-19日、舞浜
12. 高村悦子、野村圭子、深川和己、藤島浩、佐竹良之：眼誘発試験による季節性
アレルギー性結膜炎に対する0.025%レボカバステチン点眼薬の効果
第104回日本眼科学会総会 2000年4月6日～9日 京都
13. Yukari J, Fukagawa K, Takano Y, Fujishima H, Saito H, Nakajima T,
Takamura E, Hori S, Tsubota K:
Eotaxin is produced from corneal keratocytes but not from corneal epithelial cells.
Annual meeting of the association for research in vision and ophthalmology. April 30-May 5, 2000, Fort Lauderdale, USA

3. 総説、著書等出版物

1. 高村悦子：アレルギー性結膜炎の診断と治療.
日本の眼科 69 (8) : 895-899、1998
2. 高村悦子：Ⅲアトピー性皮膚炎 3. 眼合併症対策 3) 角結膜炎その他.
特集 眼アレルギーの診療
月刊眼科診療プラクティス 3 (3) : 62-63、2000
3. 花粉症の治療 アレルギー性結膜炎の治療
東京都医師会雑誌 53 (3) : 26-31、2000
4. 高村悦子：アレルギー性結膜炎患者の旅行
アレルギー・免疫 7 (7) : 74-78、2000
5. 高村悦子：6. 合併症の治療. 2.眼科合併症の治療 (p.249-256)
アトピー性皮膚炎 コンセンサスアップデート (宮地良樹、永倉俊和編集)
メディカルレビュー社、東京、2000年

7. 研究成果

本研究の成果は、大別して以下の三つに分けられる。すなわち、

- 1) アレルギー性結膜炎の重症度に関連した涙液中サイトカイン蛋白の発現
 - 2) 重症アレルギー性眼疾患における結膜上皮内のケモカインと炎症細胞の関連
 - 3) 重症アレルギー性眼疾患における結膜局所でのケモカイン mRNA の免疫組織学的検討
 - 4) 点眼誘発試験による結膜局所での炎症細胞とケモカイン蛋白の発現
- である。それぞれの項目について研究成果の概略を記載する。

1) アレルギー性結膜炎の重症度に関連した涙液中サイトカイン蛋白の発現

はじめに

重症型のアレルギー性眼疾患の病態として、気管支喘息における late phase reaction と同様、結膜、涙液、角膜に浸潤した活性化好酸球および好酸球の脱顆粒により局所に放出された組織障害性蛋白が角膜上表障害をおこすとが考えられている。実際、春季カタルやアトピー性角結膜炎患者の涙液、結膜には、季節性アレルギー性結膜炎や通年性アレルギー性結膜炎に比べ好酸球が多数浸潤している。角膜障害の程度も、点状表層角膜症といった治療に反応しやすく、比較的軽症なものから、角膜びらんを呈する重症なものまで、様々であるが、VKC および AKC 患者の結膜上皮や涙液に浸潤した炎症細胞の数と種類を解析した結果では、角膜障害が重症になるほど好酸球の浸潤が急激に増加し、特に活性化好酸球1およびその顆粒蛋白である ECP や MBP が増加し、また、これらは、培養角膜上皮細胞に対し障害性に働くことが明らかになっている。

好酸球がアレルギー炎症の場である結膜、涙液、角膜へと浸潤していくルートとしては、角膜が無血管であることから、まず、結膜下組織の血管から好酸球が結膜に浸潤し、涙液を介して、角膜に到達するものと思われる。この好酸球のアレルギー炎症の場への集積には、遊走活性をもつサイトカインであるケモカインが主役を演じている。好酸球の遊走をひきおこすケモカインとしては、RANTES(regulated upon activation, normal T cell expressed and secreted)が知られていたが、最近では、RANTES の10倍もの好酸球遊走活性を持つエオタキシンが発見され注目されている。エオタキシンは、好酸球に対し、他のケモカインに比べ強力な走化活性をもつだけでなく、好酸球上に発現するレセプター、CCR3のリガンドの中で、エオタキシンは、標的細胞特異性が高いという特徴がある。

方法

春季カタル4例、角膜潰瘍を伴うアトピー性角結膜炎3例、通年性アレルギー性結膜炎3例、季節性アレルギー性結膜炎4例を対象とした。眼科的、全身的にアレルギー

一性疾患をみとめない7例を正常コントロールとした。マイクロピペットを用い外眼角から涙液を採取し、ELISA法によりIL-4、IL-13、IL-5、GM-CSFを測定した。また、好酸球に關与するケモカインとしてRANTES、エオタキシンを測定した。

結果および考察

IL-4はアレルギー性結膜炎患者の涙液中には、角膜上皮障害の有無に關わらずみとめられた。IL-5は、角膜潰瘍や点状表層角膜症などの角膜上皮障害を伴う春季カタル2例、アトピー性角結膜炎3例にみとめられた。IL-13、GM-CSFは角膜潰瘍が難治性であったアトピー性角膜炎の1例のみとめたが、他の病型ではみられなかった。軽症のアレルギー性結膜炎7例中、2例にはIL-4をみとめたが、その他のサイトカインはみられなかった。

ケモカインのうちRANTESは検出限界値を78.0pg/mlとした場合、アレルギー性眼疾患からは、すべて検出されたが、正常コントロールの涙液においては陰性であった。アレルギー性眼疾患のなかでも角膜潰瘍を伴う春季カタル、アトピー性角結膜炎では、角膜上皮障害を伴わないアレルギー性結膜炎に比べ高値を示す傾向があった。また、角膜潰瘍を伴うアトピー性角結膜炎患者の涙液中エオタキシン濃度は、点状表層角膜症を伴うもの、および正常コントロールに比べ有意に高値を示した。

重症型アレルギー性眼疾患では、涙液中にはIL-4をはじめとするTh-2優位のサイトカインおよびTリンパ球や好酸球に遊走活性を有するケモカインがみとめられる。これらのサイトカインおよびケモカインがアレルギー性眼疾患の角膜上皮障害の一因となっている可能性が示唆された。

2) 重症アレルギー性眼疾患における結膜上皮内のケモカインと炎症細胞の関連

はじめに

重症アレルギー性眼疾患における角膜上皮障害の病態を解明するために、好酸球が血管から涙液へ到達するルートにあたる結膜におけるケモカインの局在をあきらかにすることは重要である。また、重症型アレルギー性眼疾患の角膜上皮障害の程度には、もっとも難治性な角膜潰瘍から比較的治療に奏効する点状表層角膜症まで様々な病態が含まれている。そこで、結膜上皮内の好酸球および好酸球の遊走に關与するケモカインと角膜上皮障害の程度との関連を検討した。

方法

結膜上皮をブラッシュサイトロジー法により採取し、細胞浮遊液中のケモカイン (RANTES, IL-8, MCP-1, エオタキシン) の濃度を ELISA 法で測定し、同時に採取された細胞数の計測から、 10^6 細胞あたりの濃度に補正した。採取された細胞中の活性化好酸球、リンパ球、好中球の出現率をサイトスピンを用いた定量的解析により算出し、これらのケモカインの濃度と炎症細胞の出現率および角膜上皮障害の重症度 (角膜潰瘍、点状表層角膜症) との関連を検討した。

結果および考察

結膜上皮中の好酸球数および好中球数は、春季カタルやアトピー性角結膜炎などの角膜上皮障害を有する重症なアレルギー性眼疾患において、角膜上皮障害を伴わないものに比べ有意に増加していた。また、アトピー性角結膜炎において、角膜潰瘍群では、点状表層角膜症群に比べ好酸球の増加がみられ、なかでも EG2陽性の活性化好酸球の増加がみとめられた。また、角膜潰瘍群と点状表層角膜症群で結膜上皮内の IL-8 濃度の増加と好中球数および好酸球数の増加が相関を示した。また、両群においてエオタキシン濃度の増加にともない好酸球数も増加した。しかし、RANTES、MCP-1 は好中球数、好酸球数とも関連がみられなかった。

結膜の炎症性疾患では、気道粘膜に比べ好中球が反応することが特徴である。アレルギー性結膜炎においても、実際、好中球数の増加はしばしばみとめられる。一方、好酸球は I 型アレルギー反応によって結膜上皮に出現してくる炎症細胞であり、結膜局所においては好中球に比べ量的な変動が少ない。今回の結果から、角膜障害が重症なほど結膜上皮内の炎症細胞数が増加することがあきらかとなった。また、アトピー性角結膜炎では角膜障害の程度と活性化好酸球数の増加に關連があることから、角膜上皮障害の重症化には活性化好酸球の關与が考えられる。また、IL-8 は好中球に対するケモカインであるが、活性化好酸球の遊走にも關与することから、結膜上皮内の IL-8 濃度の増加は好中球のみならず活性化好酸球の結膜局所への遊走を介した角膜障害の重症化への關連が推測される。

3) 重症アレルギー性眼疾患における結膜局所でのケモカイン mRNA の免疫組織学的検討

はじめに

角膜障害を伴う重症型アレルギー性眼疾患において、角膜障害の程度と好酸球数および好酸球の浸潤に關与するケモカインであるエオタキシン濃度が相関することがあきらかとなったが、眼局所におけるエオタキシンの産生や制御については不明な点が多い。そこで、結膜組織におけるケモカインの発現を検討するために、角膜潰瘍を伴う春季カタルおよびアトピー性角結膜炎患者の結膜組織を採取し、RT-PCR 法をもちいてエオタキシンの発現について検討した。

方法

春季カタル2例、アトピー性角結膜炎3例、通年性アレルギー性結膜炎2例を対象とした。いずれの症例もブラッシュサイトロジーにて結膜上皮内に好酸球の存在が確認され、また、血清学的検査(RAST 法)により、ハウスダスト、ダニが陽性のものである。春季カタルの2例は、上眼瞼結膜に石垣状乳頭増殖がみとめられ、角膜にはシールド潰瘍を伴っている。アトピー性角結膜炎の3例はいずれもアトピー性眼瞼炎を伴っており、そのうち2例は上眼瞼結膜に癬痕を伴う増殖性変化をみとめ、1例は結膜の増殖性変化は著明ではないが、3例とも角膜には、点状表層角膜症、角膜血管侵入と混濁、結膜の角膜内への侵入をみとめる。通年性アレルギー性結膜炎の2例は、軽度の乳頭をみとめるのみで角膜上皮障害は伴っていない。

春季カタル患者からは治療のために切除された組織を用いた。また、アトピー性角結膜炎および通年性アレルギー性結膜炎患者においては、ブラッシュサイトロジーにて採取された細胞を用いた。すなわち、眼科用サイトブラシを用いて、上眼瞼結膜を擦過し PBS 500 マイクロリットル内でブラシを攪拌し、検体を採取した。RT-PCR(reverse-transcripts polymerase chain reaction)法を用いエオタキシン mRNA の発現を検討した。採取された検体から AGPC 法により RNA の抽出をおこなった。ランダムプライマーを開始点プライマーとし逆転写酵素を用い cDNA の作製をおこない、95度9分間加熱したのち、これに目的とするサイトカインのプライマーと Taq ポリメラーゼを加え、94度30秒、56度30秒、72度2分間30サイクル PCR をおこなった。PCR 産物を精製した後、1.7%アガロースゲルで電気泳動し、エチジウムブロマイドと反応させ紫外線照射下で DNA のバンドを確認しポラロイドフィルムに撮影した。

結果および考察

春季カタルの結膜生検組織からは、2例ともエオタキシンの発現がみとめられたが、アトピー性角結膜炎および通年性アレルギー性結膜炎の結膜上皮組織からは、エオタキシンの発現はみとめられなかった。

角膜潰瘍を伴う春季カタルの結膜組織内におけるエオタキシンの発現の上昇は、

結膜下血管から結膜組織へ浸潤した好酸球を結膜上皮側、そして涙液中へと遊走させるものと推測された。今回の検体は治療目的で採取されたものであったことから、検体量にも限界があり、組織の成分を分離しての検索は不可能であった。従って今回の結果からは、結膜組織内のどの細胞がエオタキシンの産生に関与しているのかは、明らかにできなかった。しかし、皮膚の皮下組織の線維芽細胞には、エオタキシンの mRNA の発現がみとめられることから、結膜下組織においても線維芽細胞の関与が推測される。一方、ブラッシュサイトロジーで採取される組織は、結膜上皮層のみであり、涙液中には好酸球およびエオタキシン蛋白の増加がみとめられた角膜潰瘍を伴うアトピー性角結膜炎においても、エオタキシンの mRNA の発現がみられなかったことを考え合わせると、結膜上皮細胞はエオタキシンの産生細胞にはなっていない可能性が考えられる。これらをあきらかにするために、アトピー性角結膜炎患者の結膜組織におけるエオタキシンの発現の検討に加え、今後は結膜上皮細胞、線維芽細胞の培養細胞を用いてエオタキシンの産生および制御について検討する予定である。

4) 点眼誘発試験による結膜局所での炎症細胞とケモカイン蛋白の発現

はじめに

眼誘発試験は、アレルギー性結膜炎患者の無症状期に一定濃度のアレルゲンを点眼し、結膜局所にI型アレルギー反応を再現する方法で、スギ花粉症などの季節性アレルギー性結膜炎患者では、花粉の非飛散期に希釈したスギ抗原を点眼する眼誘発試験によってアレルギー性結膜炎の病態を再現することが可能である。今回、アレルギー性結膜炎における好酸球とケモカインの関連を検討するために、既往歴および血清学的検査から診断されたアレルギー性結膜炎患者に眼誘発試験をおこない、涙液中の炎症細胞およびケモカインの推移を検討した。

方法

毎年2月中旬から4月にかけて、眼搔痒感、充血などのアレルギー性結膜炎の症状を有し、血清学的検査(RAST法)によりスギ抗原特異的IgE抗体が陽性であり、無症状期のスギ花粉性アレルギー性結膜炎患者10例を対象とした。スギ花粉の非飛散期にあたる10月から12月に、「持続的な眼のかゆみ」が出現す濃度のスギ抗原エキスを点眼し、眼誘発10分後、12時間後の結膜擦過および涙液採取を施行し、好酸球数およびエオタキシン濃度を測定した。眼誘発に用いたスギ抗原エキスは、診断用アレルゲンスクラッチエキス「トリイ」スギ花粉(20倍液)にPBSを加え透析後、PBSで順次希釈し、元のエキスの50倍、100倍、200倍、400倍に調整した。低濃度のスギ花粉エキスから点眼を開始し、15分以内に症状が出現しなければ、順次濃度をあげ、「持続的な眼のかゆみ」が出現する濃度を用いた。

右眼からマイクロピペットを用い外眼角に貯留した涙液を採取し、ELISA法にてエオタキシンを測定した。左眼はブラッシュサイトロジーにより上眼瞼結膜を擦過し、スメアを作製し、ハンセル染色を用いて好酸球を染色した。

結果および考察

至適濃度のスギ抗原エキスによる眼誘発試験により、全例10分後に眼搔痒感、充血が出現した。これらの所見は、眼誘発20分以内にほぼ消失し、12時間後に症状があらたに出現したものはなかった。涙液中の好酸球は眼誘発試験10分後には6例にみとめられた。このうち2例では、涙液中のエオタキシンの存在が確認されたが、好酸球やエオタキシンの存在と臨床所見の重症度には関連がなかった。

眼誘発テストにより、角膜障害をともしないアレルギー性眼疾患である季節性アレルギー性結膜炎の臨床所見の再現が可能であった。季節性アレルギー性結膜炎では、涙液中の好酸球の出現率は、春季カタル、アトピー性角結膜炎に比べ低いことを日常臨床の場で経験するが、今回の結果から、I型アレルギー反応の即時相を主体とする季節性アレルギー性結膜炎においては、重症型のアレルギー性眼疾患に比べ局所に出現するエオタキシン濃度も低いため、好酸球の遊走も少ないものと考え

た。アレルギー性眼疾患の即時相と遅発相における病態は、気管支喘息における病態ほどは明らかになっていないため、今後は、眼誘発試験を応用し遅発相を安全に誘発できる試験法の開発により、春季カタル、アトピー性角結膜炎などの重症型の病態の解明をおこなっていく予定である。