

眼アレルギー疾患における炎症細胞の集積にかかわる
免疫学的、分子生物学的研究

研究課題番号 (07671937)

平成7年～8年度
科学研究費補助金(基盤研究C)

研究成果報告書

平成9年3月

研究代表者 高村悦子
(東京女子医科大学 医学部 講師)



平成7年～平成8年度科学研究費補助金（基盤研究C）研究成果報告書

平成9年3月

1. 課題番号 07671937

2. 研究課題 眼アレルギー疾患における炎症細胞の集積にかかわる免疫学的、分子生物学的研究

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 講師）

4. 研究経費

平成7年度 1,100千円

平成8年度 800千円

計1,900千円

5. はしがき

眼アレルギー疾患はスギ花粉症の増加、アトピー性皮膚炎および喘息の増悪化とともに、眼科領域においても重症化、遷延化が問題となってきた。ダニ、花粉などをアレルギーとする即時型アレルギーによる角結膜の炎症を主体とする眼アレルギー疾患には、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。これらの結膜炎では、正常眼ではみとめられない、結膜上皮および涙液中への好酸球の出現を特徴とする。

アレルギー性結膜炎において、結膜局所への好酸球の浸潤は、喘息と同様、疾患の重症化に重要な役割を演じている可能性が示唆されている。しかし、結膜局所への好酸球を始めとする炎症細胞の浸潤過程においてサイトカイン、接着分子の役割に関する免疫学的、分子生物学的アプローチによる研究は多くはおこなわれていない。

本研究では、眼アレルギー疾患の慢性炎症の病態を解明する目的で、1) 眼アレルギー疾患の臨床所見、重症度に対応した浸潤細胞の分類および定量的評価、2) 結膜局所におけるサイトカインの発現を涙液、結膜上皮などの生体材料を用いて免疫学的、分子生物学的に検討した。

6. 研究発表

1) 原著論文、学会誌等発表

1. Chihara J, Yamada H, Takamura E, Yoshino K and Nakamjima S:
Possible presence of RANTES in tears of patients with allergic conjunctivitis.
International Archives of Allergy and Immunology 106:428, 1995
2. Takamura E, Yoshino K, Yamagami H and Chihara J.
RANTES presence in the tears of patients with allergic conjunctivitis.
Investigative Ophthalmology & Visual Science, 36 : 839, 1995
3. Nomura K, Takamura E, Murata M, Fukagawa K and Uechi K:
Quantitative evaluation of inflammatory cells in seasonal allergic conjunctivitis.
Ophthalmologica 211, 1-3, 1996
4. 吉野圭子、坂野菊子、高村悦子
アレルギー性結膜炎の診断におけるハウスダスト 6 (House dust Japan) の有用性。
アレルギー : 44 : 422, 1995
5. 高村悦子
アレルギー性結膜炎とステロイド
アレルギーの領域 2 : 355-359, 1995
6. 高村悦子
アレルギー性結膜炎と感染
アレルギーの領域 2 : 893-896, 1995
7. 高村悦子、雑賀寿和、藤島浩、湯浅武之助
アレルギー性結膜炎とコンタクトレンズ。
日コレ誌 37 : 248-253, 1995

2) 学会発表

1. 吉野圭子、坂野菊子、高村悦子
アレルギー性結膜炎の診断におけるハウスダスト 6 (House dust Japan)の有用性。
第19回角膜カンファランス・1995年2月9-11日、京都
2. 高村悦子、吉野圭子、茆原順一
アレルギー性結膜炎における涙液中RANTES の検討
第99回日本眼科学会・1995年4月20日-22日、名古屋
3. 吉野圭子、坂野菊子、高村悦子
アレルギー性結膜炎の診断におけるハウスダスト 6 (House dust Japan) の有用性。
第7回日本アレルギー学会春季臨床大会1995年5月24日-26日、岡山
4. 高村悦子
シンポジウムV アレルギー性結膜炎の基礎と臨床
1. アレルギー性結膜炎の臨床像。
第49回日本臨床眼科学会1995年11月10日-12日、宇都宮
5. 吉野圭子、高村悦子、坂野菊子、村田真由美
アレルギー性結膜炎の涙液IgE
第49回日本臨床眼科学会1995年11月10日-12日、宇都宮
6. Takamura E, Nomura K, Yamagami H, Shinozaki K
Possible presence of RANTES in the tears of patients with allergic conjunctivitis
IVth International Congress of the International Society of Dacryology. June 9-12, 1996 Stockholm, Sweden
7. 野村圭子、高村悦子、坂野菊子
アトピー性皮膚炎患者の角結膜所見
第20回角膜カンファランス、1996年2月16日-18日、東京

3) 総説、著書等出版物

1. 高村悦子

アレルギー性結膜炎と接着分子. 接着分子とアレルギー

荏原順一 宮坂昌之 編集. メディカルレビュー社 p. 240-246、1996

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炎症細胞の定量的解析
- 2) アレルギー性結膜炎患者における涙液中サイトカイン蛋白の発現
- 3) 春季カタル患者における結膜組織中RANTES の免疫組織学的検討
- 4) アレルギー性結膜炎患者における結膜局所でのサイトカインmRNA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し、関連する発表論文を記載する。

1) アレルギー性結膜炎の重症度に関連した炎症細胞の定量的解析

ブラッシュサイトロジーにより結膜上皮内の細胞を採取し、採取された細胞300個あたりの炎症細胞の比率を比較した。アレルギー性結膜炎では、瞼結膜上皮内に好酸球 $0.4 \pm 1.8\%$ 、肥満細胞 $0.03 \pm 0.16\%$ 、好中球 $1.6 \pm 3.4\%$ 、リンパ球 $1.7 \pm 4.6\%$ をみとめた。アレルギー性結膜炎の浸潤する炎症細胞として特徴とされる好酸球および肥満細胞の細胞数は低く、定量的評価には適していなかったが、角結膜上皮障害を有する重症型のアレルギー性結膜炎である春季カタルでは好酸球の出現率は高かった。

アレルギー性結膜炎においては、結膜炎の重症度に伴い結膜上皮内の好中球の比率が高くなる傾向がみられた。

また、血清学的検査にて、抗スギIgE抗体陽性のアレルギー性結膜炎患者のうち、スギ花粉にのみ陽性をしめす54例（1群）とスギ以外にハウスダストまたはダニにも陽性をしめす38例（2群）について、炎症細胞の比率を検討した。採取された500個の細胞における好酸球の比率は、両群とも $0.3 \pm 0.1\%$ と差を認めなかったが、好中球は2群および1群で $7.8 \pm 2.0\%$ および $2.3 \pm 0.6\%$ 、リンパ球は、 $2.9 \pm 0.7\%$ および $1.2 \pm 0.2\%$ と、好中球とリンパ球については、2群は1群に比べ有意に高値をしめした。これらの結膜上皮および涙液中への炎症細胞出現にはアレルゲンの種類および暴露期間の関与が考えられた。

2) アレルギー性結膜炎患者における涙液中サイトカイン蛋白の発現

アレルギー性結膜炎の結膜組織、涙液には好酸球の浸潤およびMBP,ECPなどの好酸球顆粒蛋白が存在する。これらは、病態の増悪、特に角結膜上皮傷害への影響が考えられている。最近、血管から粘膜局所への好酸球、単球、Tリンパ球などの炎症細胞の浸潤には血小板第4因子スーパーファミリーに属するケモカインであるRANTESが重要な役割を演じている可能性が示唆されつつある。そこで今回は、アレルギー性結膜炎患者の涙液中にRANTESが存在するか否かを検討した。

掻痒感、充血などの自覚症状、結膜乳頭増殖、眼分泌物内好酸球、血清中アレルギー特異的抗IgE抗体からアレルギー性結膜炎と診断した10例を対象とした。このうち春季カタル4例、通年性アレルギー性結膜炎5例、季節性アレルギー性結膜炎1例であった。眼科的、全身的にアレルギー性疾患を認めない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下結膜嚢内に貯留している涙液を採取しELISA法によりRANTESを測定した。

量的な問題から希釈率を設定したため、限界値を78.0 pg/mlとした場合、アレルギー性結膜炎全例に涙液中RANTESが陽性を示した（陽性症例平均値 230.57 ± 98.43 pg/ml）。正常コントロールは全例陰性であった。

アレルギー性結膜炎4例は、症治療により症状が消失した時期にも涙液を採取することが可能であった。これらの症例では、症状消失時には、涙液中RANTESは陰性となった。また、角膜潰瘍を有する春季カタルでは、角膜所見を有さない春季カタル以外のアレルギー性結膜炎に比べ、高値を示す傾向があった。

一方、IL-4は、春季カタルに陽性を認めたが、他のアレルギー性結膜炎では、陰性であり、今回の検討からは、アレルギー性結膜炎の病態との関連は、あきらかにはならなかった。

アレルギー性結膜炎において結膜局所への好酸球、Tリンパ球の浸潤にRANTESが関与している可能性が示唆された。

3) 春季カタル患者における結膜組織中RANTES の免疫組織学的検討

春季カタル患者の上眼瞼結膜の石垣状乳頭部の結膜組織を採取し、アセトン固定後、抗ヒトRANTESモノクローナル抗体（マウス）を一次抗体としインキュベートし、ビオチン化抗マウスIgG抗体（ウサギ）を二次抗体としてストレプトアビジンと反応させ、デアミノベンジジンで染色し検討した。

結膜上皮細胞のうち基底細胞およびその直上の中間細胞にRANTESの陽性所見を認めた。一方、手術時に得られた正常結膜に同様の反応を施行したが、RANTESの陽性所見は得られなかった。

これらの結果から、結膜上皮がRANTESの発現に関与していることが示唆された。

4) アレルギー性結膜炎患者における結膜局所でのサイトカインmRNAの発現

好酸球の浸潤に関与するケモカインRANTESの由来を検討する目的で、アレルギー性結膜炎患者の結膜上皮をブラッシュサイトロジーにて採取し、RT-PCR法をもちいて、RANTESおよび炎症性サイトカインについて検討した。

春季カタル3例、季節性アレルギー性結膜炎3例、通年性アレルギー性結膜炎2例を対象とした。アレルギー性結膜炎の診断は、ブラッシュサイトロジーにより結膜上皮内に好酸球が存在することによりおこなった。春季カタルは、上眼瞼結膜に石垣状乳頭増殖がみとめられ、3例とも角膜びらんをみとめた。季節性アレルギー性結膜炎の3例は、血清学的検査（RAST法）によりスギ花粉をアレルゲンとしており、通年性アレルギー性結膜炎の2例は、ハウスダストおよびダニが陽性のものである。

眼科用サイトブラシを用いて上眼瞼結膜を擦過しPBS500マイクロリットル内でブラシを攪拌、検体を採取した。RT-PCR（reverse-transcripts polymerase chain reaction）法を用いサイトカイン（RANTES, IL-4, TNF- α , IFN γ ）の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10分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、95度C30秒、65度C30秒、72度C2分間30サイクルPCRをおこなった。PCR産物を精製したのち1.7%の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。

春季カタルでは、結膜上皮内RANTESの発現が3例中2例に季節性アレルギー性結膜炎では3例中1例みとめられたが、通年性アレルギー性結膜炎では認められなかった。

春季カタルのうちRANTESの発現を認めた2例では、炎症性サイトカインであるTNF- α およびIFN- γ の発現もみとめられた。季節性アレルギー性結膜炎で、RANTESの発現をみとめた1例では、TNF- α の発現はみとめたが、IFN- γ の発現はみとめられなかった。

IL-4は、春季カタル3例、季節性アレルギー性結膜炎2例、通年性アレルギー性結膜炎1例に発現をみとめた。

これらの結果から、角膜上皮障害を有する重症の春季カタルの結膜上皮内における炎症性サイトカインおよびケモカインの発現の上昇は、アレルギー性炎症の重症化に関与していることが推測された。今回の方法では、サイトカインを産生する細胞については明らかにすることができなかったが、今後は培養細胞を用いた系で上皮細胞の産生するサイトカインおよび炎症性サイトカインとの関連などについて検討を加える予定である。