

眼表面（オクラーサーフェス）の慢性炎症の病態に関する
免疫学的・分子生物学的研究

研究課題番号 （05671480）

平成 5 年～平成 6 年度
科学研究費補助金（一般研究C）

研究成果報告書

平成 7 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6
1C
Tak

平成5年～平成6年度科学研究費補助金（一般研究C）研究成果報告書

平成7年3月

1. 課題番号 05671480

2. 研究課題 眼表面（オクラーサーフェス）の慢性炎症の病態に
 関する免疫学的・分子生物学的研究

3. 研究組織

研究代表者 高村悦子（東京女子医科大学講師）

4. 研究経費

平成5年度 1、600千円

平成6年度 500千円

計 2、100千円

5. はしがき

眼球表面（オクラーサーフェス）は、角膜と結膜という異なる構造を有する組織とその表面を被う涙液からなる。これは直接外界と接するため、病原体、アレルゲンを始めとする環境要因の影響を眼組織の中でも最もうけやすい。そのため種々の防御機構をはたらかせまた相互作用を及ぼしながら恒常性を維持している。最近、アレルギー性結膜炎、ドライアイ、コンタクトレンズ障害といったオクラーサーフェス疾患が増加している。原因はそれぞれ異なっているが、これらの疾患の慢性化、重症化にはオクラーサーフェスにおける炎症の関与が考えられる。最近、自己免疫疾患、アレルギー性疾患など全身の炎症性疾患においては分子生物学的手法を用いた病態解明へのアプローチが試みられている。しかし、眼局所においては炎症細胞の浸潤のメカニズムはまだ不明の点が多い。

本研究では、オクラーサーフェスにおける免疫機構の特殊性を明らかにするとともに、オクラーサーフェス疾患の慢性炎症の病態を解明する目的で、なかでも角結膜の難治性炎症をおこす自己免疫疾患のシェーグレン症候群、アレルギー性疾患の春季カタルを対象に、1) 慢性結膜炎の臨床所見、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、結膜上皮細胞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 and Yoshino K.
Possible presence of RANTES in the tear of patients with allergic conjunctivitis.
International Archives of Allergy and Immunology, 1995, submitted
2. Takamura E, Takano H, Yoshino K, Negoro K, Tsubota K and Kobayashi T
Quantitative cellular evaluation of conjunctival squamous metaplasia in the dry eye patient.
Lacrimal Gland, Tear Film, and Dry Eye Syndromes. (ed. Sullivan D.A.), Plenum Press, New York, 1994, p535-538
3. Takamura E, Takano H, Kazumi S, Tsubota K and Kobayashi T.
The effect of vitamin A on squamous metaplasia with Sjogren's syndrome.
Sjogren's syndrome - State of the Art, The Proceedings of the Fourth International Symposium. (ed. Homma S, Sugai S, Tojo T, Miyasaka N and Akizuki M.)
Kugler Publications, Amsterdam/New York, 1994, p 253-256
4. Takamura E, Takano H, Sakano K, Shinozaki K, Yoshino K, Watanabe M, Fujishima H, Shinozaki N and Tsubota K.
Expression of IL-2 and IL-6 in the conjunctiva of Sjogren's syndrome.
Investigative Ophthalmology & Visual Science, 35 (4) :1793, 1994
5. Yoshino K, Takamura E, Fukagawa K and Uechi K.
The quantitative cellular evaluation of inflammatory cells in seasonal allergic conjunctivitis.
Investigative Ophthalmology & Visual Science, 35 (4) :1672, 1994
6. Fukagawa K, Takamura E, Uechi K, Kyuma S, Tsubota K, Saito I, Iikura Y, Oguchi Y.

- The effect of pre-treatment for seasonal allergic conjunctivitis.
Investigative Ophthalmology & Visual Science, 35 (4) :1292, 1994
7. 高村悦子、吉野圭子、荏原順一、山下哲次、栗本文彦
アレルギー性結膜炎における涙液中RANTESの存在。
アレルギー．43：965、1994
 8. 高村悦子、吉野圭子、坂野菊子、深川和己、飯倉洋治
スギ花粉症に対する予防的点眼治療の有効性。
アレルギー．43：403、1994
 9. 吉野圭子、高村悦子、坂野菊子、渡辺真由美
季節性と通年性アレルギー性結膜炎における炎症細胞の比較。
アレルギー．43：366、1994
 10. 高村悦子、坂野菊子、篠崎和美、吉野圭子、高野博子、渡辺真由美、
篠崎尚史、坪田一男
シェーグレン症候群における結膜上皮内インターロイキン2 および
インターロイキン6 の発現。
日本眼科学会雑誌．98: 93, 1994
 11. 高村悦子、高野博子、篠崎和美、吉野圭子
ドライアイに対する防腐剤無添加人工涙液の有用性。
日本コンタクトレンズ学会誌 35 (4) : 312-316, 1993
 12. 深川和己、斉藤博久、坪田一男、高村悦子、東範行、飯倉洋治、小
口芳久
結膜上皮内トリプターゼ濃度が低値を示すアレルギー性結膜炎。
あたらしい眼科 10(8) : 1387-1390,1993
 13. Takamura E, Takano H, Yoshino K, Negoro K, Tsubota K .
0.1% Pemirolast potassium decreased the number of
inflammatory cells in allergic conjunctivitis.
Investigative Ophthalmology & Visual Science. 34/4 .p.853 . 1993
 14. 高村悦子、高野博子、吉野圭子、篠崎和美、坪田一男、小林忠男
シェーグレン症候群における角化結膜上皮細胞の定量的評価
日本眼科学会雑誌．97: 272, 1993

2) 学会発表

1. 高村悦子、吉野圭子、千原順一、山下哲次、栗本文彦
アレルギー性結膜炎における涙液中RANTESの存在。
第44回日本アレルギー学会、1994年10月26-18日、東京
2. 吉野圭子、高村悦子、坂野菊子、渡辺真由美
スギ花粉症における抗アレルギー点眼による結膜上皮内ヒスタミン
濃度の比較。
第18回角膜カンファランス、1994年2月18-20日、東京
3. Fukagawa K, Takamura E
January - 1994, Hawaii
4. 高村悦子、吉野圭子、坂野菊子、深川和己、飯倉洋治
スギ花粉症に対する予防的點眼治療の有効性。
第6回日本アレルギー学会春季臨床大会、1994年4月14-16日、熊本
5. 吉野圭子、高村悦子、坂野菊子、渡辺真由美
季節性と通年性アレルギー性結膜炎における炎症細胞の比較。
第6回日本アレルギー学会春季臨床大会、1994年4月14-16日、熊本
6. 高村悦子、坂野菊子、篠崎和美、吉野圭子、高野博子、渡辺真由美、
篠崎尚史、坪田一男
シェーグレン症候群における結膜上皮内インターロイキン2および
インターロイキン6の発現。
第98回日本眼科学会総会、1994年4月21-22日、横浜
7. 吉野圭子、盛林孝恵、坂野菊子、高村悦子
アレルギー性結膜炎類似所見を呈するドライアイ1型アレルギーを
涙液動態の関与。
第17回角膜カンファランス、1993年1月22-24日、和歌山
8. 深川和己、小口芳久、坪田一男、高村悦子、東範行、斉藤博久、飯
倉洋治
結膜上皮内トリプターゼ濃度が低値を示すアレルギー性結膜炎。
第17回角膜カンファランス、1993年1月22-24日、和歌山
9. E. Takamura, H. Takano, K. Yoshino, K. Negoro, K Tsubota.
0.1% Pemirolast potassium decreased the number of inflammatory

cells in allergic conjunctivitis.

The association for research in vision and ophthalmology, May 2 -7 ,
1993, Florida

10. 小林忠男、植田正己、西野俊博、林幸子、高村悦子、坪田一男、石塚悟、二上伸彦

ThinPrepを応用した結膜細胞診の試み。

第34回日本臨床細胞学会、1993年5月26－27日、仙台

11. 高村悦子、高野博子、吉野圭子、篠崎和美、坪田一男、小林忠男
シェーグレン症候群における角化結膜上皮細胞の定量的評価

第97回日本眼科学会、1993年6月17－19日、札幌

12. Takamura E, Takano H, Shinozaki K, Yoshino K, Tsubota K
The effect of vitamin A on squamous metaplasia with Sjogren's syndrome.

4 th International symposium on Sjogren's syndrome, August
11-13, 1993, Tokyo.

13. 武藤和子、深川和巳、仁井誠治、久間修平、吉野圭子、高村悦子、坪田一男

スギ花粉症に対する抗アレルギー点眼薬の季節前投与の効果

第47回日本臨床眼科学会、1993年10月15－17日、東京

14. 吉野圭子、高村悦子、坂野菊子、渡辺真由美、深川和巳、武藤和子、仁井誠治

スギ花粉症に対する抗アレルギー点眼薬の季節前投与による予防効果

第47回日本臨床眼科学会、1993年10月15－17日、東京

15. Kobayashi TK, Ueda M, Nishino T, Hayashi S, Takamura E & Tsubota K.: Conjunctival brush cytology using thinprep processor : an evaluation of dry eye syndrome.

17th world congress of anatomic and clinical pathology, October
5-9, 1993, Acapulco.

3) 総説、著書等出版物

1. 高村悦子

花粉症、眼病変を読むー全身疾患と眼ー、
田野保雄、澤充、坪田一 男編、診断と治療社、p.165-167, 1993

2. 高村悦子

ドライアイとアレルギー性結膜炎、Ocular Surfaceの診断と治療、
小口芳久監修、坪田一男編集、メディカル葵出版、p.75-82、1993

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) ドライアイ、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および臨床応用、
- 2) シェーグレン症候群における結膜局所でのサイトカインmRNAの発現、
- 3) アレルギー性結膜炎、ドライアイにおけるサイトカイン蛋白の発現、

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およびドライアイにおいて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。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。

春季カタル以外のアレルギー性結膜炎では、好酸球および肥満細胞の平均出現頻度は低く、定量的評価には適していないと考え、抗アレルギー剤点眼薬などの治療薬の評価には、出現頻度が高く、結膜炎の重症度に伴い変化する好中球を用いて検討を行うことにした。

アレルギー性結膜炎を主症状とするスギ花粉症患者に対し、抗アレルギー点眼薬（フマル酸ケトチフェン）を花粉飛散期2週間前から開始した群（季節前投与群）では、花粉飛散期に投与を開始した群に比べ、掻痒感、充血、流涙、眼脂などの自覚症状の発現が有意に軽減し、それとともに、季節前投与群では花粉飛散期にも結膜上皮内の好中球の出現頻度が低く、スギ花粉症に対し抗アレルギー点眼薬の季節前予防的投与の有効性を示した。

2. PCR法を用いたサイトカイン発現の検索

眼局所における炎症細胞浸潤のメカニズムを解明する目的でブラッシュサイトロロジーにより結膜から採取した細胞に対してRT-PCR法を用いてサイトカインの発現を検討した。

シェーグレン症候群では涙腺へのリンパ球の浸潤により涙腺が破壊された結果、ドライアイを生じると考えられてきた。しかし、涙液分泌減少の程度が同等でも、シェーグレン症候群ではそれ以外のドライアイに比べ角結膜上皮障害が重篤でありリンパ球浸潤の程度は瞼結膜と唾液腺で相関があることなどから角結膜上皮が直接に炎症反応の場となっている可能性がある。そこで、シェーグレン症候群の結膜上皮での炎症性サイトカインmRNAの発現をSS以外のドライアイと比較した。

原発性シェーグレン症候群9例と、シェーグレン症候群以外のドライアイ5例を対象とした。シェーグレン症候群は、ドライアイ、ドライマウスを主症状とし厚生省シェーグレン病研究班の診断基準に加え、血清学的検査から高ガンマーグロブリン血症があり、抗SS-A抗体、抗SS-B抗体抗核抗体、リウマチ因子などの自己抗体が陽性のものである。また、7例は口唇腺の生検で著明なリンパ球の浸潤をみとめた。また、今回対象としたドライアイはシルマーテスト変法1法で2mm以下であり、ドライアイ以外の乾燥症状を伴わないものとした。正常コントロール7例は全員女性であり、眼科的異常所見はない。

眼科用サイトブラシを用いて下眼瞼瞼結膜を擦過し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 (IL-1, IL-2, IL-4, IL-6, 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、94度C45秒、60度C45秒、72度C2分間40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。

シェーグレン症候群では結膜上皮内IL-2 mRNAの発現が9例中5例 (

56%)とシェーグレン症候群以外のドライアイ5例中1例(20%)に比べ高率に認められた。また、IL-6のmRNAの発現はシェーグレン症候群では6例(67%)に認められたがシェーグレン症候群以外のドライアイでは認められなかった。

IFN γ mRNAの発現はシェーグレン症候群では9例中7例(78%)であったがシェーグレン症候群以外のドライアイで5例中2例(40%)に認めた。

コントロールではほとんどのサイトカインの発現は見られなかったが、IL-4のみ7例中3例(43%)にみとめられ、現在これらの症例についてアレルギー疾患の有無を再検中ある。

今回の検討でシェーグレン症候群の結膜局所(上皮)にIL-1 β , IL-2, IL-6, IFN γ を中心とするサイトカインネットワークの存在が示唆された。

今までにもシェーグレン症候群患者の唾液腺組織および涙腺におけるサイトカインの検索は免疫組織学的手法や分子生物学的手法を用いてIL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, IFN γ , などが検出されており結膜においても腺組織と同様なサイトカインネットワークの存在が推測された。

最近、ヘルパーT細胞はその産生するサイトカインの種類によりIL-2, IFN γ を産生するTh1とIL-4, IL-5を産生Th2にわけられ局所での炎症の誘導にかかわることがわかってきた。シェーグレン症候群ではFoxらが免疫組織学的手法により患者の唾液腺浸潤リンパ球がIL-2を産生することを報告している。

今回、シェーグレン症候群の結膜上皮においてIL-2およびIFN γ が発現しIL-4がみとめられなかったことは、結膜上皮に浸潤しているリンパ球はhelper T細胞のなかでもTh1が優位である可能性が考えられ、結膜局所がターゲットとなっていることが示唆された。また、ドライアイ、ドライマウスともに重症で、経過のながいシェーグレン症候群の完成像を呈する症例ではIL-6をはじめとし多彩なサイトカインの発現がみられたが、眼乾燥症状を自覚してから経過の短い症例ではIFN γ のみ発現しIL-6は認められておらず、これらサイトカインの発現も病気の進行との関連が推測された。今後は疾患の経過とサイトカインの発現の関連をみていく予定である。

結膜上皮でのサイトカイン発現のメカニズムは明かではないが、これらのサイトカインによって血管内皮や細胞の接着分子の発現を増強し結

膜上皮へのリンパ球の浸潤に関与していると考えた。

これらのサイトカインを産生する細胞については今回の方法からは明らかにすることは出来なかったが、今後は、培養結膜上皮を用いた系で上皮細胞の産生するサイトカインについて検討を加える予定である。

3. ELISA法を用いたサイトカイン発現の検索

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。そこで本研究では、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、血清中アレルゲン特異的抗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10例中7例(70%)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。

ドライアイおよびシェーグレン症候群患者においてブラッシュサイトロジーにより得られた結膜擦過物および涙液を用いて、サイトカインの発現を検討したが、今のところ疾患の特殊性や重症度を反映する結果は得られていない。検体が微量であることが関連していると考えられるが、今後は、検体採取法を工夫して再度検討していく予定である。