

結膜上皮に発現する dectin-1 の眼表面炎症への関与
に関する研究

日本大学大学院医学研究科博士課程
外科系眼科学専攻

吉田 圭

2014 年

指導教員 山崎 芳夫

結膜上皮に発現する dectin-1 の眼表面炎症への関与
に関する研究

日本大学大学院医学研究科博士課程
外科系眼科学専攻

吉田 圭

2014 年

指導教員 山崎 芳夫

目次

ア) 概要	1 頁
イ) 緒言	5 頁
イ - 1 眼表面 (オキュラーサーフェス) の構造と特徴	
イ - 2 眼表面の免疫	
イ - 2 - 1 眼表面の免疫学的防御機構	
イ - 2 - 2 眼表面と自然免疫	
イ - 3 Dectin-1	
イ - 4 BAFF	
イ - 5 β -D-グルカン (BDG) / dectin-1 系の臨床応用	
イ - 6 眼表面の検査法	
イ - 7 Balb/c マウス	
イ - 8 春季カタル	
イ - 9 目的	
ウ) 対象・方法 エ) 結果 オ) 考察	
研究 1 結膜上皮細胞における dectin-1 および BAFF 発現の検討	
.....	17 頁
研究 2 カードラン点眼で誘導されるマウス結膜の病態生理学的変化の検討	
.....	28 頁
カ) まとめ	36 頁

謝辞	37 頁
表	38 頁
図	40 頁
図説	51 頁
引用文献	55 頁
研究業績目録	64 頁

ア) 概要

[目的]

結膜上皮細胞における dectin-1 と B-cell activating factor belonging to the tumor necrosis factor family (BAFF) 発現についての部位、疾患による相違の有無を明らかにする (研究 ①)、カードランの点眼投与によるマウス結膜組織の病態生理学的変化を明らかにする (研究 ②)。

[対象・方法]

研究①： 結膜上皮細胞における dectin-1 および BAFF 発現の検討

1. 結膜上皮細胞診による dectin-1 発現の検討

対象は、健常対照 (健常群) 12 例 12 眼、シェーグレン症候群 (シェーグレン群) 6 例 6 眼、春季カタル (春季カタル群) 10 例 10 眼である。impression cytology 法で採取した結膜上皮細胞において、蛍光抗体法による dectin-1 発現、real-time polymerase chain reaction (real-time PCR) 法による dectin-1 mRNA および BAFF mRNA 発現の検討を行った。

2. 培養結膜上皮細胞による dectin-1 および BAFF 発現の検討

培養結膜上皮細胞を OK-432 添加群 (添加濃度 : 0.02、0.1、0.5 KU/mL)、lipopolysaccharide (LPS) 添加群 (添加濃度 : 80、160、320 µg/mL) および無添加群の 7 群に分けて培養した後、細胞を回収して dectin-1 mRNA と BAFF mRNA 発現について real-time PCR を用いて検討した。

研究②: カードラン点眼で誘導されるマウス結膜の病態生理学的変化の検討

実験は 8 週齢 Balb/c マウスを、PBS を点眼した P 群 (15 匹)、低濃度カードラン (100µg/ml) を点眼した CL 群 (15 匹) および高濃度カードラン (10000µg/ml) を点眼した CH 群 (12 匹) に分けた。各群の角結膜組織を採取し、①免疫組織化学による GR-1 陽性細胞密度および CD68 陽性細胞密度の

検討、②レーザーマイクロダイセクション法と real-time polymerase chain reaction (real-time PCR) 法との併用による結膜組織中の Tumor necrosis factor alpha (TNF- α)、Interleukin-1 beta (IL-1 β)、Interleukin-18 (IL-18) m-RNA の発現を検討した。

[結果]

研究①

1. 結膜上皮細胞診による dectin-1 および BAFF 発現の検討

健常群における dectin-1 発現の部位別検討では、蛍光抗体法による dectin-1 発現および real-time PCR による dectin-1 mRNA 発現量いずれの方法でも部位差がみとめられなかった。疾患別での dectin-1 mRNA 発現量は、健常群 1.5 (0.1-4.0) [中央値 (レンジ)]、シェーグレン群 2.6 (1.1-4.8)、春季カタル群 3.6 (1.7-16.6) で、健常群と比較して春季カタル群は有意に高値を示した ($P < 0.01$, Kruskal-Wallis H-test)。BAFF mRNA 発現量も、健常群 2.8 (0.2-13.8) [中央値 (レンジ)]、シェーグレン群 6.3 (2.1-15.1)、春季カタル群 11.2 (3.5-70.8) であり、健常群と比較して春季カタル群は有意に高値を示した ($P < 0.01$, Kruskal-Wallis H-test)。また、全症例を対象にした dectin-1 mRNA 発現量と BAFF mRNA 発現量との間には、有意な相関関係がみられた ($r = 0.75$, $P < 0.001$, Spearman の順位相関係数)。春季カタル重症度別での dectin-1 mRNA 発現量は、軽症群 2.8 (1.7-3.8) [中央値 (レンジ)] と比較し中等症・重症群 9.2 (2.6-16.6) で有意に高値を示した (Mann-Whitney U-test, $P < 0.05$)。BAFF mRNA 発現量は、軽症群 4.3 (3.5-11.2) [中央値 (レンジ)] と比較し中等症・重症群 17.4 (9.1-70.8) で有意に高値を示した (Mann-Whitney U-test $P < 0.05$)。

2. 培養結膜上皮細胞による dectin-1 および BAFF 発現の検討

OK-432 刺激による培養結膜上皮細胞での dectin-1 mRNA 発現は、濃度依存的に発現が増加し (Kruskal-Wallis H-test, $P < 0.05$)、dectin-1 mRNA 発現量と BAFF mRNA 発現量との間に有意な相関関係がみられた ($r = 0.85$, $P < 0.005$, Spearman 順位相関係数)。

研究②

各群の GR-1 陽性細胞密度は、P 群 76.8 (43.7-114.5) 個/mm² [中央値 (レンジ)]、CL 群 103.3 (46.1-255.2) 個/mm²、CH 群 197.8 (148.0-226.1) 個/mm² であり、P 群に対して CH 群で有意に高かった (Steel-Dwass 法, $P < 0.01$)。各群の CD68 陽性細胞密度は、P 群 6.3 (4.8-8.1) 個/mm² [中央値 (レンジ)]、CL 群 37.2 (16.9-46.5) 個/mm²、CH 群 41.4 (22.4-64.5) 個/mm² であり、P 群に対して CL 群と CH 群のカードラン点眼群で有意に高かった (Steel-Dwass 法, $P < 0.01$)。各群の結膜組織中 TNF- α mRNA 発現量は、P 群 0.82 (0.41-1.61) [中央値 (レンジ)]、CL 群 1.45 (0.52-2.55)、CH 群 0.76 (0.27-1.67) と P 群、CH 群に対して CL 群で有意に高値を示した (Steel-Dwass 法, $P < 0.05$)。各群の結膜組織中 IL-1 β mRNA 発現量は P 群 1.45 (0.70-3.57) [中央値 (レンジ)]、CL 群 1.12 (0.43-3.32)、CH 群 3.19 (1.26-9.16) と P 群、CL 群に対して CH 群で有意に高値を示した (Steel-Dwass 法, $P < 0.01$)。各群の結膜組織中 IL-18 mRNA 発現量は P 群 1.01 (0.51-3.21) [中央値 (レンジ)]、CL 群 0.90 (0.54-2.28)、CH 群 1.13 (0.46-4.92) と P 群、CL 群、CH 群で差はなかった。

[結論]

結膜上皮細胞における dectin-1 発現が証明され、結膜上皮における dectin-1 および BAFF 発現は、春季カタルなどのアレルギー炎症の病態の重症化に関与している可能性が示唆された。カードラン点眼投与は、点眼濃度の相違により

結膜に惹起される炎症反応の病態が異なる。

イ)緒言

イ-1. 眼表面（オキュラーサーフェス）の構造と特徴

眼表面を形成する角膜、結膜および眼瞼は外胚葉由来の組織であり、それぞれが解剖学的、生理学的な特徴を持ち、相互に作用しながら眼表面の恒常性を維持している。眼表面の恒常性および角膜の透明性維持は視覚にとって重要な問題であるが、それを維持するためには、角膜、結膜、眼瞼に加えて涙液の存在も重要である。したがって、眼表面に発症する種々の疾患の病態を検討する場合、それぞれを別の部位としてとらえるのではなく、眼表面全体を一つの単位として考えることが提唱されて、オキュラーサーフェスと呼ばれている¹⁾(図1)。

角膜は成人で直径約 12mm、厚さが中央部で約 520 μ m、周辺部で約 700 μ m の無血管で透明な組織であり、上皮、Bowman 膜、実質、Descemet 膜、内皮の 5 層で構成される。

角膜上皮は 5~6 層の非角化型重層扁平上皮で、基底部より基底細胞、翼細胞および扁平細胞の 3 層に分かれ、細胞間隙には tight junction が形成され、微生物やアレルゲンとなる低分子物質の侵入を防御するバリアとして機能している²⁾。したがって、角膜の主な機能には、①強靱な膜としての眼球保護機能および②約 43D の凸レンズに相当する眼光学系としての機能があると考えられている (図 2)。

Bowman 膜は微細なコラーゲン線維からなる厚さ約 10 μ m の無細胞性の均質な膜であるが、その生理学的な作用は依然不明である。

角膜実質は角膜厚の約 90% を占め、角膜実質細胞と I 型、III 型、IV 型、VI 型コラーゲン³⁾⁻⁵⁾やプロテオグリカンなどの細胞外マトリックスとから構成されている。また、角膜の透明性は、直径 20~30nm の細かいコラーゲンが近接して等間隔 (中心間距離 62nm) に配列することにより維持されている⁶⁾。

Descemet 膜は主にIV型、VIII型コラーゲン⁷⁾⁸⁾からなる厚さ約 10 μ m で水晶体囊と共に人体の中で最も厚い基底膜の一つであり、加齢とともに肥厚する。Descemet 膜は比較的強靱な組織で、角膜の形状維持に重要な役割を果たしている。Descemet 膜が損傷を受けると、周囲の内皮細胞が新たな二次 Descemet 膜を再生する⁷⁾。

角膜内皮は角膜最内層に 6 角形をした角膜内皮細胞が 1 層配列している。ヒト角膜内皮細胞の生体における細胞分裂は極めて乏しく、内皮細胞が障害され欠損すると、周囲の内皮細胞の伸展と拡大によって修復される。角膜内皮細胞間の結合には一部に間隙があり、バリア機能と選択的透過性を有し、角膜上皮細胞までの栄養供給を担っている。また、角膜内皮細胞は Na⁺K⁺-ATPase などにより Na⁺と HCO₃⁻を実質から前房へ能動輸送し、水をくみ出すポンプ機能を有している。これらの機能により角膜内皮細胞は角膜実質の透明性維持を担っている。

結膜は眼球前部を覆う球結膜と上下眼瞼内側を覆う瞼結膜、両者の移行部である結膜円蓋部の 3 つから成る粘膜組織である。組織学的には結膜上皮層と粘膜固有層とからなる。結膜上皮は、組織学的には重層円柱上皮であり、ムチンの分泌に関与する杯細胞 (goblet cell) が混在している。粘膜固有層の表層には線維芽細胞、マスト細胞、好酸球、マクロファージ、リンパ球、形質細胞などが存在し、深層は血管、リンパ管、神経が豊富に存在する (図 3)。

涙液は眼表面を被い、角膜直上で約 7~10 μ m となる涙液膜 (precorneal tear film) を形成する。眼表面での涙液交換は、角膜への酸素や栄養を供給する役割を担っているとされている。また、涙液層 (涙液膜) はこれまで油層、水層、粘液層の 3 層構造とされていたが、近年涙液の考え方が変わり、油層、水層からなる 2 層構造または表層上皮細胞を含めて 3 層構造と理解されるようになってきている⁹⁾¹⁰⁾ (図 4)。すなわち、粘液層の主成分であるムチンは、杯細胞由来の

分泌型ムチン (MAC5AC) と上皮細胞由来の膜型ムチン (MAC1,4,16) とに大別される。分泌型ムチンが可溶性ムチンとなり水層に溶解していることから水層の構成成分とされ、膜型ムチンは上皮の微絨毛の先端に **glycocalyx** を形成することから上皮の一部と考えられるようになっている。油層は涙液層の最表層に位置し、成分の大半はマイボーム腺から分泌されるロウ (wax) やコレステロールエステル、脂肪酸などである。油層の機能は、涙液の表面張力を低下させるとともに涙液の蒸発を防止することで、眼表面での涙液の伸展を良好にし、乾燥による液層の局所的な破壊を抑制する作用を有する¹¹⁾¹²⁾。水層は主涙腺と副涙腺から分泌される水性成分が主体であり、水層と疎水性の角結膜上皮表面との間にムチンが存在することで親水性となり液層が安定すると考えられている。また、涙液中にはラクトフェリン、プレアルブミン、リゾチーム、トランスフェリン、分泌型 IgA などの生理活性物質が含まれ、眼表面での生体防御の役割を担っている。

眼瞼は瞬目によって眼表面の涙液層を均一に保持し、鼻涙管からの涙液排出を誘導することで、涙液層交換に関与している。したがって、閉瞼不全 (兔眼) や眼瞼の変形は、瞬目不全を引き起こし、ドライアイの病態に深く関与すると考えられている。

イ-2. 眼表面の免疫

結膜は、気管支、消化管などと同様の粘膜組織であり、常に外界と接していることから、細菌、ウイルスなどの病原微生物、異種蛋白、異物などの侵入に対して恒常性を維持する機構を備えている。結膜に備わっている病原微生物に対する生体防御機構は、他の粘膜組織と同様に、物理的防御機構 (瞬目・涙液の流れ・**mucous trapping** など) と免疫学的防御機構とに大別され、免疫学的防御機構はさらに自然免疫と獲得免疫に分類されている。

イ-2-1. 眼表面の免疫学的防御機構

結膜組織の免疫学的防御機構は、粘膜免疫系の特徴を有し、他の粘膜組織との類似点を有する一方で、皮膚の免疫系との類似点も存在する。

結膜上皮下組織の存在する免疫担当細胞としては、Tリンパ球、Bリンパ球、形質細胞、マクロファージ、Langerhans細胞、マスト細胞などが常在するとされている。Tリンパ球は、CD4陽性Tリンパ球およびCD8陽性Tリンパ球が結膜上皮内と結膜下組織とに存在するが、上皮内に存在する常在性Tリンパ球は主にCD4陽性Tリンパ球であるとされている¹³⁾。また、結膜輪部の上皮には常在性リンパ球がほとんどみられず、代わりに樹状細胞であるLangerhans細胞が存在するのが結膜上皮の特徴とされている¹⁴⁾。

Langerhans細胞は主に輪部上皮基底部に存在する遊走性の樹状細胞であり、細胞表面に主要組織適合抗原複合体(MHC) class IIを発現させている。また細胞内には、抗原輸送を担うとされるバーベック顆粒を持つ。Langerhans細胞の細胞表面には、様々な受容体が発現されており、抗原の認識や抗原提示を行うことができるとされている。すなわち、Langerhans細胞は主に皮膚の免疫応答に必要不可欠な抗原提示細胞であると考えられている。Langerhans細胞は、結膜上皮では輪部上皮に限局して存在している点が特徴とされ、単純ヘルペスウイルス角膜炎などの感染性角膜炎などでは周辺部角膜にランゲルハンス細胞が増加することから¹⁵⁾、角膜の免疫応答に関与している可能性が考えられている。

涙腺と結膜下組織中には形質細胞がみられ、その多くはIgA産生細胞とIgG産生細胞である。IgA産生形質細胞から産生されるIgAは、分泌型IgA(secretory IgA: sIgA)となり涙液中に分泌される。眼表面でのsIgAは、抗原に結合し抗原が貪食されるのを促進するオプソニン化、病原体の接着阻害、ムチンやラクトフェリンなどの自然免疫系液性因子と結合し活性化させるなどの

作用を持ち、眼表面での粘膜免疫において中心的な役割を担っていると考えられている¹⁶⁾。粘膜組織には粘膜免疫系のリンパ系組織として、粘膜関連リンパ組織 (mucosa-associated lymphoid tissue: MALT) が存在する¹⁷⁾。眼に存在する MALT としては結膜円蓋部を中心に存在する結膜関連リンパ組織 (conjunctiva-associated lymphoid tissue: CALT)¹²⁾と涙嚢部に存在する涙道関連リンパ組織 (tear duct-associated lymphoid tissue: TALT) とが報告されている¹⁸⁾。CALT は結膜下組織に形成された節外性リンパ組織であり、B 細胞領域である濾胞域、T 細胞領域である円蓋域と傍濾胞域および表層のリンパ上皮から成っている。眼表面から侵入する抗原に対して、リンパ上皮に存在する M 細胞 (microfold cell) は、抗原を取り込んで CALT 内に輸送する作用を有している。CALT 内では、抗原に反応して濾胞域の B 細胞が IgA 前駆 B 細胞へとクラススイッチすると考えられている。抗原感作を受けた IgA 前駆 B 細胞はリンパ管から胸管を経由して大循環系に入るとされている。再び眼表面に抗原が侵入すると、血管を介して涙腺や結膜下組織へと戻ってくるホーミングと呼ばれる現象がみられ、IgA 産生形質細胞となり、特異的分泌型 IgA 抗体が産生されると考えられている。抗原が再侵入した際にみられるホーミングは、CALT 近傍の高内皮細静で観察されることが報告されている¹⁹⁾。したがって、CALT は結膜組織での生体防御に必要なリンパ組織であると考えられている¹⁹⁾²⁰⁾。

マスト細胞は、主に結膜下組織に存在し、細胞質内にヒスタミン、セロトニン、ロイコトリエン、プロスタグランジンなどのケミカルメディエーターやトリプターゼなどの蛋白分解酵素を含んだ顆粒を有している。また、細胞表面に高親和性 IgE 受容体 (Fc ϵ RI) を介して結合した IgE に抗原が結合して架橋されると、脱顆粒が起こり、ケミカルメディエーターが放出される。したがって、マスト細胞は即時型 (I 型) アレルギー反応に関与する重要な細胞であり、アレルギー性結膜疾患の病態と深く関連しているとされている。

イ-2-2. 眼表面と自然免疫

生体の免疫応答は、自然免疫と獲得免疫とに大別される。獲得免疫は、液性免疫と細胞性免疫とからなり、機能発現までは抗原侵入から数日の時間を有するのに対して、自然免疫は、獲得免疫が作動する前段階で作用を発揮する防御機構である。従来、眼表面の物理的防御機構として存在する非特異的防御機構には、瞬目運動、涙液フロー、ムチンが病原体を包み込み瞬目により眼脂として排出する **mucous trapping** と呼ばれる作用²¹⁾、上皮の **tight junction**²⁾、抗菌物質（デフェンシン・ラクトフェリン・リゾチームなど）²²⁾²³⁾、補体などがあげられる。また、結膜下組織中でみられる好中球やマクロファージなどによる貪食作用、**primary T cell response**、**proinflammatory cytokine** の産生などを含めて非特異的防衛機構であると考えられてきた。

近年、自然免疫の誘導に関与する受容体が発見され、この受容体には **Toll-like receptor (TLR)**、**c-type lectin receptor (CLR)**、**NOD-like receptor (NLR)**、**RIG-I-like receptor (RLR)** の4種類の受容体が知られている。**TLR** は代表的受容体であるが、ヒトでは **TLR1~10** の10種類があり、微生物の構成成分を特異的に認識し、自然免疫の誘導に関与することが知られている。**TLR** はマクロファージなどの免疫細胞の他、腸管上皮などの粘膜上皮でも発現が確認されているが、眼表面においてもヒト結膜上皮では **TLR1~10**²⁴⁾²⁵⁾、ヒト角膜上皮では **TLR8** 以外の **TLR** の発現が報告されている²⁴⁾²⁶⁾。また、**TRL** の発現やその作用には臓器特異性があることが報告されている。たとえば角膜上皮細胞は、角結膜に対する病原菌となり得る *pseudomonas aeruginosa* 由来のフラジュリンに対しては炎症性サイトカインを産生するが、角結膜感染症とは無関係のサルモネラ菌由来のフラジュリンや結膜の常在細菌である *Bacillus subtilis* 由来のフラジュリンに対しては **IL-6**、**IL-8** などの炎症性サイトカインを産生しない

ことが報告されている²⁷⁾。また、*pseudomonas aeruginosa* 由来フラジュリンの受容体として働く TLR5 は、角膜上皮の表層には発現しておらず、基底細胞層にのみ発現していると報告されている²⁵⁾²⁷⁾。また結膜上皮でも角膜上皮と程度の差はあれ、同様の反応が見られると報告されている²⁵⁾²⁸⁾。これらのことは、眼表面を構成する結膜上皮が眼表面に常在菌が存在するにもかかわらず、菌体成分に対して容易に炎症を惹起しない機構を保持していることを示唆していると考えられている。一方で、これらの機構の破綻がアレルギー性結膜炎や Stevens-Johnson 症候群などの眼表面の炎症性疾患の病態に関与している可能性について検討されている。眼表面に生じる炎症性疾患の病態が、環境因子の影響を強く受けるにも関わらず、その自然免疫機構の解析は TLR を中心に解析が行われているのみである。そこで、CLR など TLR 以外の自然免疫の誘導に関与する各種受容体について検討することにより、眼炎症性疾患のさらなる理解が期待される。

イ-3. dectin-1

dectin-1 は、CLR の 1 つであり、細胞外領域である C 末端側に CRD (carbohydrate recognition domain) を一つ持ち、細胞内には活性化シグナルを伝えるモチーフである ITAM (Immunoreceptor tyrosine-based activation motif) を有する膜貫通型受容体で、真菌の病原体認識機構の 1 つある²⁹⁾。dectin-1 は主にマクロファージ、樹状細胞、好中球などの細胞膜表面に発現し、真菌の細胞壁に存在する β -D-グルカン (BDG) を特異的に認識する³⁰⁾。BDG が dectin-1 と結合すると、ITAM を介して ROS (reactive oxygen species) が産生され、TNF- α 、IL-1 β 、IL-10 などのサイトカインが産生される³¹⁾³²⁾。これら一連の反応が免疫系を活性化することで、真菌感染に対する生体防御機構として作用していると考えられている (図 5)。一方で、これらの生体防御機構の過

剰発現は、アレルギー疾患や自己免疫疾患を引き起こす³³⁾³⁴⁾と考えられている。しかし、眼表面における **dectin-1** の発現、および **dectin-1** を介した眼表面の免疫学的生体防御機構は十分には解明されていない。

イ-4. BAFF

B-cell activating factor belonging to the tumor necrosis factor family (BAFF) は、TNF スーパーファミリーに属する B 細胞の分化、活性、増殖に重要な役割を果たすヒト B 細胞活性化因子で、単球や樹状細胞、活性化 T 細胞膜上に発現され、血清中には可溶型として存在する³⁵⁾。また BAFF と高い相同性を示す APRIL (A proliferation-inducing ligand) の存在が知られており、BAFF と APRIL は BAFF/APRIL ヘテロ 3 量体を形成し BAFF と同様の生理活性を示すとされている³⁶⁾。このように BAFF に関連するいくつかの分子は、相互に作用しながら B 細胞活性化機能を誘導していると考えられている。

一方、BAFF は、自己免疫性疾患の病態に関与すると報告³⁷⁾されている。SLE の動物モデルでは SLE の発症や病態進行に比例して血中 BAFF 量が増加しているとの報告がある³⁸⁾。また、シェーグレン症候群では、血清中 BAFF の増加が指摘されている³⁹⁾。さらに、BAFF はヒト気道上皮細胞から interferon- β (IFN- β) 依存性に分泌され、アレルギー炎症に関係するとも報告⁴⁰⁾されている。しかし、BAFF の春季カタルをはじめとしたアレルギー性結膜炎やシェーグレン症候群といった眼表面疾患への関与については不明である。

イ-5. β -D-グルカン (BDG) / **dectin-1** 系の臨床応用

β -D-グルカン (BDG) は、真菌細胞壁の主要構成多糖であり、真菌以外にも細菌や植物の細胞壁にも含まれており、自然界に広く分布している。BDG は、

グルコースが B1, 3 または B1, 6 結合した多糖体で、糖鎖の種類により、人体に対する生理学的活性が異なるとされている。

BDG の臨床応用としては、深在性真菌症の診断に血漿中 BDG 値を測定する臨床検査が利用されている。また、精製された BDG としては酵母由来のザイモサン⁴¹⁾、細菌由来のカードラン⁴²⁾、シイタケ由来のレンチナン⁴³⁾など様々な種類が存在し、免疫賦活作用や制癌作用などの薬理学的作用を有するとされるが、その作用や活性は個々の BDG により異なる。日本国内では、抗悪性腫瘍薬としてシイタケ由来のレンチナン、カワラタケ由来のクレスチン、スエヒロタケ由来のソニフィランなどが認可され治療応用されている。また、BDG には BDG の特異的受容体である *dectin-1* を介した作用として、マウスに BDG を投与することで自己免疫性の関節炎が発症するなどアジュバント効果があるとする報告⁴⁴⁾や免疫賦活作用についての検討⁴⁵⁾も行われている。

眼表面では真菌の関与する疾患として、真菌感染による真菌性角膜炎と、真菌抗原に対するアレルギー性結膜疾患などが知られている。すなわち、真菌には感染症という側面と抗原として免疫異常を誘導するという側面との2面性が存在する。これらの疾患の病態解明には BDG/*dectin-1* 系の眼表面炎症への関与を検討することが重要であると考えられる。また眼表面は、常に外界と接している組織であり、環境因子として存在する BDG に接し、角結膜組織に免疫学的な修飾が加えられている可能性がある。しかし、眼表面の免疫系に対する BDG の作用については不明な点が多く残されている。

イ-6. 眼表面の検査法

結膜上皮は、眼感染症における感染経路・防御において重要なだけでなく、アレルギー反応を生じる外来抗原の侵入経路、ドライアイにおける杯細胞の首座、またそれらの炎症の場として非常に重要である。結膜上皮の検査法として

は、生検、結膜擦過細胞診、ブラッシュサイトロジー法、**impression cytology** 法などがあげられ、診断や病態生理の理解の為に行われている。生検は目的とした部位を細胞としてではなく組織として採取できるという利点があるが、他の検査法に対して侵襲が大きい。結膜擦過細胞診は外来で点眼麻酔下に細胞を得られるが、得られた細胞が一塊となってしまう、**single sell suspension** として得られず各々の細胞の観察に不向きという欠点がある。婦人科領域を中心に開発され特殊なサイトブラシを使用するブラッシュサイトロジーでは採取した細胞が **single sell suspension** として得られるが、得られる細胞が最表層の上皮細胞から基底細胞までの上皮全層におよぶため採取部位を限定しにくいといった特徴がある⁴⁶⁾⁴⁷⁾。**impression cytology** は元来皮膚科領域で粘膜生検などに用いられていた方法で、低侵襲に外来で簡便に角結膜上皮細胞が採取でき、光学顕微鏡での細胞観察が可能であり形態学的検査に適している⁴⁷⁾。また、**impression cytology** で得られた角結膜細胞は免疫染色や **PCR** といった分子遺伝学的検査を行うことも可能である⁴⁸⁾。ブラッシュサイトロジーとは異なり、角結膜最表層の 2~3 層を採取するために、常に外界と常に接している結膜上皮でもさらに表層を採取できるため、結膜上皮における免疫学的生体防御機構の解明に有用であると考えられる。

イ-7. Balb/c マウス

Balb/c マウスはアルビノマウスで、**Th2** 活性が高くアレルギー様の免疫応答を呈しやすいことから、**Th2** 細胞が活性化するアレルギー性鼻炎⁴⁹⁾や気管支喘息⁵⁰⁾などのアレルギー性疾患などの評価に利用されている。眼科領域では Balb/c マウスに卵白アルブミン (**OVA**) を抗原として全身感作した後に、眼部に **OVA** を直接点眼投与する局所感作を連続して行うことでアレルギー性結膜炎モデルマウスを作製し、抗アレルギー薬の効果の検討が行われた⁵¹⁾。また、

OVA とアジュバントとして水酸化アルミニウムを腹腔内に投与して感作した後に、OVA を点眼投与したアレルギー性結膜炎モデルマウスを作製し、ステロイドや免疫抑制剤のアレルギー性結膜炎への効果の検討などが行われている⁵²⁾。Balb/c マウスはアレルギー性結膜疾患の眼表面での変化の検討に有用であると考えられる。

イ-8. 春季カタル

結膜に増殖性変化を生じるアレルギー性結膜疾患が春季カタルである。本症は学童期から思春期に好発し、両眼性で、春～夏に悪化し、冬期に軽快するという季節的再発性がある。近年の傾向として、重症化や遷延化あるいは発症年齢の上昇がみられるとされている。

春季カタルの自覚症状は、眼掻痒感、結膜充血、流涙、眼脂、視力障害などがあげられる。他覚的所見は、巨大乳頭（石垣状乳頭増殖）、結膜充血、輪部堤防状隆起、Horner-Trantas 斑、点状表層角膜炎、落屑状点状表層角膜炎、シールド潰瘍、角膜プラークなどである。

結膜の病理組織学的所見は、結膜上皮の増殖、結膜下組織への炎症細胞浸潤、結膜下組織の結合組織増殖を特徴とする。結膜下組織の浸潤細胞には、好酸球、Th2 細胞、マスト細胞、形質細胞、好中球、ランゲルハンス細胞などが含まれるとされている。治療法は軽症例や重症例の寛解期には、副作用の少ない抗アレルギー点眼薬を主体に治療する。中等症以上では抗アレルギー点眼薬に、抗アレルギー薬の内服またはステロイド点眼薬やステロイド薬局所注射などのステロイド薬治療を追加する。また、抗アレルギー薬の効果が不十分な場合、シクロスポリン点眼液やタクロリムス点眼液などの免疫抑制薬の点眼を併用する場合もある。免疫抑制点眼薬は、ステロイド点眼薬と比較して、同等またはそれ以上の効果が得られ、ステロイド点眼薬でみられるような眼圧上昇などの重

篤な副作用は少ないとされる一方で、易感染性になることが指摘されている。春季カタルの増悪因子には様々な物質が検討されているが、その作用機序等には不明なものも多い。

イ-9. 目的

黄砂が舞う時期には春季カタルなどのアレルギー性疾患が増悪することが報告されている⁵³⁾。一方で、黄砂には LPS や BDG が付着していることが知られている⁵⁴⁾。BDG は前述の通り、アジュバント作用などの報告があり眼表面に対して免疫学的な修飾を加えている可能性があることから、BDG がアレルギー性結膜疾患に対しての増悪物質として作用する可能性があると考えた。

そこで、健常者、眼表面の炎症性疾患であるシェーグレン症候群およびアレルギー性結膜疾患である春季カタルを対象に、結膜上皮細胞における BDG の特異的受容体である *dectin-1* とアレルギー炎症に関与する可能性がある BAFF 発現について部位、疾患による相違の有無を明らかにし、Balb/c マウスを用い細菌由来の BDG であるカードラン点眼で誘導されるマウス結膜の病態生理学的変化を明らかにすることにより、結膜での *dectin-1* の役割および BDG の作用を解明することが本研究の目的である。

研究 1.

結膜上皮細胞における dectin-1 および BAFF 発現の検討

ウ-1) 対象と方法

ウ-1-1. 対象

1. 結膜上皮細胞診による dectin-1 および BAFF 発現の検討

本研究は、日本大学医学部附属板橋病院臨床研究審査委員会の承認を得て行った。

対象は、屈折異常以外に眼疾患の既往のない健常成人（健常群）12 例 12 眼、続発性シェーグレン症候群（シェーグレン群）6 例 6 眼、春季カタル（春季カタル群）10 例 10 眼である。対象症例の詳細は表 1 に示した。

シェーグレン症候群の診断は、厚生省研究班の診断基準⁵⁵⁾を用いて行った。春季カタルの確定診断はアレルギー性結膜疾患診療ガイドライン（第 2 版）⁵⁶⁾の診断基準に準じた。

a) 春季カタル症例での重症度分類

春季カタル症例は、5-5-5 方式重症度観察スケール⁵⁷⁾を用いて重症度を決定した。5-5-5 方式重症度観察スケールの判定方法を表 2 に示した。春季カタルの重症度は、表 2 に基づいて臨床スコアを計算し、臨床スコアが 200 点以上を重症、200 点未満 100 点以上を中等症、100 点未満を軽症と定められている。したがって、春季カタル症例では、重症度により軽症群と中等症・重症群の 2 群に分けて検討した。

ウ-1-2. 方法

1. 結膜上皮細胞診による dectin-1 および BAFF 発現の検討

a) 結膜上皮細胞の採取部位と対象眼

健常群では結膜の部位別変化の有無を検討するために、上眼瞼結膜、下眼瞼

結膜、耳側球結膜を対象に以下に記載する、impression cytology 法を用いて結膜上皮細胞を採取した。シェーグレン群と春季カタル群では上眼瞼結膜から同様の方法で採取した。対象眼は、健常群では右眼、シェーグレン群と春季カタル群では臨床所見が重症眼もしくは左右の重症度が同じ場合には右眼とした。

b) impression cytology 法

impression cytology 法は、既報⁵⁸⁾に従いニトロセルロース膜を用いて行った。オキシブプロカイン塩酸塩点眼液 0.4% (ベノキシール[®]点眼液 0.4%, 参天製薬, 大阪) による点眼麻酔を行った後、ニトロセルロース膜 (MILLIPORE[®], Bedford, MA, USA) を上眼瞼結膜、下眼瞼結膜または耳側球結膜に貼り付け、硝子棒で数回圧迫した。その後、ニトロセルロース膜を剥がして結膜上皮細胞を採取した。結膜上皮細胞を採取したニトロセルロース膜は、蛍光抗体法用として直ちに 4% パラホルムアルデヒド液で固定した。また、real-time polymerase chain reaction (real-time PCR) 法ではニトロセルロース膜を、RNA stabilization reagent (RNAlater[®], Ambion, 東京) に浸漬して -4°C で保存した。

c) 蛍光抗体法

4% パラホルムアルデヒドで固定したニトロセルロース膜を、0.01M リン酸緩衝生理食塩水 (pH = 7.6) で洗浄後、間接蛍光抗体法で染色した。すなわち、第 1 抗体である抗ヒト Dectin-1 ヤギポリクローナル抗体 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) と室温で 3 時間反応させ後、2 次抗体である FITC 標識抗ヤギ IgG ロバポリクローナル抗体 (Abcam, 東京) を反応させて蛍光顕微鏡 (OLYMPUS BX60, オリンパス, 東京) を用いて観察した。

また、結膜上皮での dectin-1 染色を確認する目的で、dectin-1 と cytokeratin 13 との 2 重染色を行った。まず、3% ロバ血清を用いて室温 30 分間ブロッキングを行った。次ぎに抗 dectin-1 ヤギポリクローナル抗体 (Santa Cruz

Biotechnology) を室温で 3 時間反応させた後、2 次抗体である Alexa fluor[®]488 標識抗ヤギ IgG ロバ抗体 (Life Technologies Japan, 東京) を 1 時間反応させた。さらに続いて抗ヒト cytokertin13 マウスモノクローナル抗体 (Santa Cruz Biotechnology) を室温で 1 時間反応させた後、2 次抗体である Alexa fluor[®]546 標識抗マウス IgG ヤギ抗体 (life technologies Japan) を 1 時間反応させ、4', 6-diamidino-2-phenylindole (DAPI-fluoromount-G[™], southern biotech, Birmingham, AL, USA) で核染色した。観察は、蛍光顕微鏡 (BIOREVO BZ-9000, キーエンス, 東京) を用いて行った。

d) real-time PCR 法

結膜上皮における Dectin-1 mRNA 発現量および BAFF mRNA 発現量は real-time PCR 法で測定した。インプレッションサイトロジーでのニトロセルロース膜を RNA stabilization reagent (RNAlater[®], Ambion, 東京) 中に -4°C で保存し、mRNA 抽出キット (RNeasy[®] Mini Kit, QIAGEN, Hilden, Germany) を使い、キットのマニュアルに従って mRNA を抽出した。real-time PCR 法は、ABI PRISM 7000 (Life technologies, 東京) を使用した TaqMan 法で行った。TaqMan プローブおよびプライマー (life technologies, 東京) は、TaqMan[®] Gene Expression Assay (Applied Biosystems, 東京) の dectin-1: CLEC7A, Hs00224028_m1、BAFF: TNFSF13B, Hs00198106_m1 を使い、内在性コントロールには GAPDH: GAPDH, Hs99999905_m1 を用いた。real-time PCR 法の結果は $\Delta \Delta Ct$ 法で定量的解析を行った。

e) 統計学的検討

健常群における dectin-1 mRNA 発現の部位別比較は、反復測定分散分析を用いた。疾患群別の dectin-1 mRNA 発現量および BAFF mRNA 発現量の検討は、Kruskal-Wallis H-test および Dunn の多重比較を用いた。また、dectin-1 mRNA 発現量と BAFF mRNA 発現量との相関関係は、Spearman 順位相関係

数を用い、春季カタルにおける重症度別の dectin-1 と BAFF mRNA 発現量の検討は Mann-Whitney U-test を用い、統計学的有意水準は危険率 5%未満を有意差ありとした。

2. 培養結膜上皮細胞による dectin-1 および BAFF 発現の検討

a) 培養細胞および培養方法

培養結膜上皮細胞には、Chang conjunctival epithelial cell line [WKD; clone 1-5c-4, American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA) certified cell line (CCL) 20.2] を用いた。

培養液は、Ham's F12 と Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA USA) とを 1:1 で混合し、リコンビナント epidermal growth factor (10ng/mL ; Life Technologies Corporation)、リコンビナント insulin (5µg/mL; Life Technologies Corporation)、ジメチルスルホキシド(DMSO) (0.5%; Sigma) 、ゲンタマイシン (40 µg/mL; Schering-Plough, 大阪) 、ペニシリン G (100 U/mL; MSD, 東京)および 10% fetal bovine serum (FBS) (Life Technologies Corporation) を添加した。培養は、セルカルチャーディッシュ (直径 35 mm) (Falcon 3001; Becton Dickinson, 東京) を用い、37°C 、5% CO₂の条件下で 24 時間以上コンフルエントになるまで培養した。その後、0.25%トリプシンおよび 0.5% EDTA (Sigma) を用いて細胞浮遊液を作製し、24 ウェル平底マイクロプレート (ASAHI GLASS CO., LTD. 東京) に 10⁴ 個/well となるよう分注して再度培養を行い、コンフルエントの状態になったものを実験に用いた。

培養細胞は、培養液中に OK-432 (ピシバニール®, 中外製薬) を 0.02、0.1、0.5 KE/mL の濃度になるよう添加した群、lipopolysaccharide (LPS) を 80、160、320 µg/mL の濃度になるよう添加した群および無添加群の 7 群に分け、37°C、

4 時間培養した後、細胞を回収し、real-time PCR で dectin-1 mRNA および BAFF mRNA 発現について検討した。

b) real-time PCR

上述した impression cytology 検体と同様に、培養結膜上皮細胞から mRNA 抽出キット (RNeasy[®] Mini Kit ,QIAGEN, Hilden, Germany) を用い、キットのマニュアルに従って mRNA を抽出した。cDNA は、High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA USA) を用いキットのマニュアルに従って合成した。real-time PCR 法は、ABI PRISM 7000 (Life technologies, 東京) を使用した TaqMan 法で行った。TaqMan プローブおよびプライマーは、TaqMan[®] Gene Expression Assay (Applied Biosystems, 東京) の dectin-1: CLEC7A, Hs00224028_m1、BAFF: TNFSF13B, Hs00198106_m1 を使用し、内在性コントロールには GAPDH: GAPDH, Hs99999905_m1 を使用した。real-time PCR 法の結果は $\Delta \Delta Ct$ 法で定量的解析を行った。

c) 統計学的検討

OK-432 刺激および LPS 刺激による培養結膜上皮細胞での dectin-1 mRNA 発現量および BAFF mRNA 発現量の検討は、Kruskal-Wallis H-test を用いた。また、dectin-1 mRNA 発現量と BAFF mRNA 発現量との相関関係は、Spearman 順位相関係数を用いて検討した。危険率 5%未満を有意差ありとした。

エ-1) 結果

エ-1-1. 健常群における結膜部位別検討

a) 蛍光抗体法による dectin-1 発現の検討

健常群における蛍光抗体法による検討結果は、impression cytology で採取し

た結膜上皮細胞の中に、細胞全体が淡く蛍光を発する dectin-1 陽性細胞と蛍光を発していない dectin-1 陰性細胞とが混在していた。ただし、染色性に関して蛍光抗体法で観察した結果、上眼瞼結膜、下眼瞼結膜および耳側球結膜の結膜上皮細胞の染色性に関する部位差はみられなかった (図 6)。

また、dectin-1 と cytokeratin 13 による 2 重染色の結果では、cytokeratin13 陽性を示す結膜上皮細胞の一部に dectin-1 陽性細胞がみられた (図 7)。2 重染色陽性細胞は、上眼瞼結膜、下眼瞼結膜および耳側球結膜における部位差はみられなかった。

b) dectin-1 mRNA 発現量の検討

健常群における dectin-1 mRNA 発現量は、上眼瞼結膜 1.5 (0.1-4.0) [中央値 (レンジ)]、下眼瞼結膜 1.5 (0.5-4.9)、耳側球結膜 3.0 (0.3-8.6) であり、結膜の dectin-1 mRNA 発現量には部位による差は無かった (図 8)。

エ-1-2. 疾患別 dectin-1 mRNA と BAFF mRNA 発現量の検討

上眼瞼結膜での dectin-1 mRNA 発現量は、健常群 1.5 (0.1-4.0) [中央値 (レンジ)]、シェーグレン群 2.6 (1.1-4.8) および春季カタル群 3.6 (1.7-16.6) であった。dectin-1 mRNA 発現量は、健常群とシェーグレン群との群間では有意差がなかったが、春季カタル群では健常群と比較して有意に高かった (Kruskal-Wallis H-test, 多重比較 Dunn 法, $P < 0.01$) (図 9)。

疾患別の上眼瞼結膜での BAFF mRNA 発現量は、健常群 2.8 (0.2-13.8) [中央値 (レンジ)]、シェーグレン群 6.3 (2.1-15.1) および春季カタル群 11.2 (3.5-70.8) であった。BAFF mRNA 発現量は、dectin-1 mRNA 発現量と同様に健常群とシェーグレン群との群間では差がなかったが、春季カタル群で健常群と比較して有意に高かった。(Kruskal-Wallis H-test, 多重比較 Dunn 法, $P < 0.01$) (図 10)。

健康群、シェーグレン群および春季カタル群の全例を対象として、dectin-1 mRNA 量と BAFF mRNA 量との間の相関関係を検討したところ、両者には有意な相関関係がみられた ($r = 0.75$, $P < 0.001$, spearman 順位相関係数) (図 11)。

また、春季カタル群に含まれる症例の重症度は、軽症、中等症および重症に分けることができた (表 3)。また、春季カタルの重症度別 dectin-1 mRNA 発現量は、軽症群 2.8 (1.7-3.8) [中央値 (レンジ)] と比較して、中等症・重症群 9.2 (2.6-16.6) で有意に高値を示した (Mann-Whitney U-test $P < 0.05$) (図 12)。春季カタルの重症度別 BAFF mRNA 発現量は、軽症群 4.3 (3.5-11.2) [中央値 (レンジ)] と比較して、中等症・重症群 17.4 (9.1-70.8) で有意に高値を示した (Mann-Whitney U-test $P < 0.05$) (図 13)。

エ-1-3. 培養結膜上皮細胞による dectin-1 および BAFF 発現の検討

無刺激による培養結膜上皮細胞での dectin-1 mRNA 発現は、1.0 (0.8-1.4) [中央値 (レンジ)] であった。OK-432 刺激による培養結膜上皮細胞での dectin-1 mRNA 発現は、0.02 KE/mL 群 2.0 (1.7-2.8)、0.1 KE/mL 群 2.4 (2.4-3.5)、0.5 KE/mL 群 12.4 (9.9-13.6) で、濃度依存的に発現が増加した (Kruskal-Wallis H-test, $P < 0.05$) (図 14a)。また、LPS 刺激による培養結膜上皮細胞での dectin-1 mRNA 発現は、80 μ g/mL 群 1.2 (0.7-1.2)、160 μ g/mL 群 0.9 (0.8-1.6)、320 μ g/mL 群 1.0 (0.7-1.1) であり、各群間に差がなかった。

無刺激による培養結膜上皮細胞での BAFF mRNA 発現は、1.0 (0.8-1.3) [中央値 (レンジ)] であった。OK-432 刺激による培養結膜上皮細胞での BAFF mRNA 発現は、0.02 KE/mL 群 1.2 (1.1-1.6)、0.1 KE/mL 群 1.5 (1.5-1.6)、0.5 KE/mL 群 1.5 (1.4-1.6) であった。また、LPS 刺激による培養結膜上皮細胞での BAFF mRNA 発現は、80 μ g/mL 群 1.1 (0.9-1.3)、160 μ g/mL 群 1.3

(1.0-1.5)、320 μ g/mL 群 1.0 (0.9-1.2) であり、各群間に差がなかった。

OK-432 刺激で刺激した全ての培養結膜上皮細胞における dectin-1 mRNA 発現と BAFF mRNA 発現との間に有意な相関関係がみられた (Spearman 順位相関係数, $r = 0.85$, $P < 0.005$) (図 14b)。

オ-1) 考察

眼表面における真菌が関与する病態としては、真菌性角膜炎と、真菌を抗原とするアレルギー性結膜疾患などが知られている。すなわち、真菌には角膜炎などの感染症という側面とアレルギー抗原として免疫異常を誘導するという側面との 2 面性が存在する。これらの疾患の病態解明には BDG/dectin-1 系の眼表面炎症への関与を検討することが重要であると考えられる。そこで、今回の研究では、外界に直接接する結膜における dectin-1 発現について、部位別、疾患別の検討を行った。疾患別の検討では、眼表面の炎症性疾患であり、重症ドライアイを呈するシェーグレン症候群と眼表面の重症アレルギー性炎症疾患である春季カタルを対象とした。今回の検討では結膜上皮細胞の採取を impression cytology 法を用いた。impression cytology 法では、採取される結膜上皮細胞量にばらつきが生じる可能性が指摘されているため、real-time PCR 法による発現量の検討には $\Delta\Delta Ct$ 法を用いた。 $\Delta\Delta Ct$ 法は、基準となる内在性コントロールと比較して相対的定量を行う方法であることから、結膜上皮細胞の採取量に関係無く評価可能と考えられた。健常群において dectin-1 発現の結膜部位別検討を蛍光抗体法および real-time PCR 法を用いて検討したところ、結膜上皮細胞の一部に dectin-1 蛋白および dectin-1 mRNA の両者の発現が確認された。また、結膜上皮細胞に特異性が高いとされる Cytokeratin 13⁵⁹⁾ を用いて、dectin-1 との 2 重染色を行い dectin-1 蛋白が結膜上皮細胞で発現がみられることを確認した。したがって、眼表面での dectin-1 発現は、結膜上皮

細胞に遺伝子レベルでも蛋白レベルでも発現しており、*dectin-1* 発現細胞は眼表面では均等に分布していると考えられた。また、疾患別の検討では結膜上皮の採取部位を3か所ではなく、上眼瞼結膜のみとしているが、健常者の結膜では *dectin-1* 発現に部位別に差がなかったために、疾患別の検討では対象部位を上眼瞼結膜のみとした。

疾患別の *dectin-1* mRNA 発現量の検討の結果、春季カタル群で *dectin-1* 発現増加がみられた。*dectin-1* の増減に関しては、乾癬の皮膚表皮で増加しており、乾癬の病態に関与する炎症性サイトカインで増加するが、BDG の刺激では増加しないとする報告⁶⁰⁾がある。一方、マウスの気道内に *Alcaligenes faecalis* から作成した BDG を投与すると、気管支上皮細胞の *dectin-1* mRNA 発現量が対照と比較して増加するとする報告⁶¹⁾もみられる。BDG は *dectin-1* 以外にも toll 様受容体を刺激することや、BDG の種類によって作用が異なることから、*dectin-1* を介した BDG の作用だけを評価することは難しいとされており、不明な点が多く残されている。今回の研究でも、春季カタル患者の結膜での *dectin-1* 発現増加が、炎症性サイトカインによるものか、BDG によるものかは不明であった。しかし、春季カタルの重症化に伴い BDG の特異的受容体である *dectin-1* 発現が増加することが確認され、春季カタルの重症化によって結膜上皮細胞は、アレルゲンまたはアジュバントとしての作用を有する BDG の影響を受けやすい状態になると推察された。すなわち、*dectin-1* を介して作用する BDG は、春季カタルの病態に増悪因子として関与する可能性が示唆された。また、シェーグレン症候群では、*dectin-1* 発現量に変化がみられなかったことから、シェーグレン症候群でみられる炎症反応では *dectin-1* 発現への関与は少ないことが示唆された。

一方、春季カタル群では、BAFF mRNA 発現量が増加していた。BAFF は、B 細胞に発現されている BAFF 受容体を介して B 細胞に作用し、B 細胞の分化

と生存、免疫グロブリンのクラススイッチ、T 細胞非依存性および依存性抗体産生などに関与していると述べられている⁶²⁾。従って、結膜上皮での BAFF 発現増加は、春季カタルにおけるアレルギー反応に対して抗体産生を介して関与している可能性が考えられた。実際、春季カタルに代表される重症アレルギー性結膜疾患症例では、涙液中抗原特異的 IgE 抗体価の増加⁶³⁾や IgE 局所産生に関する報告⁶⁴⁾ がみられる。一方、シェーグレン症候群では、血清中 BAFF の増加が指摘されている⁶⁵⁾。また、BAFF 過剰発現マウスでは、加齢とともにシェーグレン症候群様の臨床所見を呈することが知られており⁶⁶⁾、BAFF がシェーグレン症候群の病態に関与すると報告されている。しかし、今回の実験では、結膜上皮における BAFF mRNA 発現量には健常群との間に有意差がみられなかったことから、シェーグレン症候群における眼表面の炎症には BAFF を介したアレルギー炎症の関与は少ないことが示唆され、結膜上皮の BAFF 発現とシェーグレン症候群の病態との関連については、眼表面での自己抗体産生の可能性なども含めてさらに検討する必要があると考えられた。今回の研究の結果から、シェーグレン症候群における眼表面炎症には結膜上皮の dectin-1、BAFF の関与は少ないと考えた。

Impression cytology における dectin-1 mRNA 発現と BAFF mRNA 発現との間には有意な相関がみられた。しかし、impression cytology は、生体における眼表面の細胞診であることから、炎症細胞などの混入も考えられ、結膜上皮細胞の変化が正しく評価出来ているか否かという疑問が残る。そこで今回、炎症細胞等の混入がない培養ヒト結膜上皮細胞を用いて dectin-1 と BAFF との関係を検討した。OK-432 で刺激した培養結膜上皮細胞において、dectin-1 mRNA 発現と BAFF mRNA 発現との間には有意な相関がみられた。したがって、培養結膜上皮細胞においても impression cytology と同様の結膜上皮細胞における dectin-1 mRNA と BAFF mRNA との関係が再現できたと考えられ、特定の

刺激により結膜上皮細胞の **dectin-1 mRNA** 発現が増加すると推察された。今回の実験には細菌由来の **OK-432** と **LPS** とを用いたが、両者間で結果に差がみられた。**LPS** は一般的な起炎物質であるが、**LPS** 刺激では **dectin-1**、**BAFF** 共に発現が増加しなかったことから、**dectin-1**、**BAFF** 発現は炎症全般によって発現が誘導されるのではなく、特定の刺激によってのみ発現が誘導されると考えられる。しかし、**OK-432** 刺激による結膜上皮における **dectin-1 mRNA** 発現増加と **BAFF mRNA** 発現増加の機序は不明であり、春季カタルの病態との関連も解明されていない。したがって、結膜上皮細胞で **dectin-1 mRNA** が増加し、**BDG** が春季カタルの増悪因子となる病態については、今後さらなる検討が必要である。

研究 2.

カードラン点眼で誘導されるマウス結膜の病態生理学的変化の検討

ウ-2) 対象と方法

本研究は、日本大学医学部動物実験委員会の承認を得て行った。実験動物の取り扱いには Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO) の取り扱い規約に準じた。

ウ-2-1. 対象マウス

対象は、メスの 8 週齢の Balb/c マウス（オリエンタル酵母工業, 東京）を用いた。飼育環境は specific pathogen free (SPF) 環境下で食事と水は自由に摂取させた。

ウ-2-2. 点眼処置および組織採取

a) 点眼処置

Balb/c マウスは、点眼処置の内容により 3 群に分類した。点眼投与するカードランの濃度別組織変化を観察するために、phosphate buffered solution (PBS) を点眼した P 群 (15 匹)、低濃度カードランを点眼した CL 群 (15 匹) および高濃度カードランを点眼した CH 群 (12 匹) に分類した。カードラン (Curdlan from *Alcaligenes faecalis*, Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) を、100 μ g/ml の低濃度カードラン点眼用水溶液と 10000 μ g/ml の高濃度カードラン点眼用水溶液を作成した。点眼処置は、P 群、CL 群および CH 群に対して、おのおのに対応する点眼用薬液を 1 眼に 1 回 10 μ l 点眼とし、両眼に点眼処置を行った。点眼処置は、12 時間ごとに計 3 回行った。

b) 組織採取

最終点眼から 4 時間後にマウスにペントバルビタール (ソムノペンチル[®], 共立製薬, 東京) を腹腔内に過量投与して安楽死させた後、眼球と眼瞼とを一塊

として摘出した。摘出した眼球・眼瞼は、1) 組織学的検討のため 2% periodate-lysine-paraformaldehyde (PLP) 固定組織と 2) レーザーマイクロダ イセクション法に用いるため未固定組織とに分け、OCT compound (Tissue Tec O.C.T compound, サクラファインテックジャパン, 東京) に包埋して-80°Cで凍結保存した。

ウ-2-3. 組織学的検討

組織用切片は、2% PLP 固定後に OCT compound 包埋したブロックから、約 7 μ m の薄切切片を作製した。

a) 酵素抗体法

好中球の観察は抗 GR1 抗体を用いた酵素抗体法で行った。酵素抗体法は、まず内因性ペルオキシダーゼ阻害剤として 0.3%過酸化水素加メタノールに 30 分間浸漬した後、5%ヤギ血清でブロッキングを行った。次に、1 次抗体を室温で 60 分間反応させた。今回使用した 1 次抗体は、GR-1 に対する染色には抗マウス GR-1 ラットモノクローナル抗体 (Ly-6G and Ly-6C, BD Pharmingen™, California, USA)、CD68 に対する染色には抗マウス CD68 ラットモノクローナル抗体 (Bio-Rad AbD Serotec Limited, Oxfordshire, UK)、を使用した。酵素抗体法の 2 次抗体以降の反応には酵素抗体法染色キット streptavidin-biotin (SAB) 法 (ヒストファイン シンプルステインマウス MAX-PO (Rat), ニチレイバイオサイエンス, 東京) を使用し、添付の使用方法に従ってビオチン標識 2 次抗体およびペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジンとを反応させ、3, 3'-diaminobenzidine (DAB) \cdot 4HCl で発色させた、核染色にはメチルグリーンを用いた。

b) 組織観察、細胞数カウント

染色後の組織切片は、光学顕微鏡 (BH2, オリンパス, 東京) を用いて観察、

写真撮影を行った。撮影したデジタル写真からパーソナルコンピュータの画像処理ソフト Photoshop elements9 (Adobe Systems, San Jose, CA, USA) を用いて結膜組織の総面積をピクセル数から換算した。次に、結膜組織中の GR-1 陽性細胞数および結膜組織中の CD68 陽性細胞数を測定し、GR-1 陽性細胞密度(個/mm²)と CD68 陽性細胞密度(個/mm²)を計算した。

ウ-2-4. Real-time PCR 法

a) レーザーマイクロダイセクション法

採取試料を未固定で OCT compaund に包埋して急速凍結したブロックを用いて、約 7 μ m の凍結切片を作製した。組織切片は、直ちに 4°C に冷却した 100% メタノールで 3 分間固定し、蒸留水で洗浄後、0.05% トルイジンブルー染色液に 15 秒間浸漬して、トルイジンブルー染色を行った。その後、Laser Microdissection 装置 (Leica microsystems, LMD7000, Wetzlar, Germany) を用いて結膜上皮および上皮下から粘膜筋板までの結膜下組織を合わせて切り抜き、real-time polymerase chain reaction (real-time PCR) 用の試料とした。

(図 15)

b) real-time PCR 法

レーザーマイクロダイセクション法で採取した結膜組織から、mRNA 抽出キット (RNeasy[®] Mini Kit , QIAGEN, Hilden, Germany) を用い、キットのマニュアルに従って mRNA を抽出した。その後、High Transcription Kit (Life technologies Japan, 東京) を用いて cDNA に変換した。その後 real-time PCR 法による結膜組織におけるサイトカイン mRNA 発現の検討として、TNF- α 、IL-1 β および IL-18 の mRNA 発現量を測定した。real-time PCR 法は、ABI PRISM 7000 (Life technologies Japan) を使用した TaqMan 法で行った。TaqMan プローブおよびプライマーは、TaqMan[®] Gene Expression Assay

(Applied Biosystems, 東京) の TNF- α : Mm00443258_ml、IL-18: Mm01336189_ml、IL-18: Mm00434225_ml を使用し、内在性コントロールには Actb: Mm00607939_s1 を使用した。real-time PCR 法の結果は $\Delta \Delta Ct$ 法で定量的解析を行った。

ウ-2-5. 統計学的検討

各検討項目は、ノンパラメトリックの多重比較法である Steel-Dwass 法を用いて統計学的に検討し、危険率 5%未満を有意差有りとした。

エ-2) 結果

エ-2-1. 結膜下組織中浸潤細胞の免疫組織化学的検討

a) GR-1 陽性細胞の検討

光学顕微鏡による観察では、全ての群で GR-1 陽性細胞が結膜下組織中にみられた。各群の GR-1 陽性細胞密度は、P 群 76.8 (43.7-114.5) 個/mm² [中央値(レンジ)]、CL 群 103.3 (46.1-255.2) 個/mm²、CH 群 197.8 (148.0-226.1) 個/mm²であった。GR-1 陽性細胞密度は P 群と比較して CH 群で有意に高値であった (Steel-Dwass 法, $P < 0.01$) (図 16)

b) CD68 陽性細胞の検討

光学顕微鏡による観察では、全ての群で茶褐色に染色された CD68 陽性細胞が結膜組織中にみられた。CD68 陽性細胞は、P 群では結膜下組織中に散見される程度であったが、カードランを点眼処置した群では、CL 群、CH 群の両群ともに結膜下組織中および粘膜筋板下にも多数みられた (図 17)。

各群の CD68 陽性細胞密度は、P 群 6.3 (4.8-8.1) 個/mm² [中央値(レンジ)]、CL 群 37.2 (16.9-46.5) 個/mm²、CH 群 41.4 (22.4-64.5) 個/mm²であ

った。CD68 陽性細胞密度は P 群と比較して CL 群および CH 群で有意に高かった (Steel-Dwass 法, CL 群 : $P < 0.01$, CH 群 : $P < 0.01$) (図 18)。

エ-2-2. real-time PCR 法による結膜組織中サイトカイン mRNA 発現の検討

a) 結膜組織中 TNF- α mRNA 発現量の検討

各群の結膜中 TNF- α mRNA 発現量は、P 群 0.82 (0.41-1.61) [中央値 (レンジ)], CH 群 0.76 (0.27-1.67) に対して、CL 群 1.45 (0.52-2.55) であった。TNF- α mRNA 発現量は P 群と比較して CL 群で有意に高値を示し (Steel-Dwass 法, $P < 0.05$)、CH 群と比較しても CL 群で有意に高値であった (Steel-Dwass 法, $P < 0.05$) (図 19)

b) 結膜組織中 IL-1 β mRNA 発現量の検討

各群の結膜中 IL-1 β mRNA 発現量は、P 群 1.45 (0.70-3.57) [中央値 (レンジ)] に対して、CL 群 1.12 (0.43-3.32)、CH 群 3.19 (1.26-9.16) であった。IL-1 β mRNA 発現量は P 群、CL 群と比較して CH 群で有意に高値を示した。 (Steel-Dwass 法, $P < 0.01$) (図 20)

c) 結膜組織中 IL-18 mRNA 発現量の検討

各群の結膜中 IL-18 mRNA 発現量を検討した結果、P 群 1.01 (0.51-3.21) [中央値 (レンジ)], CL 群 0.90 (0.54-2.28) に対して、CH 群 1.13 (0.46-4.92) であった。IL-18 mRNA 発現量は P 群、CL 群、CH 群で差はなかった。(図 21)

オ-2) 考案

今回の研究では、マウス結膜に細菌性由来のカードランを投与し、結膜組織での病態生理学的変化の検討を行った。

今回の免疫組織化学検討では、好中球の指標として GR-1 を、マクロファ-

ジの指標として CD68 を用いた。今回用いた抗 GR-1 抗体は、Ly-6G/6C に対する抗体である。Ly-6G/6C は骨髄細胞分化抗原 GR-1 のコンポーネントであり、主に末梢好中球に発現していることから末梢好中球のマーカータンパク質と考えられているため、本実験では好中球のマーカーとして使用した。また、CD68 は、単球、マクロファージに発現する LAMP ファミリーの糖蛋白質であり、今回の検討ではマクロファージの動向を観察する目的で使用した。real-time PCR 法を用いたサイトカイン mRNA 発現の検討ではレーザーマイクロダイセクション法で検体を採取することによって、結膜上皮から粘膜筋板直上までの結膜組織でのカードラン点眼投与による変化を局所的に評価することができたものと推察された。一方で、採取した結膜組織から得られる検体量にばらつきが生じる可能性があるため、real-time PCR 法による発現量の検討には $\Delta \Delta Ct$ 法を用いた。 $\Delta \Delta Ct$ 法は、基準となる内在性コントロールと比較して相対的定量を行う方法であることから、検体の採取量に左右されずに評価が可能であったと考えられた。

カードランを投与した群で proinflammatory cytokine である TNF- α 、IL-1 β の mRNA 発現増加がみられたことは、カードランがマウス結膜組織において炎症反応の惹起に関与している可能性が示唆された。しかし、結膜組織中 TNF- α mRNA 発現量の検討において P 群、CH 群と比較して CL 群で有意に増加したこと、および結膜組織中 IL-1 β mRNA 発現量の検討において P 群、CL 群と比較して CH 群で有意に増加したことは、カードランの濃度によって結膜に生じる炎症または免疫学的反応が異なることを示していると推論される。今回の TNF- α mRNA 発現の測定結果から、カードランが他の proinflammatory cytokine 産生に影響を与えず、TNF- α mRNA 発現に関与するためには指摘濃度が存在する可能性が推察された。TNF- α は、炎症反応または免疫応答においては、主にマクロファージ、単球などにより産生され、アポ

トーチスの誘導、IL-1、IL-6 といった炎症性メディエーター産生促進、血管内皮細胞活性化といった作用を有すると報告されている⁶⁷⁾⁶⁸⁾。また、カードランの proinflammatory cytokine に対する作用としては至適濃度の存在が知られている⁶⁹⁾。したがって、今回低濃度群 (CL 群) に投与したカードランの投与量は、TNF- α mRNA を増加させる至適濃度と一致していた可能性が示唆された。今回の免疫組織化学的検討の特徴としては、CH 群で好中球数が増加し、CL 群および CH 群で CD68 陽性細胞数が有意に増加していたことがあげられる。CD68 陽性細胞は主に単球やマクロファージといった抗原提示、自然免疫に関与する細胞で、自然免疫は、粘膜組織におけるアジュバント効果に関与している⁷⁰⁾とされている。これはアジュバント物質が局所にある種の炎症反応を惹起し、マクロファージ等の抗原提示細胞を遊走することで、抗原の貪食・抗原提示を起しやすくなるためとされている。したがって、カードランの投与により CL 群において結膜組織中に好中球が増加せず、CD68 陽性細胞が増加したこと、および TNF- α mRNA が増加したことは、カードランの点眼によるアジュバント効果を検討するうえで興味深い所見であると考えられた。

一方、結膜組織中 IL-1 β mRNA 発現量の検討において、P 群、CL 群に対して CH 群で IL-1 β mRNA 量が有意に増加したことは、カードランの結膜投与による IL-1 β mRNA 発現は濃度依存的に発現が増加する可能性が示唆された。結膜組織や他の粘膜組織において IL-1 β は、マクロファージから産生され、生体内の炎症に関与するとされている⁷¹⁾。特に、疾患とのかかわりあいでは、敗血症患者の血清中、関節リウマチ患者の滑膜中で IL-1 β の増加がみられると報告されている⁷²⁾⁷³⁾。また、免疫組織化学的検討において、IL-1 β の増加がみられる CH 群において、好中球および CD68 陽性細胞の浸潤も増加していた。これらの結果から、今回みられた IL-1 β mRNA の増加は、カードランによる炎症惹起作用による変化と推論される。同様の現象は、マウス樹状細胞におけるザイ

モザン、カードラン刺激においても報告されており⁷⁴⁾⁷⁵⁾、高濃度カードランは、結膜に対して起炎物質となる可能性が示唆された。これらの結果でみられるカードランの濃度により発現が増加するサイトカインが異なることや浸潤する炎症細胞の程度が異なることは、BDG が真菌感染症における起炎物質として作用することや、アジュバント物質として作用することなどを考え合わせると注目すべき反応であり、今後カードランの粘膜アジュバントとしての作用についても検討する必要があると考えられた。

また、ヒトマクロファージをカードランで刺激することで、dectin-1 を介して IL-18 産生が増加すると報告されている⁷⁶⁾。しかし、今回の実験では結膜組織中 IL-18 mRNA 発現量は P 群、CL 群、CH 群の 3 群間に差がみられなかったことから、結膜組織における IL-18 産生については、dectin-1 発現細胞の存在などを含めて、さらに検討する必要があると考えられた。また、カードラン投与によるアジュバント効果は dectin-1 を介し、NLRP3 インフラマゾームが活性化され、IL-18 の産生を誘導する経路がアジュバント効果に重要であるとの報告がある⁷⁴⁾。今回の検討では、結膜にカードランを投与することで濃度依存的に IL-18 が産生されることが証明されたが、結膜における粘膜アジュバントとしての作用に IL-18 がどのように関与するか、実際に BDG の特異的受容体である dectin-1 を介した経路がアジュバント作用に関係しているのかについてはさらなる検討が必要である。

カ) まとめ

結膜上皮細胞における **dectin-1** 発現が証明され、結膜上皮における **dectin-1** および **BAFF** 発現は、春季カタルなどのアレルギー炎症の病態の重症化に関与している可能性が示唆された。カードラン点眼投与は、点眼濃度の相違により結膜に惹起される炎症反応の病態が異なる。

謝辞

本研究の遂行におきまして、ご指導を賜りました日本大学医学部視覚科学系眼科学分野 澤 充 名誉教授、山崎芳夫准教授に深謝申し上げます。また、研究計画立案並びに論文執筆にあたりご指導賜りました日本大学医学部視覚科学系眼科学分野 庄司 純 臨床教授 稲田 紀子 診療准教授 中島 基宏 助教に深謝申し上げます。また同実験助手 石森 秋子氏に深謝申し上げます。

表

表 1: 対象

	例数	性差 (男:女)	年齢(歳) (平均± 標準偏差)	①	②
健常対照群	12例	6:6	33.7±7.08		○
上眼瞼結膜	12例			○	
下眼瞼結膜	10例			○	
眼球結膜耳側	10例			○	
シエーグレン群	6例	0:6	61.6±15.7		○
春季カタル群	10例	10:0	24.1±10.5		○

①部位別比較を行った群

②疾患別比較を行った群

表 2: 重症度観察スケール 5-5-5 方式

レベル	A項目	B項目	C項目
徴候	活動性巨大乳頭	眼瞼皮膚炎・眼瞼炎	瞼結膜乳頭
	輪部堤防状隆起	瞼結膜腫脹・ビロード状変化	瞼結膜濾胞
	落屑状SPK	Horner-Trantas斑	瞼結膜充血・赤点斑
	Shield Ulcer	球結膜浮腫・腫脹	球結膜充血
	下眼瞼乳頭:乳頭増殖	点状表層角膜症	涙液貯留・眼脂
スコア	各100点×5項目	各10点×5項目	各1点×5項目
レンジ	0~500点	0~50点	0~5点

判定:A項目+B項目+C項目=0~555点

表 3: 春季カタル重症度

重症度	症例数(例)	平均スコア(点) (平均±標準偏差)	レンジ(点)
軽症 (0~100)	5	24.8±10.4	12~44
中等症 (100~199)	4	123.8±7.4	113~134
重症 (200~555)	1	224±0	224

図

図 1 : オキュラーサーフェスの構造

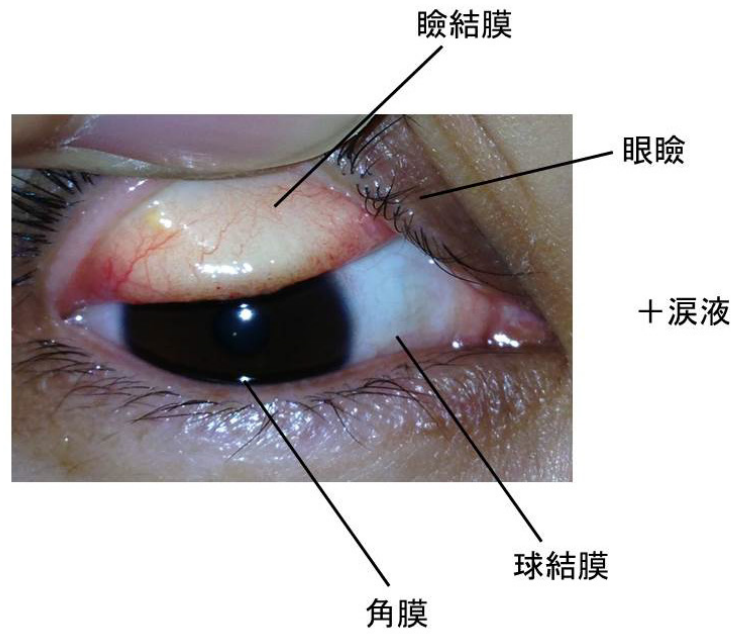


図 2 : 角膜の構造

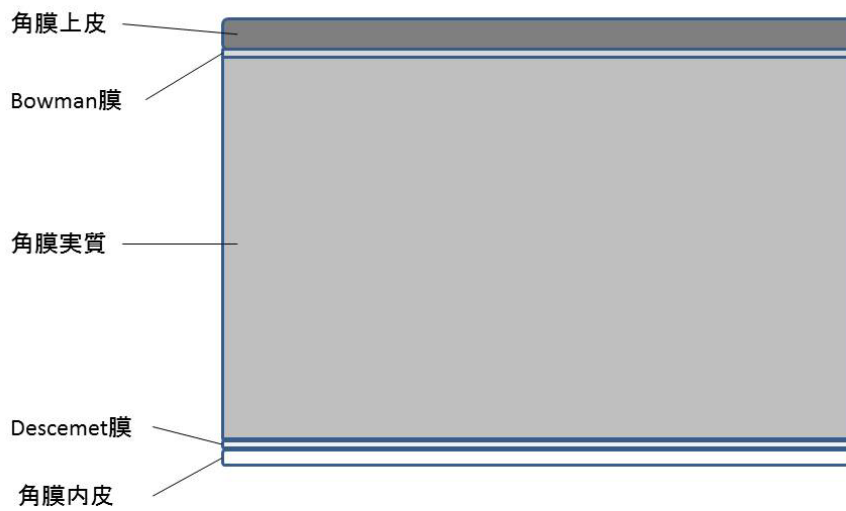


図 3 : 結膜の構造

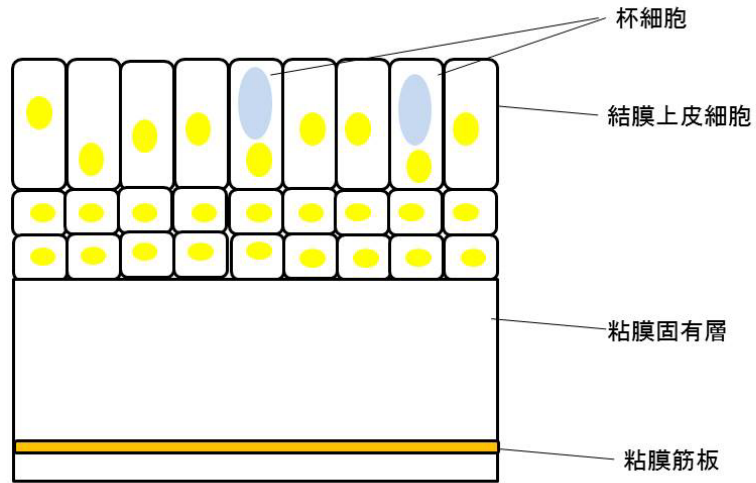


図 4 : 涙液層の構造

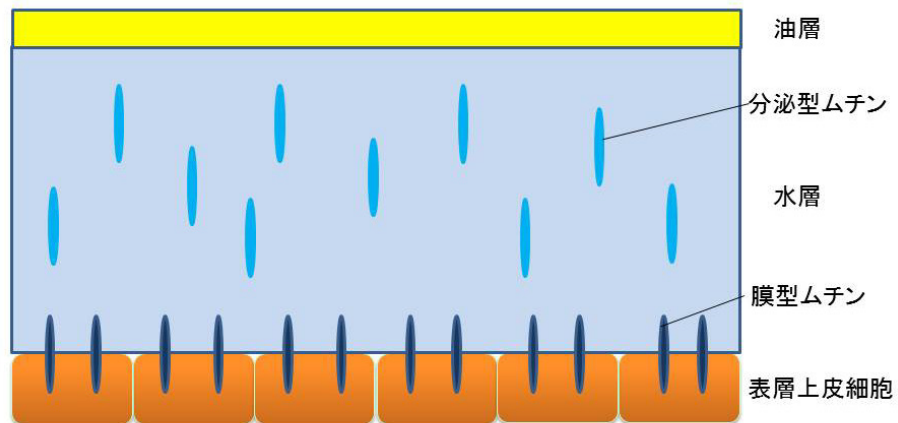


図 5 : 生体における dectin-1 を介した真菌防御機構

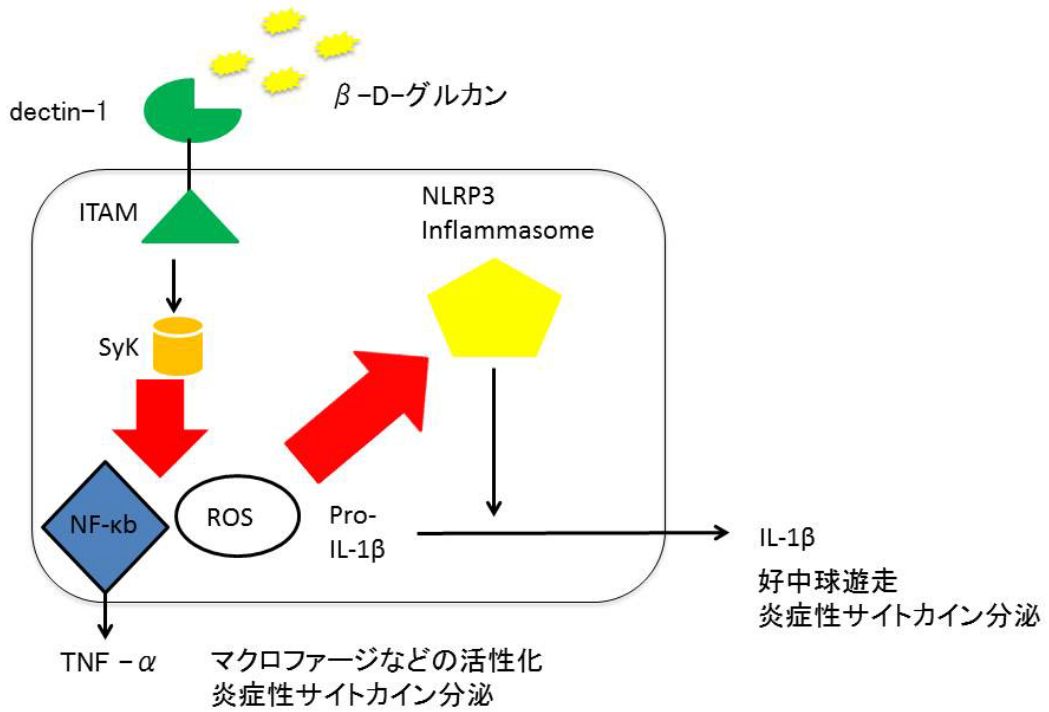


図 6 : 蛍光抗体法による健常者結膜上皮の dectin-1 染色写真

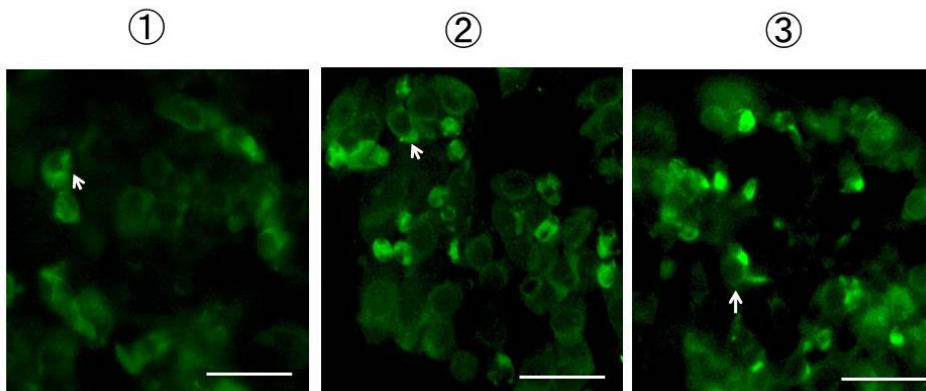


図 7: 蛍光抗体法による健常者結膜上皮の dectin-1/cytokeratin 13 の 2 重染色写真

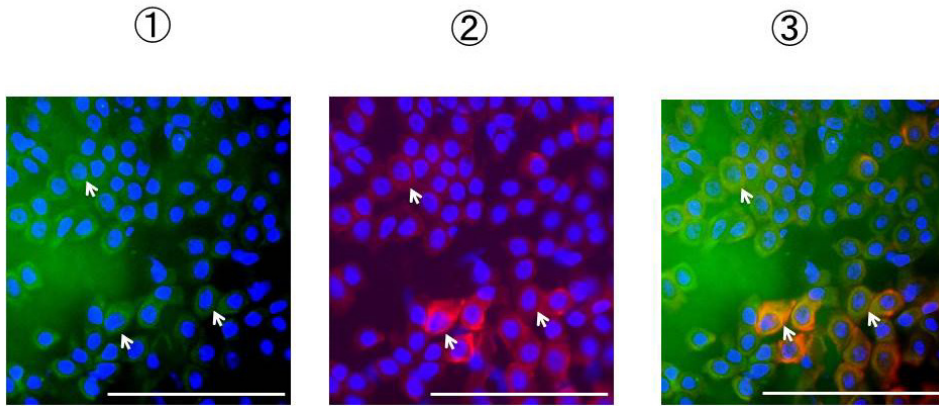


図 8 : 健常者結膜上皮での dectin-1 mRNA 発現量の部位別比較

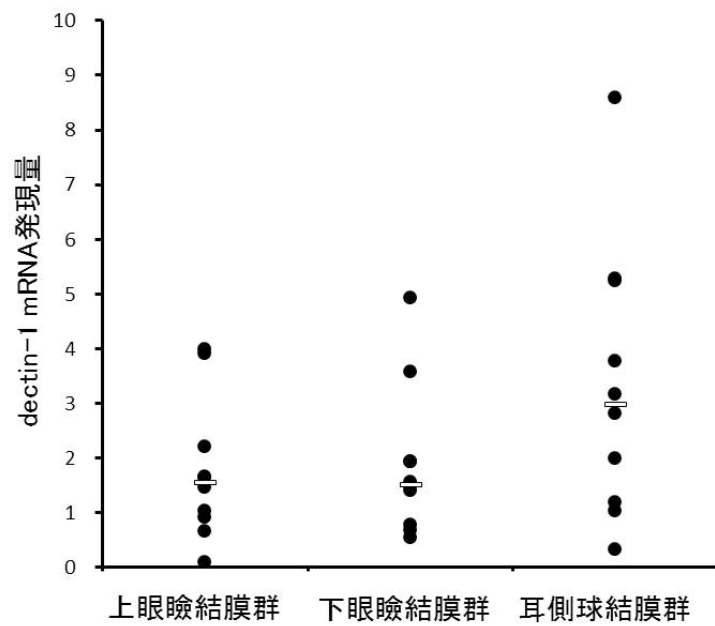


図 9：疾患別の上眼瞼結膜上皮での dectin-1 mRNA 発現量の比較

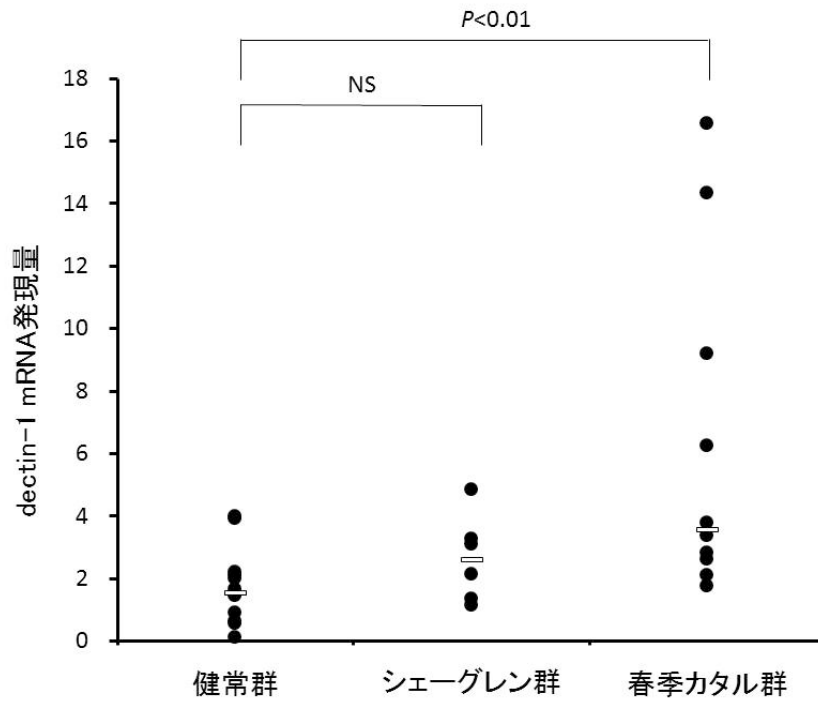


図 10：疾患別の上眼瞼結膜上皮での BAFF mRNA 発現量の比較

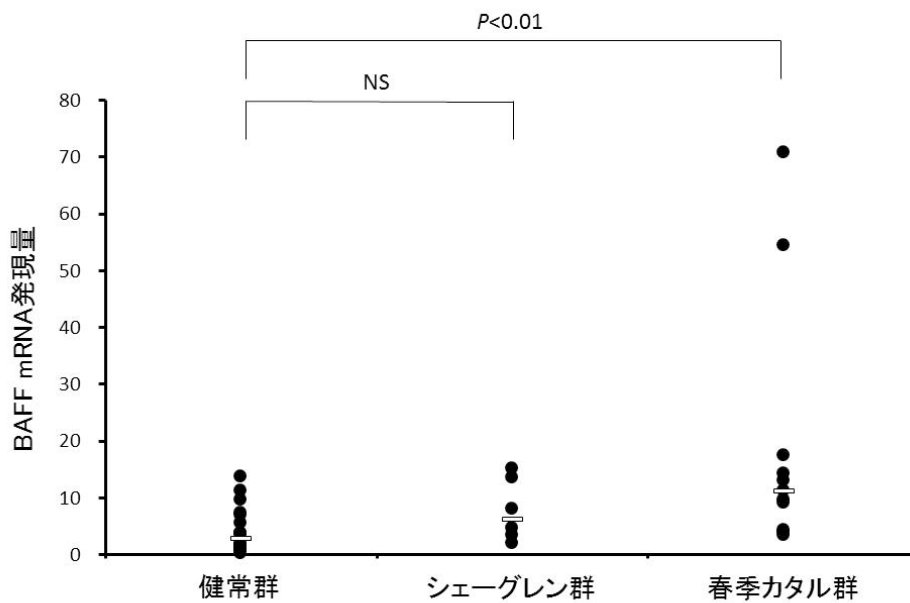


図 11 : dectin-1 mRNA 発現と BAFF mRNA 発現との相関

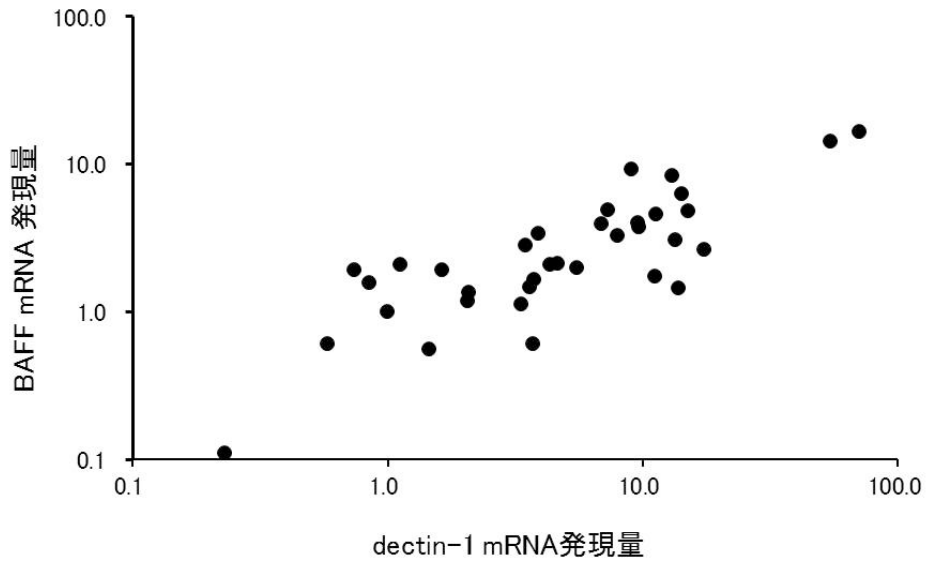


図 12 : 春季カタル症例の重症度別 dectin-1 mRNA 発現量の比較

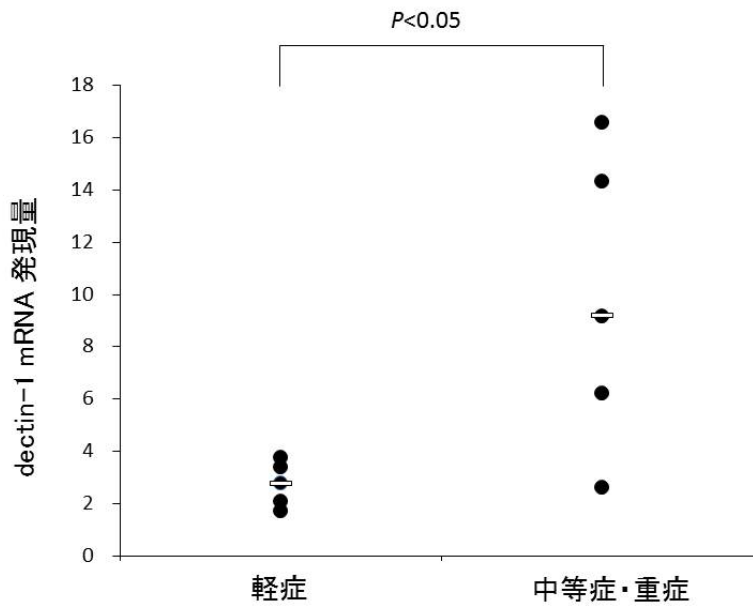


図 13 : 春季カタル症例の重症度別 BAFF mRNA 発現量の比較

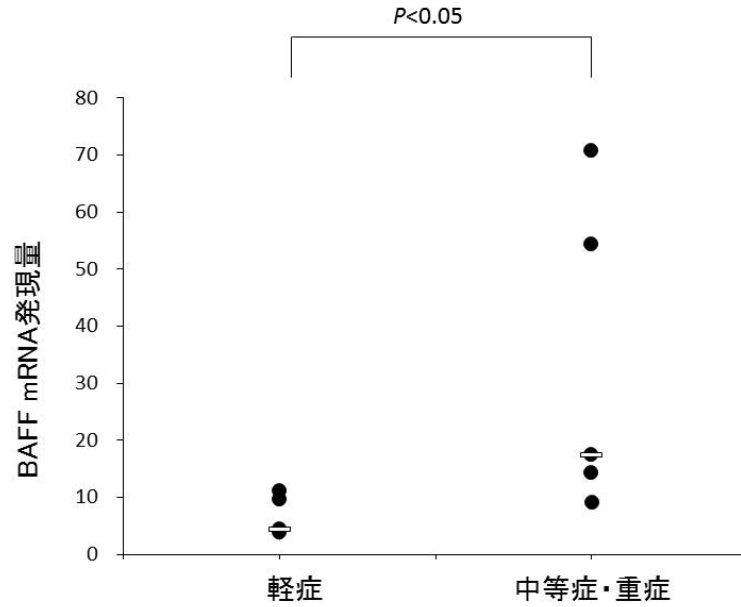


図 14 : OK-432 刺激による培養結膜上皮細胞における dectin-1 および BAFF mRNA 発現の検討

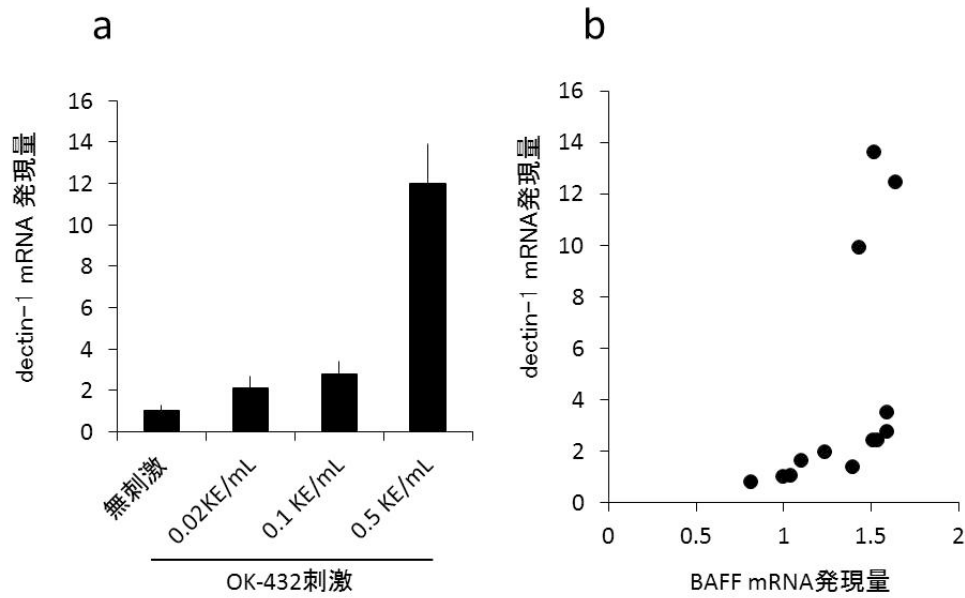


図 15 : レーザーマイクロダイセクション法による組織切り出し範囲
(トルイジンブルー染色)

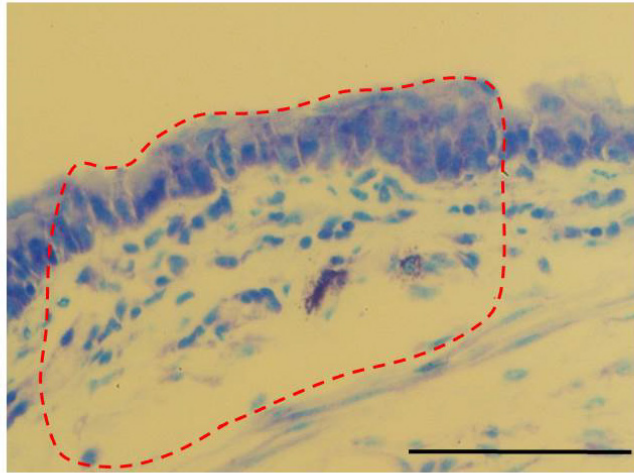


図 16 : GR-1 陽性細胞密度

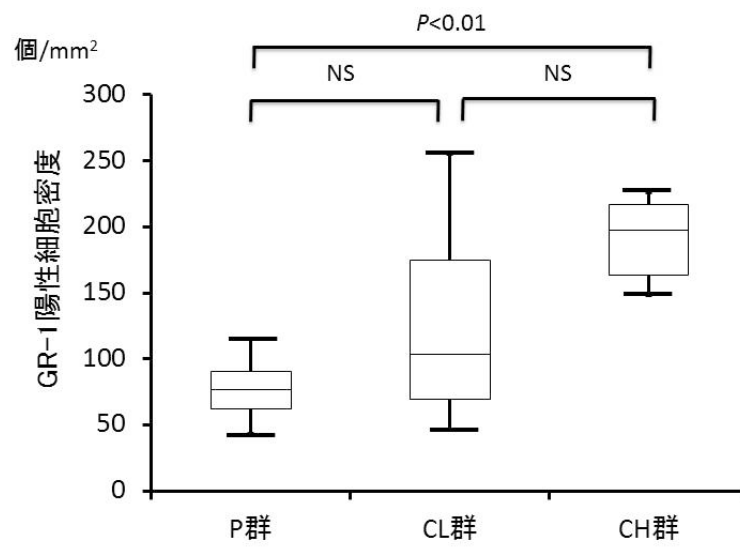


図 17 : マウス結膜組織の抗 CD68 染色写真

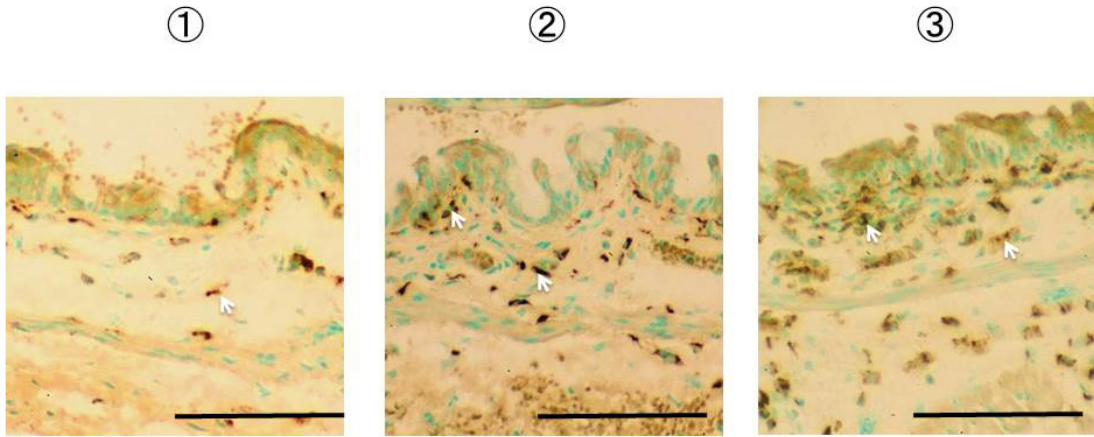


図 18 : CD68 陽性細胞密度

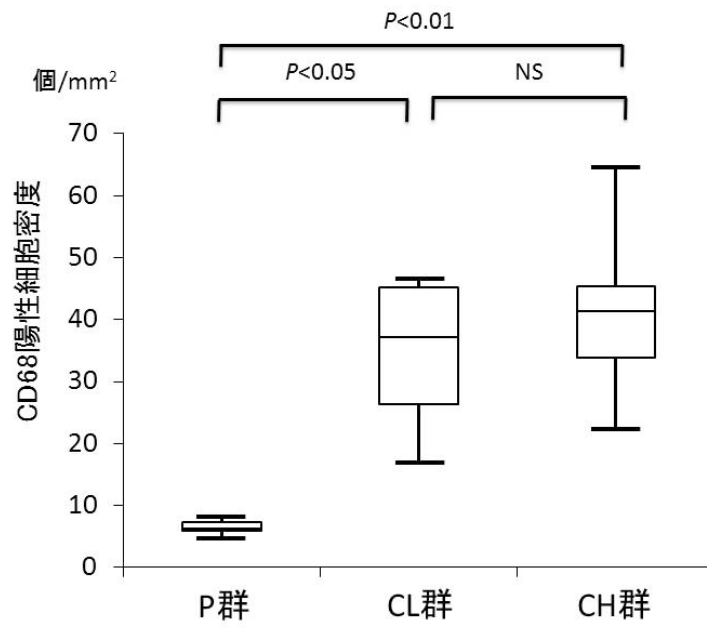


図 19 : 結膜組織中 TNF- α mRNA 発現量の検討

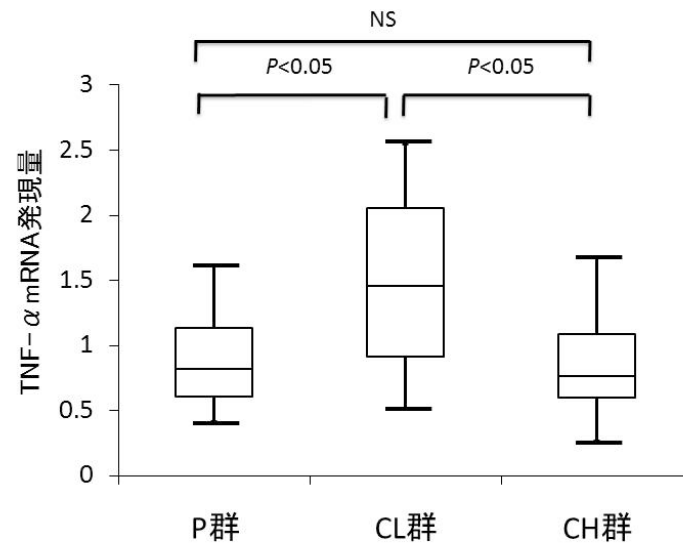


図 20 : 結膜中 IL-1 β mRNA 発現量の検討

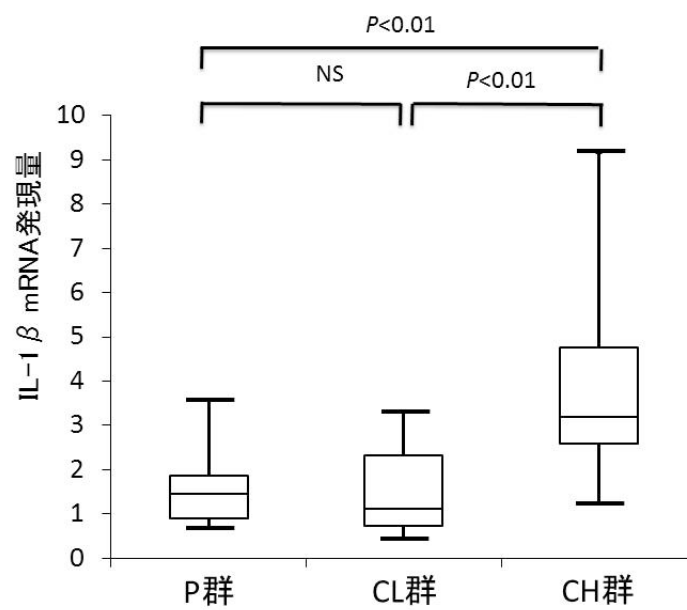
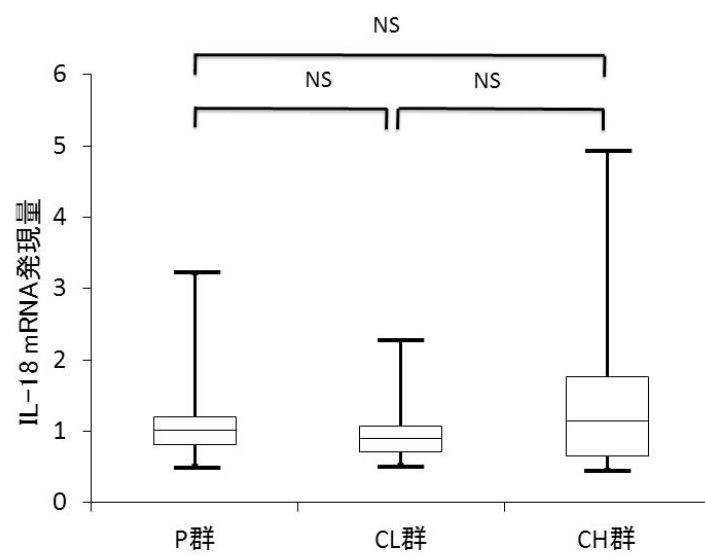


図 21 : IL-18 mRNA 発現量の検討



図説

図 1 : オキユラーサーフェスの構造

図 2 : 角膜の構造

図 3 : 結膜の構造

図 4 : 涙液層の構造

図 5 : 生体における dectin-1 を介した真菌防御機構

ROS: reactive oxygen species

SyK: spleen tyrosine kinase

ITAM: immunoreceptor tyrosine-based activation motif

TNF- α : tumor necrosis factor alpha

IL-1 β : interleukin-1 beta

図 6 : 蛍光抗体法による健常者結膜上皮の dectin-1 染色写真

① 上眼瞼結膜、②下眼瞼結膜、③耳側球結膜。

bar = 100 μ m, 矢印 : dectin-1 陽性細胞

図 7: 蛍光抗体法による健常者結膜上皮の dectin-1/cytokeratin 13 の 2 重染色写真

① dectin-1 (Alexa Fluor[®] 488)、②cytokeratin13 (Alexa Fluor[®] 546)、③2重染色

bar = 100 μ m

矢印の細胞は dectin-1、cytokeratin13、どちらも陽性であった。

図 8 : 健常者結膜上皮での dectin-1 mRNA 発現量の部位別比較

dectin-1 mRNA 発現量に、部位別の差はない。 bar : 中央値

図 9 : 疾患別の上眼瞼結膜上皮での dectin-1 mRNA 発現量の比較

dectin-1 mRNA 発現量の疾患別比較では、健常群とシェーグレン群との間に差はないが、春季カタル群は健常群に比較して有意に増加している ($p < 0.01$, Kruskal-Wallis H-test、多重比較 Dunn 法)。 bar : 中央値

NS: not significant

図 10 : 疾患別の上眼瞼結膜上皮での BAFF mRNA 発現量の比較

BAFF mRNA 発現量の疾患別比較では、健常群とシェーグレン群との間に差はない。春季カタル群は健常群に比較して有意に増加している ($p < 0.01$, Kruskal-Wallis H-test、多重比較 Dunn 法)。

bar : 中央値

NS: not significant

図 11 : dectin-1 mRNA 発現と BAFF mRNA 発現との相関

dectin-1 mRNA と BAFF mRNA との発現量には有意な正の相関が見られる。

($P < 0.001$, $r = 0.75$, Spearman 順位相関係)

図 12 : 春季カタル症例の重症度別 dectin-1 mRNA 発現量の比較

春季カタル症例の重症度別 dectin-1 mRNA 発現量の比較では、軽症群に比較して中等症以上の群で有意に増加している ($P < 0.05$ Mann-Whitney

U-test)。

bar : 中央値

図 13 : 春季カタル症例の重症度別 BAFF mRNA 発現量の比較

春季カタル症例の重症度別 BAFF mRNA 発現量の比較では、軽症群に比較して中等症以上の群で有意に増加している ($P < 0.05$ Mann-Whitney U-test)。

bar : 中央値

図 14 : OK-432 刺激による培養結膜上皮細胞における dectin-1 および BAFF mRNA 発現の検討

a: 培養結膜上皮細胞を OK-432 で刺激すると、dectin-1 mRNA 発現が、OK-432 の濃度に比例して増加した ($P < 0.05$, Kruskal-Wallis H-test)。

b: 培養結膜上皮細胞の dectin-1 mRNA 発現と BAFF mRNA 発現とは有意に相関した ($r=0.85$, $P < 0.005$, Spearman 順位相関係数)

図 15 : レーザーマイクロダイセクション法による組織切り出し範囲

(トルイジンブルー染色)

結膜上皮表面から粘膜筋板直上までの結膜組織 (赤枠の範囲) をレーザーマイクロダイセクション法で切り出した。Bar = $100 \mu\text{m}$ 。

図 16 : GR-1 陽性細胞密度

GR-1 陽性細胞密度は P 群に対して CH 群で有意に高値であった。(Steel-Dwass 法, $P < 0.01$)

NS: no significance

図 17 : マウス結膜組織の抗 CD68 染色写真

① PBS 群、②低濃度群、③高濃度群。

bar =100 μ m, 矢印 : CD68 陽性細胞

図 18 : CD68 陽性細胞密度

CD68 陽性細胞数密度は P 群に対して CL 群、CH 群では有意に高値を示した (Steel-Dwass 法, $P < 0.01$)。

NS: no significance

図 19 : 結膜組織中 TNF- α mRNA 発現量の検討

TNF- α mRNA 発現量は P 群、CH 群に対して CL 群で有意に高値を示した (Steel-Dwass 法, $P < 0.05$)。

NS: no significance

TNF- α : Tumor necrosis factor alpha

図 20 : 結膜中 IL-1 β mRNA 発現量の検討

IL-1 β mRNA 発現量は P 群、CL 群に対して CH 群で有意に高値を示した (Steel-Dwass 法, $P < 0.01$)。

NS: no significance

IL-1 β : Interleukin-1 beta

図 21 : IL-18 mRNA 発現量の検討

IL-18 mRNA 発現量は 3 群間で有意な差はなかった。

NS: no significance

IL-18: Interleukin-18

引用文献

- 1) Thoft RA: Conjunctival transplantation. Arch Ophthalmol. 95: 1425-1427, 1977.
- 2) Kimura K, Teranishi S, Fukuda K, Kawamoto K, Nishida T: Delayed disruption of barrier function in cultured human corneal epithelial cells induced by tumor necrosis factor- α in a manner dependent on NF- κ B. Invest Ophthalmol Vis Sci. 49: 565-571, 2008.
- 3) Marshall GE, Konstas AG, Lee WR: Collagens in ocular tissues. Br J Ophthalmol 77: 515-524, 1993.
- 4) Meek KM, Boote C: The organization of collagen in the corneal stroma. Exp Eye Res 78: 503-512, 2004.
- 5) Yue BY, Sugar J, Schrode K: Collagen staining in corneal tissues. Curr Eye Res 5: 559-564, 1986.
- 6) Nishida T, Yasumoto K, Otori T, Desaki J: The network structure of corneal fibroblasts in the rat as revealed by scanning electron microscopy. Invest Ophthalmol Vis Sci 29: 1887-1890, 1988.
- 7) Fitch JM, Birk DE, Linsenmayer C, Linsenmayer TF: The spatial organization of Descemet's membrane-associated type IV collagen in the avian cornea. J Cell Biol. 110: 1457-1468, 1990.
- 8) Sawada H, Konomi H, Hirosawa K: Characterization of the collagen in the hexagonal lattice of Descemet's membrane: its relation to type VIII collagen. J Cell Biol. 110: 219-227, 1990.
- 9) Gipson IK: Distribution of mucins at the ocular surface. Exp Eye Res 78: 379-388, 2004.

- 10)堀裕一: ムチンと眼の乾き. あたらしい眼科 22: 289-294,2005.
- 11)横井則彦, Georgiev GA: 涙液の液層と油層の密接な関係. 眼科 52: 1763-1770, 2010.
- 12)横井則彦, Georgiev GA: マイボーム腺の臨床的機能評価. あたらし眼科 28: 1073-1079, 2011.
- 13)Sacks EH, Wiczorek R, Jakobiec FA, Knowles DM 2nd: Lymphocytic subpopulations in the normal human conjunctiva: a monoclonal antibody study. *Ophthalmology* 93: 1276-1283, 1986.
- 14)Gillete TE, Chandler JW, Greiner JV: Langerhans cells of the ocular surface. *Ophthalmology* 89: 700-711, 1982.
- 15) Rosenberg ME, Tervo TM, Müller LJ, Moilanen JA, Vesaluoma MH: In vivo confocal microscopy after herpes keratitis. *Cornea* 21: 265-269, 2002.
- 16) Knop E, Knop N, Claus P: Local production of secretory IgA in the eye-associated lymphoid tissue (EALT) of the normal human ocular surface. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 49: 2322-2329, 2008.
- 17)Tomasi TB Jr, Larson L, Challacombe S, McNabb P: Mucosal immunity: the origin and migration patterns of cells in the secretory system. *J Allergy Clin Immunol* 65: 12-19, 1980.
- 18) Knop N, Knop E: Conjunctiva-associated lymphoid tissue in the human eye. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 41: 1270-1279, 2000.
- 19) 稲田紀子, 庄司 純, 高浦典子, 澤 充: 結膜関連リンパ装置におけるリンパ球ホーミングの形態学的検討. 日眼会誌 99: 1111-1118, 1995.
- 20) Knop N, Knop E: Lacrimal drainage-associated lymphoid tissue (LDALT): a part of the human mucosal immune system. *Invest*

- Ophthalmol Vis Sci 42: 556-574, 2001.
- 21) 庄司 純, 崎元 卓, 北野周作, 石井康夫: ムチンの浄化作用. 日眼会誌 92: 2038-2047, 1988.
 - 22) Kruzel ML, Actor JK, Boldogh I, Zimecki M: Lactoferrin in health and disease. Postepy Hig Med Dosw(online) 61:261-267,2007.
 - 23) Ikeda A, Sakimoto T, Shoji J, Sawa M: Expression of α - and β - defensins in human ocular surface tissue. Jpn J Ophthalmol 49: 73-78, 2005.
 - 24) 上田真由美: 眼表面の自然免疫と TLRs. 感染・炎症・免疫 36: 156-159, 2006.
 - 25) Kojima K, Ueta M, Hamuro J, Hozono Y, Kawasaki S, Yokoi N, et al: Human conjunctival epithelial cells express function Toll-like receptor 5. Br J Ophthalmol 92: 411-416, 2008.
 - 26) Ueta M, Hamuro J, Kiyono H, Kinoshita S: Triggering of TLR3 by polyI:C in human corneal epithelial cells to induce inflammatory cytokines. Biochem Biophys Res Commun 331: 285-294, 2005.
 - 27) Hozono Y, Ueta M, Hamuro J, Kojima K, Kawasaki S, Yamazaki K, et al: Human corneal epithelial cells respond to ocular-pathogenic, but not to nonpathogenic-flagellin. Biochem Biophys Res Commun 347: 238-247, 2006.
 - 28) Ueta M: Innate immunity of the ocular surface and ocular surface inflammatory disorders. Cornea 27: 31-40, 2008.
 - 29) Saijo S, Fujikado N, Furuta T, Chung SH, Kotaki H, Seki K, et al: Dectin-1 is required for host defense against *Pneumocystis carinii* but not against *Candida albicans*. Nat Immunol 8: 39-46, 2007.

- 30) Brown GD, Gordon S: Immune recognition. A new receptor for β -glucans. *Nature* 413: 36-37, 2001.
- 31) 西城忍, 岩倉洋一郎: 生体防御機構における Dectin-1 の役割. *臨床免疫・アレルギー科* 49: 101-108, 2008.
- 32) Steele C, Rapaka RR, Metz A, Pop MS, Williams LD, Gordon S, et al: The beta-gulucan receptor dectin-1 recognizes specific morphologies of *Aspergillus fumigatus*. *PLoS Pathog* 1: 323-334, 2005
- 33) Lilly LM, Gessner MA, Dunaway CW, Metz AE, Schwiebert L, Weaver CT, et al: The β -glucan receptor dectin-1 promotes lung immunopathology during fungal allergy via IL-22. *J Immunol* 189: 3653-3660, 2012.
- 34) Yoshitomi H, Sakaguchi N, Kobayashi K, Brown GD, Tagami T, Sakihama T, et al: A role for fungal beta-glucans and their receptor Dectin-1 in the induction of autoimmune arthritis in genetically susceptible mice. *J Exp Med* 201: 949-960, 2005.
- 35) Schneider P, MacKay F, Steiner V, Hofmann K, Bodmer JL, Holler N, et al: BAFF, a novel ligand of the tumor necrosis factor family, stimulates B cell growth. *J Exp Med* 189: 1747-1756, 1999.
- 36) Roschke V, Sosnovtseva S, Ward CD, Hong JS, Smith R, Albert V, et al: BLys and APRIL from biologically active heterotrimers that are expressed in patients with systemic immune-based rheumatic diseases. *J Immunol* 169: 4314-4321, 2002.
- 37) 吉本桂子, 竹内勤: 自己免疫疾患の病因病態における BAFF の役割 -治療標的としての可能性- *臨床免疫・アレルギー科* 47: 523-527, 2007.
- 38) Gross JA, Johnston J, Mudri S, Enselman R, Dillon SR, Madden K, et

- al: TACI and BCMA are receptors for a TNF homologue implicated in B-cell autoimmune disease. *Nature* 404: 995-999, 2000.
- 39) Mariette X, Roux S, Zhang J, Bengoufa D, Lavie F, Zhou T, et al: The level of BLyS (BAFF) correlates with the titre of autoantibodies in human Sjögren's syndrome. *Ann Rheum Dis* 62: 168-171, 2003.
- 40) Kato A, Truong-Tran AQ, Scott AL, Matsumoto K, Schleimer RP: Airway epithelial cells produce B cell-activating factor of TNF family by an IFN-beta-dependent mechanism. *J Immunol* 177: 7164-7172, 2006.
- 41) Olynych TJ, Jakeman DL, Marshall JS: Fungal zymosan induces leukotriene production by human mast cells through a dectin-1-dependent mechanism. *J Allergy Clin Immunol* 118: 837-843, 2006.
- 42) Kawashima S, Hirose K, Iwata A, Takahashi K, Ohkubo A, Tamachi T, et al: β -glucan curdlan induces IL-10-producing CD4⁺ T cells and inhibits airway inflammation. *J Immunol* 189: 5713-5721, 2012.
- 43) Xu X, Yasuda M, Nakamura-Tsuruta S, Mizuno M, Ashida H: β -glucan from *Lentinus edodes* inhibits nitric oxide and tumor necrosis factor- α production and phosphorylation of mitogen-activated protein kinases in lipopolysaccharide-stimulated murine RAW 264.7 macrophages. *J Biol Chem* 287: 871-878, 2012.
- 44) Hida S, Miura NN, Adachi Y, Ohno N: Cell wall β -glucan Derived from *Candida albicans* Acts as a Trigger for Autoimmune Arthritis in SKG Mice. *Biol. Pharm. Bull* 30: 1589-1592, 2007.
- 45) 足立禎之, 大野尚仁 : 真菌多糖の免疫系による認識とその活性化作用. 日本医真菌学会雑誌 47: 185-194, 2006.

- 46) 深川和己, 榛村重人, 島崎 潤, 坪田一男, 小口芳久: 結膜上皮ブラッシュュサイトロロジーの細胞学的小よび組織学的検討 日眼会誌 97: 1173-1178, 1993.
- 47) 高野真由美, 清水聡子, 後藤 晋, 小坂井 守: 角結膜上皮疾患に対する Impression cytology. 眼紀 54: 420-424, 2003.
- 48) Singh R, Joseph A, Umapathy T, Tint NL, Dua HS: Impression cytology of the ocular surface. Br J Ophthalmol 89: 1655-1659, 2005.
- 49) 渡辺雅子, 朝倉光司, 齋藤博子, 形浦昭克: 鼻アレルギーマウスモデル作成の試み アレルギー 45: 1127-1132, 1996.
- 50) Hogan SP, Koskinen A, Foster PS: Interleukin-5 and eosinophils induce airway damage and bronchial hyperreactivity during allergic airway inflammation in BALB/c mice. Immunol Cell Biol 75: 284-288, 1997.
- 51) 西藤俊輔, 杉本幸雄, 亀井千晃: マウスのアレルギー性結膜炎モデルに対する脂質メディエーター関連化合物の効果. あたらしい眼科 26: 671-674, 2009.
- 52) Shoji J, Sakimoto T, Muromoto K, Inada N, Sawa M, Ra C: Comparison of topical dexamethasone and topical FK506 treatment for the experimental allergic conjunctivitis model in Balb/c mice. Jpa J Ophthalmol. 49: 205-210, 2005.
- 53) 小沢晶彦, 市頭教克, 内尾英一: 春季カタルの増悪と黄砂の観測時期の関連. あたらし眼科 25: 1281-1284, 2008.
- 54) Ichinose T, Nishikawa M, Takano H, Sera N, Sadakane K, Mori I, et al: Pulmonary toxicity induced by intratracheal instillation of Asia yellow dust (Kosa) in mice. Environ Toxicol Pharmacol 20: 48-56, 2005.
- 55) 藤林孝司, 菅井進, 宮坂信之 他: シェーグレン症候群改訂診断基準, 厚生省

- 特定疾患免疫疾患調査研究班,平成 10 年度研究報告書: 135-138, 1999.
- 56) アレルギー性結膜疾患診療ガイドライン作成委員会 : 特集 : アレルギー性結膜疾患診療ガイドライン (第 2 版) . 日眼会誌 114: 829-870, 2010.
- 57) Shoji J, Inada N, Sawa M: Evaluation of novel scoring system named 5-5-5 exacerbation grading scale for allergic conjunctivitis disease. *Allergol Int* 58: 591-597, 2009.
- 58) Barbaro V, Ferrari S, Fasolo A, Pedrotti E, Marchini G, Sbabo A, et al: Evaluation of ocular surface disorders: a new diagnostic tool based on impression cytology and confocal laser scanning microscopy. *Br J Ophthalmol* 94: 926-932, 2010.
- 59) Ramirez-Miranda A, Nakatsu MN, Zarei-Ghanvati S, Nguyen CV, Deng SX: Keratin 13 is a more specific marker of conjunctival epithelium than keratin 19. *Mol Vis* 17:1652-1661, 2011.
- 60) de Koning HD, Rodijk-Olthuis D, van Vlijmen-Willems IM, Joosten LA, Netea MG, Schalkwijk J, et al: A comprehensive analysis of pattern recognition receptors in normal and inflamed human epidermis: upregulation of dectin-1 on psoriasis. *J Invest Dermatol* 130: 2611-2620, 2010.
- 61) Rand TG, Sun M, Gilyan A, Downery J, Miller J: Dectin-1 and inflammation-associated gene transcription and expression in mouse lungs by a toxic (1,3)- β -D glucan. *Arch Toxicol* 84: 205-220, 2010.
- 62) 松下貴志,佐藤伸一 : BAFF と自己免疫性疾患. 日本臨床免疫学会会誌 28 : 333-342, 2005.
- 63) 北澤 実, 庄司 純, 稲田紀子, 澤 充, 加藤博司 : アレルギー性結膜疾患患者における涙液中特異的 IgE 抗体の測定. 日眼会誌 107 : 578-582, 2003.

- 64) Ballou M, Mendelson L : Specific immunoglobulin E antibodies in tear secretions of patients with vernal conjunctivitis. *J allergy Clin Immunol* 66: 112-118, 1980.
- 65) Mariette X, Roux S, Zhang J, Bengoufa D, Lavie F, Zhou T, et al: The level of BLyS (BAFF) correlates with the titre of autoantibodies in human Sjögren's syndrome. *Ann Rheum Dis* 62: 168-171, 2003.
- 66) Mackay F, Woodcock SA, Lawton P, Ambrose C, Baetscher M, Schneider P, et al: Mice transgenic for BAFF develop lymphocytic disorders along with autoimmune manifestations. *J Exp Med* 190: 1697-1710, 1999.
- 67) Kyan-Aung U, Haskard DO, Poston RN, Thornhill MH, Lee TH: Endothelial leukocyte adhesion molecule-1 and intercellular adhesion molecule-1 mediate the adhesion of eosinophils to endothelial cells in vitro are expressed by endothelium in allergic cutaneous inflammation in vivo. *J Immunol* 146: 521-528, 1991.
- 68) 森亮一, 間所俊介, Kim Sang Eun, 小松利光, 千葉卓哉, 坪井貴司, 他: マクロファージからのサイトカイン分泌に關与する低分子 G タンパク質 Rab ファミリーの機能解析 基礎老化研究 35:33-36,2011.
- 69) Wouters IM, Douwes J, Thorne PS, Heederick D, Doekes G: Inter- and intraindividual variation of endotoxin- and beta(1 → 3)-glucan-induced cytokine responses in a whole blood assay. *Toxicol Ind Health*. 18: 15-27, 2002.
- 70) Eisenbarth SC, Colegio OR, O'Connor W, Sutterwala FS, Flavell RA: Crucial role for the Nalp3 inflammasome in the immunostimulatory properties of aluminum adjuvants. *Nature*. 453, 1122-1126, 2008.
- 71) Suzuki K, Hino M, Kutsuna H, Hato F, Sakamoto C, Takahashi T, et al:

- Selective activation of p38 mitogen-activated protein kinase cascade in human neutrophils stimulated by IL-1beta. *J Immunol* 167: 5940-5947, 2001.
- 72) McCall CE, Grosso-Wilmoth LM, LaRue K, Guzman RN, Cousart SL: Tolerance to endotoxin-induced expression of the interleukin-1 beta gene in blood neutrophils of humans with the sepsis syndrome. *J Clin Invest* 91: 853-861, 1993.
- 73) Farahat MN, Yanni G, Poston R, Panayi GS: Cytokine expression in synovial membranes of patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *Ann Rheum Dis* 52: 870-875, 1993.
- 74) Kumar H, Kumagai Y, Tsuchida T, Koenig PA, Satoh T, Guo Z, et al: Involvement of the NLRP3 inflammasome in innate and humoral adaptive immune responses to fungal beta - glucan. *J Immunol.* 183, 8061-8067, 2009.
- 75) Lamkanfi M, Malireddi RK, Kanneganti TD: Fungal zymozan and mannan activate the cryopyrin inflammasome. *J Biol Chem* 284:20574-205781, 2008.
- 76) Kankkunen P, Teirilä L, Rintahaka J, Alenius H, Wolff H, Matikainen S: (1,3)-beta-glucans activate both dectin-1 and NLRP3 inflammasome in human macrophages. *J Immunol* 184: 6335-6342, 2010.

研 究 業 績

吉田 圭

I 発表	①一般発表	10
	②特別発表	0
II 論文	①原著論文	0
	②症例報告	0
	③総論	0
III 著書		0

I 発表

① 一般発表

1. 吉田圭, 石川弘: 日食性網膜症が疑われた1例, 第78回神経眼科勉強会, 東京, 2010年7月
2. 吉田圭, 稲田紀子, 庄司純, 澤充: 混合感染が疑われたアcantアムエバ角膜炎の1例, 第767回東京眼科集談会, 東京, 2010年8月
3. 吉田圭, 庄司純, 石森秋子, 中島基宏, 稲田紀子, 澤充: 結膜上皮におけるDectin-1 mRNA発現量の検討, 第64回日本臨床眼科学会, 兵庫, 2010年11月
4. 吉田圭, 石川弘, 渡邊学郎, 藤原徳生: 日蝕観察を契機に発見された海綿静脈洞血管腫の1例, 第503回日大医学会例会, 東京, 2011年3月
5. 吉田圭, 庄司純, 加藤博司, 及川亜希, 稲田紀子, 澤充: アレルギー性結膜疾患におけるカモガヤ花粉の関与, 第45回日本眼炎症学会, 京都, 2011年7月
6. 庄司純, 中島基宏, 吉田圭, 石森秋子, 稲田紀子, 澤充: 結膜上皮におけるCCL20 mRNA発現の検討: 健常者と春季カタル, 第45回日本眼炎症学会, 京都, 2011年7月
7. 吉田圭, 石川弘, 寺本紘子: 開散麻痺を呈したWernicke 脳症の1例, 第105回日大眼科症例検討会, 東京, 2012年6月
8. 朝生浩, 堀眞輔, 吉田圭, 菊池善公, 立花敦子, 嘉村由美: ガンシクロビルが奏功した超高齢者の進行性網膜外層壊死, 第106回日大眼科症例検討会, 東京, 2012年9月
9. 吉田圭, 石森秋子, 稲田紀子, 庄司純, 澤充: β -D-グルカン点眼で誘導される結膜組織の免疫学的変化の検討, 第66回日本臨床眼科学会, 京都, 2012年10月

10. 中島正巳, 朝生浩, 中安弘毅, 吉田圭: 40度下向き姿勢による気体黄斑下血腫移動術が奏功した2症例, 第66回日本臨床眼科学会, 京都, 2012年10月

② 特別発表 なし

II 論文

① 原著論文 なし

② 症例報告 なし

③ 総論 なし

III 著書 なし