

モルモットアレルギー性結膜炎モデルでの コレラトキシン B の免疫抑制効果

齋藤 圭子, 庄司 純, 稲田 紀子, 岩崎 隆, 澤 充

日本大学医学部眼科学教室

要 約

目 的：モルモットのアレルギー性結膜炎モデルを用い、局所免疫を利用した粘膜免疫療法によるアレルギー性結膜炎発症抑制の可能性について検討した。

方 法：前処置としてアレルギー性結膜炎作製のための感作前にコレラトキシン B (cholera-toxin B, CTB) (4 µg/30 ml) と卵白アルブミン (ovalbumin) (10 µg/30 ml) との混合液を点眼した CTB 点眼群 6 匹および非処置群 5 匹の 2 群に分けて行った。アレルギー性結膜炎モデルは、卵白アルブミン (100 µg/ml) と水酸化アルミニウム (5 mg/ml) の混合液を 2 週間隔、2 回の腹腔内投与で感作を行い、卵白アルブミン (5 mg/ml) を点眼して作製した。

結 果：CTB 群における臨床スコアは、点眼 30 分後において球結膜充血 ($p < 0.01$)、球結膜浮腫 ($p < 0.05$)、眼瞼浮腫 ($p < 0.01$) とともに非処置群に比較して有意に抑制されていた。組織学的検討では、6, 24 時間ともに CTB 群において好酸球の上皮内への浸潤および結膜上皮障害が非処置群に比較して軽度であった。

結 論：CTB と抗原の感作前点眼は、実験的アレルギー性結膜炎の発症を抑制する効果を有すると考えられた。(日眼会誌 103 : 734—740, 1999)

キーワード：コレラトキシン B, 粘膜免疫, アレルギー性結膜炎

Immunosuppressive Effect of Cholera Toxin B on Allergic Conjunctivitis Model in the Guinea Pig

Keiko Saito, Jun Shoji, Noriko Inada, Yutaka Iwasaki and Mitsuru Sawa

Department of Ophthalmology, Nihon University School of Medicine

Abstract

Purpose : To investigate the immunosuppressive effects of mucosal immune therapy in experimental allergic conjunctivitis.

Method : We used 11 white Hartrey guinea pigs divided into two groups. Six animals (treated group) received pretreatment with topical instillation of cholera toxin B (4 µg/30 ml) and ovalbumin (10 µg/30 ml). The other group of 5 animals served as control. All the animals received intraabdominal injection of ovalbumin (100 g/ml) and aluminium hydroxide (5 mg/ml) repeated twice 2 weeks apart. Allergic conjunctivitis was induced by topical instillation of ovalbumin solution (5 mg/ml) one week after the above procedure.

Result : Both groups developed palpebral and bulbar edema with hyperemia 30 minutes after instilla-

tion. The allergic reaction was significantly less in score in the treated than in control group (Mann-Whitney U-test : $p < 0.01$). The clinical findings subsided after 6 hours. The treated group showed less eosinophilic infiltration in the conjunctiva and the limbus, particularly in the conjunctival epithelium, than in control group at 6 and 24 hours.

Conclusion : Pretreatment with topical cholera toxin B and antigen suppresses clinical and histological findings in experimentally induced allergic conjunctivitis. (J Jpn Ophthalmol Soc 103 : 734—740, 1999)

Key words : Cholera toxin B, Mucosal immunity, Allergic conjunctivitis

I 緒 言

粘膜免疫は、粘膜表面から侵入してくる抗原に対する

免疫学的生体防御反応の1つで、抗原の認識から抗原特異的分泌型 IgA 産生までの過程がその主体を成す¹⁾。IgA 抗体産生は粘膜組織に存在する粘膜関連リンパ組織

別刷請求先 : 173-8610 東京都板橋区大谷口上町 30-1 日本大学医学部眼科学教室 齋藤 圭子
(平成 10 年 12 月 14 日受付, 平成 11 年 6 月 2 日改訂受理)

Reprint requests to: Keiko Saito, M.D. Department of Ophthalmology, Nihon University School of Medicine, 30-1 Oyaguchikami-machi, Itabashi-ku, Tokyo 173-8610, Japan.

(Received December 14, 1998 and accepted in revised form June 2, 1999)

判定後,同様の方法で屠殺し,眼瞼,眼球を摘出した.摘出した片眼の組織は光学顕微鏡用として,他眼の組織は透過型電子顕微鏡用として試料を作製した.

光学顕微鏡用の試料は,ザンボニ固定液で1時間固定した後,OCT compound (Tissue-tek®, Miles)で凍結包埋し,約7 μ mの凍結切片を作製した.染色はDiff Quick® (ミドリ十字)を用いて,酸性ギムザ染色を行った.

透過型電子顕微鏡用の試料は,2.5% glutaraldehyde

(0.2mol/L-cacodylate buffer, pH7.4)で12時間固定後,細切して1%オスミウム酸で1時間,後固定した.次に,上昇アルコール系列で脱水,エポキシ樹脂(EPOK 812®, 応研商事)に包埋し,超薄切片を作製した.超薄切片は,酢酸鉛とウラニールアセテートの二重染色を行い,透過型電子顕微鏡(JEM 1200 EX®, 日本電子)で観察した.

III 結 果

1. 臨床所見の検討

全例の総合臨床スコアを図1に示す.総合臨床スコアでは,30分,6時間に差がみられた.統計学的検討では,各臨床スコアを図2a~cに示す.卵白アルブミン点眼後30分において,CTB点眼群は非処置群に比べて球結膜充血($p<0.01$),球結膜浮腫($p<0.05$),瞼結膜浮腫($p<0.01$)ともに有意に抑制されていた(図3a, b).

2. 組織学的検討

1) 光学顕微鏡による観察

卵白アルブミン点眼後6時間の結膜組織の所見は,非処置群では結膜上皮直下に多数好酸球を主体とした細胞

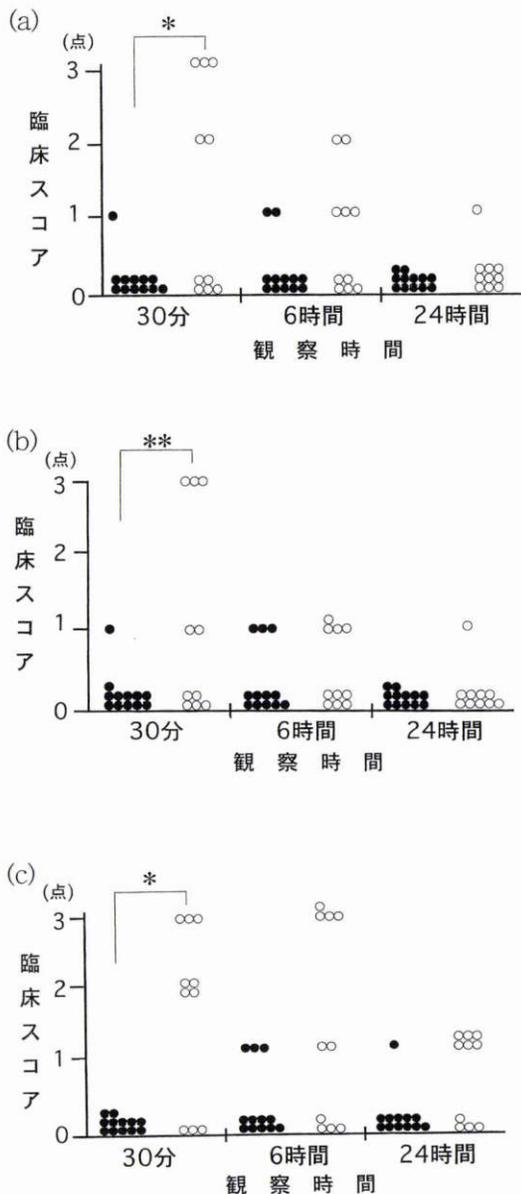


図2a 球結膜充血の臨床スコア.
球結膜充血は点眼30分後で両群間に優位の差(*)がみられる.*: Mann-Whitney: $p<0.01$
CTB点眼群(●), 非処置群(○)
図2b 球結膜浮腫の臨床スコア.
球結膜浮腫は点眼30分後で両群間に優位の差(**)がみられる.**: Mann-Whitney: $p<0.05$
図2c 瞼結膜浮腫の臨床スコア.
瞼結膜浮腫は点眼30分後で両群間に優位の差(*)がみられる.*: Mann-Whitney: $p<0.01$

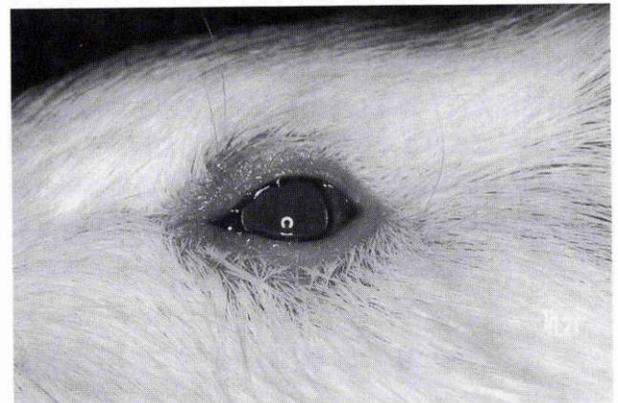


図3a 非処置群の30分後の前眼部写真.
球結膜充血, 球結膜浮腫および瞼結膜浮腫が高度にある.
総合臨床スコア5点である.

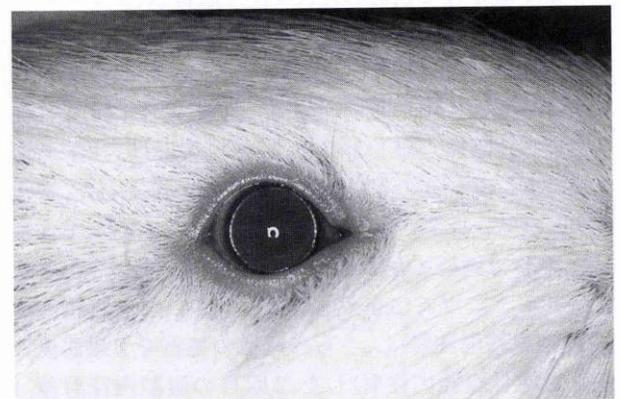


図3b CTB点眼群の30分後の前眼部写真.
球結膜充血, 球結膜浮腫および瞼結膜浮腫が軽度にある.
総合臨床スコア0点である.

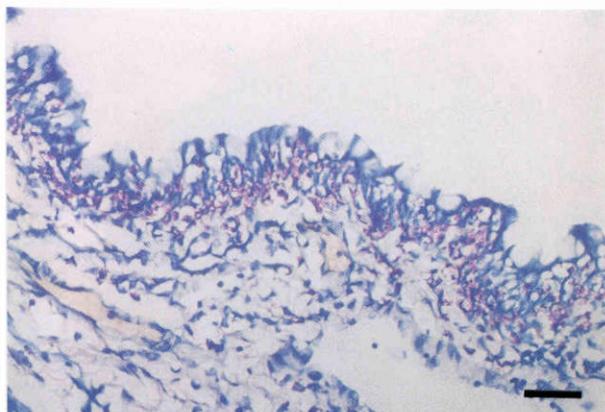


図 4 a 非処置群の 6 時間後の脛結膜.

好酸球は結膜下組織に加え、上皮直下ならびに一部上皮内に多数浸潤している。酸性ギムザ染色、バーは 50 μm

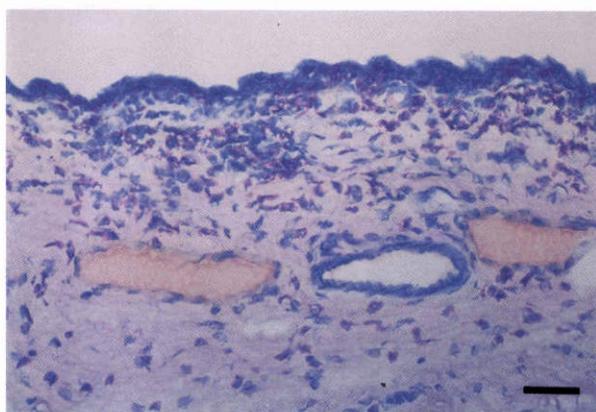


図 5 a 非処置群の 24 時間後の脛結膜.

結膜上皮下および上皮に多数の好酸球があり、goblet 細胞の消失や上皮細胞の脱落がみられる。酸性ギムザ染色、バーは 50 μm

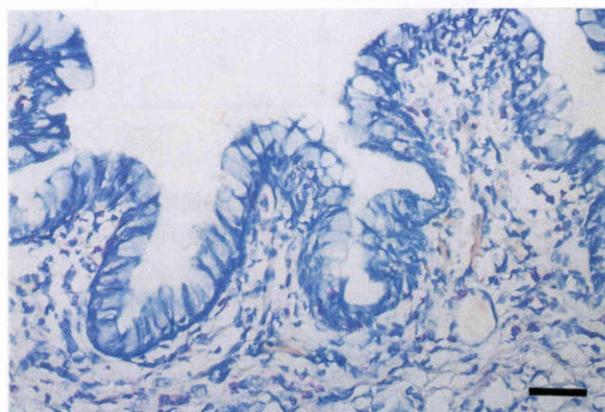


図 4 b CTB 点眼群の 6 時間後の脛結膜.

好酸球が結膜下組織に散在性にあるが、結膜上皮直下にはほとんどみられない。酸性ギムザ染色、バーは 50 μm

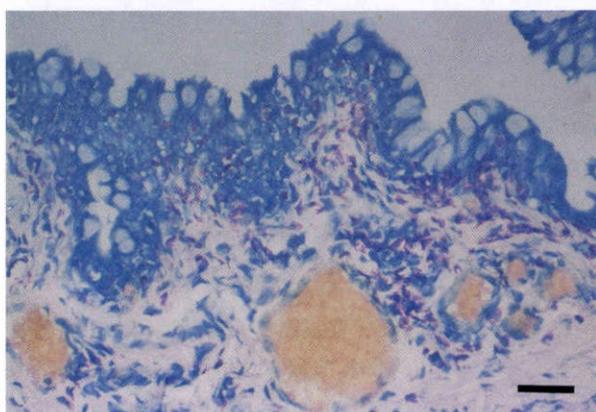


図 5 b CTB 点眼群の 24 時間後の脛結膜.

結膜上皮下に好酸球の浸潤がみられる。CTB 点眼群では、非処置群に比較して好酸球浸潤と結膜上皮障害が軽度である。酸性ギムザ染色、バーは 50 μm

浸潤がみられたのに対して、CTB 点眼群では結膜上皮下の細胞浸潤は軽度であった(図 4 a, b)。

卵白アルブミン点眼後 24 時間では、両群ともに結膜下組織には、血管の拡張とその中に赤血球が充満したうっ血像がみられ、好酸球の増加がみられたが、CTB 点眼群では、非処置群に比較して好酸球の浸潤が軽度であった。また、非処置群の結膜上皮では杯細胞の消失、上皮障害の所見がみられたが、CTB 点眼群では杯細胞は保たれており、上皮障害の所見もなかった(図 5 a, b)。

2) 透過型電子顕微鏡による観察

好酸球は二分葉核と細胞質内にコーヒー豆様の特異顆粒を有する点で、他の顆粒球と識別可能であった。卵白アルブミン点眼後 6 時間において、非処置群の結膜上皮下には好酸球、好中球、リンパ球の浸潤があるが、CTB 点眼群は非処置群に比べて上皮下の細胞浸潤は軽度であった。

卵白アルブミン点眼後 24 時間において、非処置群では結膜上皮内に好酸球が浸潤している所見があり、その周囲の上皮には細胞間隙の拡大および上皮細胞の脱落した

所見がみられた。また、結膜下組織に多数の好酸球およびリンパ球の浸潤があった。CTB 点眼群では上皮細胞にほとんど変化はなく、細胞間隙にも変化はなかった。また、上皮下には軽度の好酸球浸潤があったが、上皮内にはほとんど好酸球はなかった(図 6 a, b)。

IV 考 按

粘膜免疫の臨床応用として、ウイルス感染症に対する粘膜ワクチン¹³⁾¹⁴⁾、アレルギー疾患に対する経口減感作療法^{15)~17)}、自己免疫疾患に対する経口免疫寛容¹⁸⁾などがこれまでに報告されているが、今回我々は粘膜免疫の臨床応用の 1 つとして粘膜免疫増強によるアレルギー性結膜炎発症抑制の可能性について検討した。

今回使用したモルモットアレルギー性結膜炎モデルは、能動感作モデルとして報告されたものであり、アレルギー性結膜炎の臨床所見としては、抗原点眼後 30 分に著しい結膜浮腫を主体とした即時反応(early phase reac-

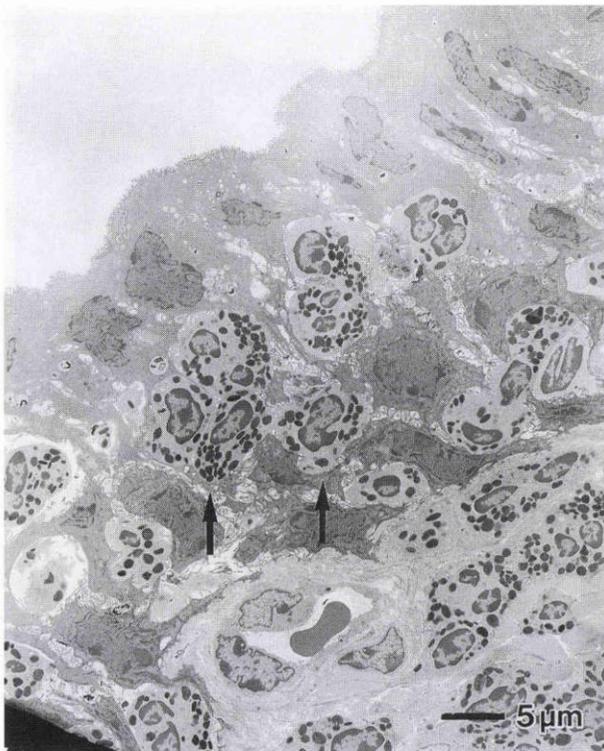


図 6 a 非処置群の 24 時間後の脛結膜電子顕微鏡写真。結膜上皮内に多数の好酸球浸潤があり(矢印),上皮細胞の細胞間隙は拡大,上皮細胞の脱落がみられる。

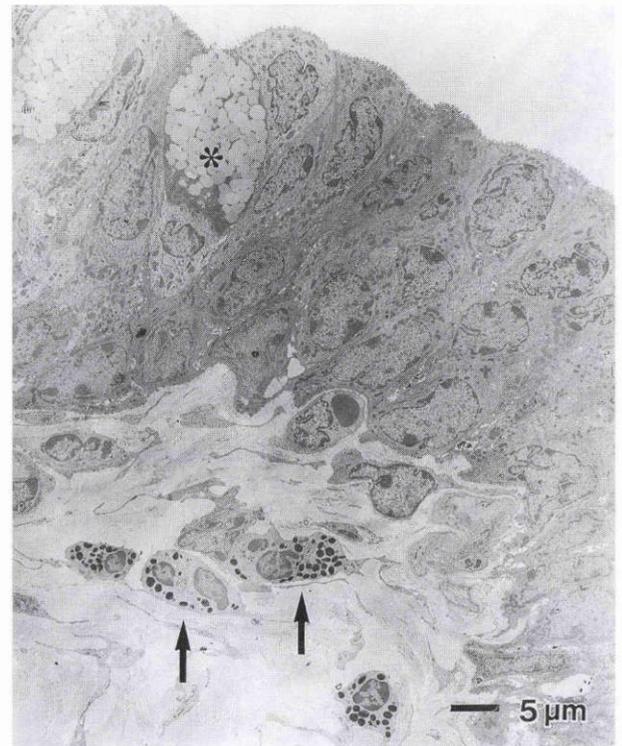


図 6 b CTB 点眼群の 24 時間後の脛結膜電子顕微鏡写真。上皮下に好酸球の浸潤が軽度みられる(矢印).上皮障害はほとんどみられない。

tion)が観察される他に,点眼後6~24時間において好酸球とリンパ球主体の細胞浸潤を伴う遅発反応(late phase reaction)の二相性の反応が観察されるモデルである^{10)~12)}.本実験では,この抗体価の上昇時期に合わせてアレルギー性結膜炎を発症させ,そのために発症の4週間前に生体の感作を行った.観察時間の設定には,既報^{10)~12)}で30分~6時間の間では,組織学的所見にも臨床所見にも変化がみられないため,今回の検討も30分,6,24時間に観察を行った.モルモットは雑種であり,個体差がみられることはヒトにおける反応と類似する点である.そのため,個々の症例について臨床症状をそれぞれスコア化し,統計学的に検討する必要がある.今回,免疫増強による反応を検討する意味からモルモット実験的アレルギー性結膜炎モデルに対して,抗原である卵白アルブミンとCTBの混合液を前処置点眼を行った群と,前処置点眼のない非処置群間のみで,臨床症状および組織学的所見を比較した.結果は抗原点眼後30分の臨床症状がCTB点眼群において有意に抑制され,点眼6~24時間後における組織学的検討では,CTB点眼群の方が非処置群に比べて好酸球浸潤と結膜上皮障害が軽度であった.これらの結果から,モルモット実験的アレルギー性結膜炎モデルでは,抗原とCTBの混合液点眼により,即時相から遅発相に至る一連のアレルギー反応が抑制されたと考えられた.

CTはコレラ菌の産生する菌体外毒素で,コレラ菌感

染による下痢症状の原因物質である.CTは,Aサブユニット1分子とBサブユニット5分子から成り,分子量約84kDaの六量体蛋白質で構成される.Aサブユニットは,コレラの患者における下痢や脱水を惹き起こす物質であり,Bサブユニット五量体を介して動物の有核細胞表層上のG_{M1}ガングリオシドと結合し,細胞質内に送り込まれることが知られている¹⁹⁾.このCTを経口的に抗原とともに投与すると,抗原特異的分泌型IgAの著しい上昇を生じることから,粘膜免疫アジュバントとしても知られている³⁾が,CTを生体に使用する場合にAサブユニットの毒性が問題になっていた.McKenzieら⁴⁾は,CTBと西洋ワサビペルオキシダーゼ(HRP)を化学的に結合させた混合物をマウスに経口摂取させたところ,腸管粘膜と血清中に高レベルの抗体産生がみられたことから,CTB単独でもアジュバント活性が存在することを初めて報告した.また,Jertbornら⁷⁾や小川ら²⁰⁾はCTBが有用な粘膜免疫アジュバントであること,ヒトに対して毒性が少ないことを報告している.今回,粘膜免疫アジュバントとしてはCTBを使用し,経粘膜投与のルートとしては結膜を想定して点眼による投与方法により検討した.

抗原とCTBを腸管以外の粘膜から投与する方法は,Hirabayashiら¹⁴⁾がマウスに対してインフルエンザウイルスとCTBとの混合液を経鼻的に投与する経鼻インフルエンザ粘膜ワクチンとして行っており,経鼻的抗原投

与は経口、経腹腔内および経皮的ワクチン投与に比べて、血清と気管支洗浄液中の抗 IgA 抗体が有意に増加していると報告している。また、若盛²¹⁾は局所 IgA 抗体を人為的に増加させることにより、IgA 抗体がアレルゲンに対する遮断抗体になり得ると考え、CT と抗原の経鼻投与で、抗原の再暴露に際して血清 IgE 抗体産生が抑制されたことを報告している。一方、結膜組織に関しては、稲田ら²²⁾がモルモットを用い、抗原である HRP をフロイント完全アジュバントとともに点眼して、抗原特異的 IgA 産生形質細胞の結膜への出現を免疫組織化学的に観察し、経結膜の抗原投与により粘膜免疫の誘導が可能であることを報告した。これらの報告は、抗原と CTB の点眼法が眼局所において遮断抗体として働く抗原特異的 IgA を誘導しアレルギー反応を抑制したと考えられた。しかも分泌型 IgA は、抗原が免疫組織に侵入することを阻止する生体防御も営んでいることから、即時相の反応を含めてアレルギー反応の全経過が抑制されたものと考えられた。

一方、アレルギー疾患の治療に粘膜免疫を利用した免疫療法の有用性が報告^{15)~17)}され始めている。経口減感作療法はアレルゲンの経口投与により免疫寛容を誘導してアレルギー疾患の発症を抑制することを目的とした免疫療法の一法である。Suko ら¹⁷⁾は成人喘息症例にダニ粗抗原を経口投与したところ、ダニ抗原吸入誘発による即時型喘息反応と遅発型喘息反応の両者の抑制効果および末梢血好酸球の減少やリンパ球の自発的インターロイキン-5 の産生低下を報告している。また、小泉ら⁹⁾はラットに経口免疫寛容の誘導を行い、アレルギー性結膜炎における血清 IgE 抗体価と結膜炎の抑制を報告している。しかし、投与する抗原の量によって免疫寛容が誘導される場合とされない場合があるとされ、免疫寛容に関してはまだ不明な点が多い。したがって、今回は卵白アルブミン点眼のみの群は設定しておらず、今回の方法におけるアレルギー性結膜炎発症の抑制が、免疫寛容の誘導によるのか、または分泌型 IgA を中心とした遮断抗体によるのかとの作用機序の検討は行っておらず不明である。今回の感作方法は粘膜ワクチンに準じた方法であり、CTB と抗原の点眼投与法はアレルギー性結膜炎の領域においても臨床的分野へ発展させることが可能な方法であると考えられ、今後は本方法の作用機序の解明と臨床応用が検討課題であると考えられた。

文 献

- 1) McGhee JR, Mestecky J, Dertzbaugh MT, Eldridge JH, Hirasawa M, Kiyono H: The mucosal immune system: From fundamental concepts to vaccine development. *Vaccine* 10: 75—88, 1992.
- 2) Elson CO: Cholera toxin and its subunits as potential oral adjuvants. *Curr Top Microbiol Immunol* 146: 29—33, 1989.
- 3) Elson CO, Ealding W: Cholera toxin feeding did not induce oral tolerance in mice and abrogated oral tolerance to an unrelated protein antigen. *J Immunol* 133: 2892—2897, 1984.
- 4) McKenzie SJ, Halsey FJ: Cholera toxin B subunit as a carrier protein to stimulate a mucosal immune response. *J Immunol* 1818—1824, 1984.
- 5) Lycke N, Holmgren J: Strong adjuvant properties of cholera toxin on gut mucosal immune responses to orally presented antigens. *Immunology* 59: 301—308, 1986.
- 6) Quiding M, Nordstrom I, Kilander A, Anderson G, Hanson LA, Holmgren J, et al: Intestinal immune responses in humans. Oral cholera vaccination induces strong intestinal antibody responses and interferon- γ production and evokes local immunological memory. *J Clin Invest* 88: 143—148, 1991.
- 7) Jertborn M, Svennerholm AM, Holmgren J: Safety and immunogenicity of an oral recombinant cholera B subunit-whole cell vaccine in Swedish volunteers. *Vaccine* 10: 130—132, 1992.
- 8) Chandler JW, Gillette TE: Immunologic defense mechanisms of the ocular surface. *Ophthalmology* 90: 585—591, 1983.
- 9) 小泉敏樹, 阿部 徹: ラット実験のアレルギー性結膜炎に対する経口免疫寛容の誘導. *日眼会誌* 99: 515—520, 1995.
- 10) 庄司 純, 稲田紀子, 高浦典子, 澤 充: 結膜組織における好酸球反応の組織学的検討. *臨眼* 48: 884—885, 1994.
- 11) 庄司 純, 齋藤圭子, 高浦典子, 稲田紀子, 高浦典子, 澤 充: アレルギー性結膜炎の組織学的検討—第 1 報—アレルギー性結膜炎における接着分子の検討. *日眼会誌* 99: 129—134, 1995.
- 12) 庄司 純, 齋藤圭子, 高浦典子, 稲田紀子, 高浦典子, 澤 充: アレルギー性結膜炎の組織学的検討 第 2 報—結膜におけるアレルギー炎症の経時的変化—. *眼紀* 46: 1015—1020, 1995.
- 13) Kaper JB: *Vibrio cholerae* vaccines. *Rev Infect Dis* 11: S 568—S 573, 1989.
- 14) Hirabayashi Y, Kurata H, Funato H, Nagamine T, Aizawa C, Tamura S, et al: Comparison of intranasal inoculation of influenza HA vaccine combined with cholera toxin B subunit with oral or parenteral vaccination. *Vaccine* 8: 243—248, 1990.
- 15) Tari MG, Mancino M, Monti G: Efficacy of sublingual immunotherapy in patients with rhinitis and asthma due to house dust mite: A double blind study. *Allergol Immunopathol* 18: 277—284, 1990.
- 16) Giovane AL, Bardare M, Passalacqua G, Ruffoni S, Scordamaglia A, Ghezzi E, et al: A three year double-blind placebo-controlled study with specific oral immunotherapy to dermatophagoides:

- Evidence of safety and efficacy in paediatric patients. *Clin Exp Allergy* 24: 53—59, 1994.
- 17) **Suko M, Mori A, Ito K, Okudaira H**: Oral immunotherapy may induce T cell anergy. *Int Arch Allergy Immunol* 107: 278—281, 1995.
 - 18) **Lider O, Santos LMB, Lee CSY, Higgins PJ, Weiner HL**: Suppression of experimental autoimmune encephalomyelitis by oral administration of myelin basic protein. II. Suppression of disease and *in vitro* immune responses is mediated by antigen-specific CD 8+ T lymphocytes. *J Immunol* 142: 748—752, 1989.
 - 19) **Spangler BD**: Structure and function of cholera toxin and the related *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin. *Microbiol Rev* 56: 622—647, 1992.
 - 20) **小川浩司, 山下亮子, 橋口一弘, 長峰 隆, 相沢主税, 田村真一, 他**: コレラ毒素Bサブユニット(CTB)をアジュバンドとしたインフルエンザ・ワクチンの経鼻接種による鼻汁 IgA 抗体と血清 HI 抗体の誘導—volunteer による pilot study—. *耳鼻免疫 アレルギー* 9: 60—66, 1991.
 - 21) **若盛和雄**: 経鼻的免疫療法に関する実験的研究. *耳展* 35 補 2: 49—59, 1992.
 - 22) **稲田紀子, 庄司 純, 葛西 浩, 石井康雄, 北野周作**: Ocular surface の局所免疫機構. *日眼会誌* 96: 817—822, 1992.
-