

春季カタル巨大乳頭におけるサイトカイン mRNA の発現

森 純一, 石崎 道治, 妹尾 正, 小原 喜隆

獨協医科大学眼科学教室

要 約

背景：春季カタルの発症には、サイトカインの関与が考えられる。

対象と方法：春季カタル 6 例の結膜巨大乳頭内のサイトカイン；interleukin (IL)-1 β , IL-1 receptor antagonist (RA), IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, interferon (INF) γ , tumor necrosis factor (TNF) α , TNF β , transforming growth factor (TGF) β 1, TGF β 2 の mRNA の発現を reverse transcriptase-polymerase chain reaction で調べた。

結果：IL-1 β は 5 例, IL-1 RA, IL-5, IL-6, IL-

8, TGF β 1, TGF β 2 は 6 例, TNF α は 4 例, IL-4 と INF γ は 3 例で発現したが, IL-2 と TNF β は発現しなかった。

考 按：春季カタルの病態には Th1, Th2 サイトカインが関与すると考えられた。(日眼会誌 106 : 392-397, 2002)

キーワード：春季カタル, サイトカイン, Reverse transcriptase-polymerase chain reaction

Cytokine mRNA Expression in Vernal Keratoconjunctivitis

Junichi Mori, Michiharu Ishizaki, Tadashi Senoo and Yoshitaka Obara

Department of Ophthalmology, Dokkyo University School of Medicine

Abstract

Background : Cytokines play an important role in chronic allergic eye disease.

Objectives : We examined how many kinds of cytokines are in giant papillae of vernal keratoconjunctivitis (VKC).

Methods : We resected giant papillae from 6 patients with VKC, and studied mRNA expression of cytokines in them with the reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR). The cytokines were interleukin (IL)-1 β , IL-1 receptor antagonist (IL-1 RA), IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, interferon (INF) γ , tumor necrosis factor (TNF) α , TNF β , transforming growth factor (TGF) β 1, and TGF β 2.

Results : In 5 cases, expression of IL-1 β was

positive. Expression of IL-1 RA, IL-5, IL-6, IL-8, TGF β 1, and TGF β 2 was positive in 6 cases. TNF α was positive in 4 cases. IL-4 and INF γ were positive in 3 cases. IL-2 and TNF β were negative in all patients.

Conclusion : These results suggest that the Th2 cytokines play more important roles than the Th1 cytokines in VKC inflammation. (J Jpn Ophthalmol Soc 106 : 392-397, 2002)

Key words : Cytokines, Vernal keratoconjunctivitis, Reverse transcriptase-polymerase chain reaction

I 緒 言

眼結膜のアレルギー疾患の発症機序には I 型アレルギー反応が主に働き, IV 型アレルギー反応も関与していると考えられている。I 型アレルギー反応を推定する報告としては, アレルギー性結膜炎の結膜組織には IgE で染色される好酸球が浸潤し¹⁾, 涙液中ヒスタミン値が上昇²⁾しているなどがあり, IV 型アレルギー反応を推定す

る報告としては, 春季カタル (VKC) 組織のハイブリダイゼーションで Th2 様細胞が多く存在すること³⁾, VKC 結膜の T 細胞を培養すると Th2 細胞系サイトカインが上昇⁴⁾しているなどがある。これらのアレルギー反応に伴い, VKC の巨大乳頭内ではどのようなサイトカインが分泌されているのか明らかにするために, 12 種類のサイトカイン messenger ribonucleic acid (mRNA) の発現を調べた。

別刷請求先：321-0293 栃木県下都賀郡壬生町北小林 880 獨協医科大学眼科学教室 森 純一
(平成 13 年 9 月 7 日受付, 平成 14 年 2 月 18 日改訂受理)

Reprint requests to : Junichi Mori, M. D. Department of Ophthalmology, Dokkyo University School of Medicine.
880 Kitakobayashi, Mibu-machi, Shimotsuga-gun, Tochigi 321-0293, Japan
(Received September 7, 2001 and accepted in revised form February 18, 2002)

表 1 患者背景

症例	年齢	性別	重症度	症状悪化～切除までの期間	合併症	使用薬剤
1	32	女	重症	7日間	—	トラニラスト, 0.1% フルオロメトロン(ED)
2	13	男	中等症	2日間	AD 喘息	クモグリク酸ナトリウム, 0.1% フルオロメトロン(ED) トシル酸スプラタスト, オキサトミド(PO)
3	7	男	重症	23日間	AD	トラニラスト, 0.1% フルオロメトロン(ED)
4	11	女	重症	19日間	AD	クモグリク酸ナトリウム(ED) 塩酸エピナスチン, 塩酸シプロヘプタジン(PO)
5	11	男	中等症	15日間	AD	トラニラスト, 0.1% フルオロメトロン(ED)
6	25	男	中等症	11日間	—	トラニラスト, 0.1% フルオロメトロン(ED)

重症度は角膜障害の程度による重症度分類(日本眼科学会アレルギー眼疾患調査研究班)を用いた。
AD: アトピー性皮膚炎, ED: 点眼薬, PO: 内服薬

II 対 象

対象(表 1)は, 治療および研究目的に同意した VKC 患者 6 例(男性 4 例, 女性 2 例)である。年齢は 7~32 歳で, 平均年齢は 16.5 歳であった。全例の上眼瞼結膜に増殖性変化があり, 角膜障害を有していた。角膜障害の程度による重症度(日本眼科医会アレルギー眼疾患調査研究班)で分類すると, 3 例は角膜潰瘍がみられる重症例で, 3 例は点状表層角膜症が角膜全体にみられる中等症例であった。アトピー性皮膚炎を合併したものは 4 例, 喘息の合併例は 1 例であった。

全例とも症状の悪化した時期に治療目的で巨大乳頭の切除を行った。自覚症状の悪化から切除までの期間は 2~23 日間であった。症例 1~4 は点眼治療や内服治療をしていたにもかかわらず, 悪化したため切除を行った。症例 5 は点眼回数が不規則となり, 症状が悪化した。本例は過去 2 回, 巨大乳頭切除の既往があり, 有効であったので, 今回も切除を施行した。症例 6 は症状悪化後に点眼治療を開始したが軽快せず, 切除を必要とした。切除は上眼瞼結膜を 1% リドカインで局所麻酔後, 巨大乳頭をできるだけ一塊で切除した。得られた切片を直ちに液体窒素中で瞬間冷凍し, -80°C で保存した。

対照として, アレルギー疾患のない 23 歳女性の結膜弛緩症患者から治療的に切除した球結膜を, 同意を得て用いた。また, この結膜の病理組織を観察した。さらに, リンパ球系サイトカインの陽性対照として, アレルギー疾患のない健常人の血液から Ficoll-Paque による比重遠心法で分離した単核球細胞(peripheral blood mononuclear cells, PBMC)に phytohemagglutinin(PHA)を加え, 培養した細胞を用いた。

III 方 法

1. RNA の抽出

得られた組織に ISOGEN(和光純薬-ニッポンジーン) 1 ml を加え, 凍結とホモジュネイトを繰り返し, 細胞塊がなく均一な溶液になるように細胞を破壊, 変性さ

せ, acid guanidinium-phenol-chloroform (AGPC) 法⁵⁾を用いて total RNA を分離した。

2. Reverse transcription (RT)

Total RNA 1 μg を RT 反応液に入れ, oligo dT-adaptor primer を加え, サーマルサイクラーを用い, 30°C で 10 分, 42°C で 30 分, 99°C で 5 分, 5°C で 10 分の逆転写を行い, complementary DNA (cDNA) を合成した。

3. Polymerase chain reaction (PCR)

RT 後, cDNA 1 μl に各サイトカインの sense-primer, antisense-primer(表 2)各 1 μl と PCR 用反応液を加え, サーマルサイクラーを用いて PCR を行った。PCR の条件は initial denaturing step 95°C で 10 分, 次に denaturing step 95°C で 30 秒, annealing step 55°C で 30 秒, extension step 72°C で 1 分を 30 サイクル, final step 72°C で 15 分, cooling 4°C とした。PCR を行ったサイトカインは, interleukin(IL)-1 β , IL-1 receptor antagonist(RA), IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, interferon(INF) γ , tumor necrosis factor(TNF) α , TNF β , transforming growth factor(TGF) β 1, TGF β 2 である。PCR 終了後, 反応液を染色し, アガロースゲル電気泳動を行い, 紫外線下に写真撮影を行った。RT, PCR 反応液は宝酒造株式会社製 TaKaRa RNA PCR Kit (AMV) Ver. 2.1 を, primer pair はエスベックオリゴサービス株式会社製を用いた。

IV 結 果

表 3 に各症例, 結膜弛緩症, PBMC のサイトカイン別の発現数をまとめて示した。IL-1 β は症例 1 以外の 5 例で, IL-1 RA は全例で発現した。IL-2 は PBMC でのみ発現し, 症例では発現しなかった。IL-4 は症例 3~5 と PBMC で発現した(図 1)。IL-5, IL-6, IL-8 は全例で発現した。INF γ は症例 2~4 と PBMC で発現した(図 2)。TNF α は症例 1~3, 5 と PBMC で発現した。TNF β は症例での発現がなく, PBMC で発現した。TGF は β 1, β 2 とも全例で発現した(図 3)。

結膜弛緩症例では IL-6, IL-8, TGF β 2 が発現した

表 2 各サイトカインの primer pair

Cytokine	Base pair	Primers
IL-1 β	391	S : AAACAGATGAAGTGCTCCTTCCAGG A : TGGAGAACCACCTGTTGCTCCA
IL-1 RA	411	S : TCCAGCAAGATGCAAGCCTTC A : GACCATGACGCCTTCGTCAGG
IL-2	250	S : CAAGAATCCCAAACCTCACCAGG A : CAATGGTTGCTGTCTCATCAGC
IL-4	350	S : TTCCCCCTCTGTTCTTCCTGCTAG A : ACGTACTCTGGTTGGCTTCCTTAC
IL-5	294	S : TGGCCGTCATGTATTTCTTTATTAAG A : GCTTCTGCATTTGAGTTTGCTAGCT
IL-6	295	S : AAATTCGGTACATCCTCGAC A : CAGGAACCTGGATCAGGACTT
IL-8	294	S : ACTTCCAAGCTGGCCGTGGCTCTCTGGCA A : TGAATTCTCAGCCCTTCAAAAACCTTCTC
INF γ	306	S : AGCCATCACTTGGATGAGTT A : TGCAGGTCATTGATGATGATG
TNF α	381	S : GCCTGCTGCACTTTGGAGTGATCGG A : GCTCTTGATGGCAGAGAGGAGG
TNF β	288	S : AAACCTGCTGCTCACCTCATT A : TGGATACACCATCTTCTGGG
TGF β 1	297	S : CAAGTGGACATCAACGGGTT A : GCTCCAAATGTAGGGGCAGG
TGF β 2	245	S : CCCACATCTCCTGCTAATGT A : GCTGAGTGTCTGAACTCCAT

S : sense-primer, A : antisense-primer, IL : interleukin, INF : interferon, TNF : tumor necrosis factor, TGF : transforming growth factor

表 3 由来細胞別サイトカインの発現数

サイトカイン	マクロファージ		マクロファージ T 細胞		Th1 細胞			Th2 細胞		上皮細胞		
	IL-1 β	IL-1 RA	TNF α	IL-6	IL-2	INF γ	TNF β	IL-4	IL-5	IL-8	TGF β 1	TGF β 2
巨大乳頭	5/6	6/6	4/6	6/6	0/6	3/6	0/6	3/6	6/6	6/6	6/6	6/6
結膜弛緩症	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	+
PBMC	ND	ND	+	ND	+	+	+	+	ND	ND	ND	ND

5/6 : 6 例中 5 例で発現したことを示す。 - : 発現せず + : 発現 PBMC : 単核球細胞 ND : not determine

(図 4). 弛緩結膜の光学顕微鏡による病理所見は、間質中に単核球とマクロファージの浸潤がわずかにみられたが、結膜上皮細胞に悪性所見はなく、結膜炎と診断された。

V 考 按

免疫担当細胞である T 細胞やマクロファージから分泌されるサイトカインは、免疫やアレルギー反応の調整を担うと考えられている。マウス⁶⁾において、T 細胞は Th1 細胞と Th2 細胞に分類される。Th1 細胞から分泌されるサイトカインは IL-2, INF γ , TNF β など、Th2 細胞から分泌されるのは IL-4, IL-5, IL-6 など、Th1, Th2 細胞の両者から分泌されるのは TNF α などである。ヒト T 細胞では明確に Th1 細胞と Th2 細胞に分

類できたとの報告はないが、自己免疫疾患やアレルギー疾患では、T 細胞サイトカインの産生、分泌が増減していると考えられている。Metz ら³⁾は VKC とアトピー性結膜炎の結膜には IL-3, IL-4, IL-5 で染色される T 細胞が多く、特にアトピー性結膜炎では INF γ で染色される T 細胞もみられると報告し、Calder ら⁴⁾は VKC の培養細胞は IL-4, IL-5 が増加した Th2 細胞パターンに、アトピー性結膜炎の培養細胞は INF γ が増加した Th1 細胞パターンにシフトしたと報告している。

今回の結果では、Th1 サイトカインの IL-2 と TNF β は PHA で刺激した PBMC で発現していたのに対し、症例の巨大乳頭においては 1 例も発現していなかった。PBMC は活性化された T 細胞として、T 細胞サイトカインの陽性対照となる。PBMC で IL-2, TNF β ,

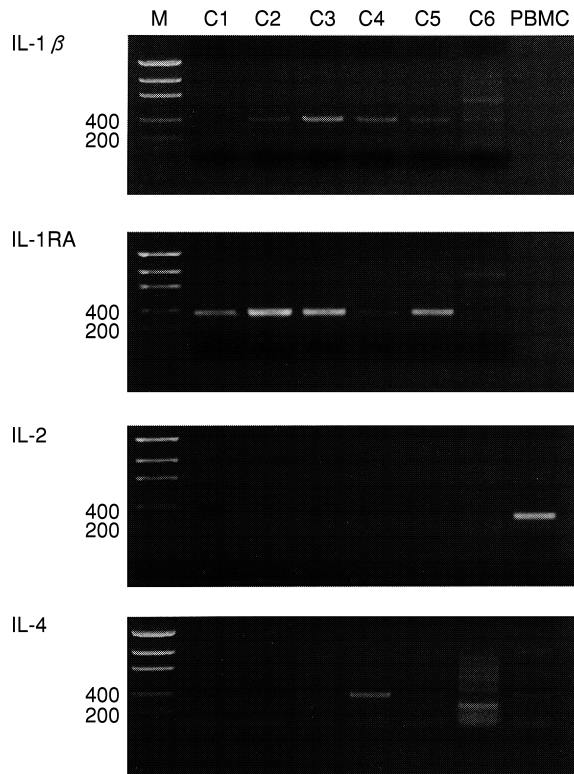


図 1 Interleukin (IL)-1 β , IL-1 RA, IL-2, IL-4 の発現。

M はマーカー, C1~C6 はそれぞれ症例 1~6 を示す。単核球細胞 (PBMC) は正常対照である。

IL-1 β は症例 2~6 で, IL-1 RA は全症例で発現した。IL-2 は全例で発現していないが, PBMC では発現している。IL-4 は症例 3~5, PBMC で発現がみられた。

INF γ が発現したことから, PCR 条件や primer pair に問題はなく, VKC の巨大乳頭内では IL-2 と TNF β は発現していないと考えられる。また, INF γ の発現した症例は 2~4 の 3 例のみであった。この 3 例でも電気泳動の band は淡く, 発現量は少ないと考えられる。TNF α は症例 1~3, 5 で発現しているが, Th1 細胞からか Th2 細胞からか, またはマクロファージから発現したのかは判断できず, 症例 1, 5, 6 において, Th1 サイトカインの存在は証明できないと考えられる。Th2 サイトカインである IL-4 は 3 例で発現していないが, IL-5, IL-6 は全例で発現した。アレルギーを持たない結膜弛緩症例では IL-6 以外の T 細胞サイトカインの発現はなかった。本症例の組織に単核球, マクロファージの浸潤があり, 結膜炎と診断された。単核球はあるものの活性化していないため, T 細胞サイトカインは発現していないと考えられ, IL-6 はマクロファージから発現した可能性がある。巨大乳頭でも IL-6 はマクロファージから発現した可能性はあるが, IL-4, IL-5 の両者が発現していない症例はなく, 全例で Th2 サイトカインが存在していた。以上から, 巨大乳頭では Th1 サイト

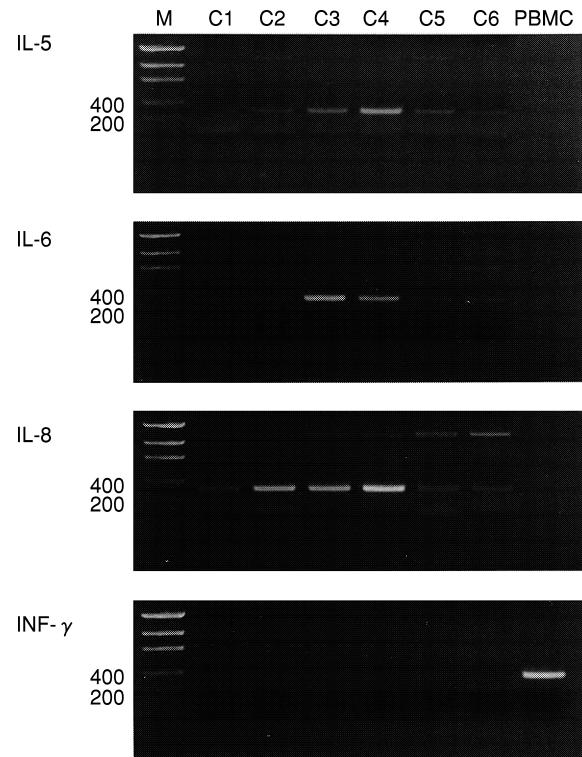


図 2 IL-5, IL-6, IL-8, interferon (INF) γ の発現。

IL-5, IL-6, IL-8 は, 全例で発現している。INF γ は症例 2, 3, 4, および PBMC で発現がみられたが, 症例の band は淡く, 発現量は少ないと考えられる。

カインと Th2 サイトカインの両者が関与する。しかし, Th1 サイトカインは発現数も量も少なく, Th2 サイトカインの方が重要な働きをしていると考えられる。

今回の症例は, 症状の悪化後 2~23 日に巨大乳頭の切除を行っているが, 症例が少ないためか, 重症度と Th1 サイトカイン, Th2 サイトカインの発現の有無に関連はみられなかった。VKC 症例の涙液中 T 細胞は VKC が悪化する季節に CD 4⁺が増加しているとの報告⁷⁾や, Th1 サイトカインと Th2 サイトカインの時期的な変動についてアトピー性皮膚炎⁹⁾⁻¹⁰⁾やアレルギー性鼻炎¹¹⁾, 喘息¹²⁾で報告がある。アトピー性皮膚炎¹³⁾では, まず Th1 サイトカイン優位の時期があり, 病態が慢性化すると Th2 サイトカイン優位になると考えられている。VKC 巨大乳頭内でも季節や症状によって, T 細胞の推移が起きている可能性がある。今後, 症例を増やし, 季節, 症状の推移に合わせて切除を行い, real time PCR を用いてサイトカインの定量を行い検討したいと考えている。

マクロファージから分泌されるサイトカインは, IL-1, IL-1 RA, IL-6, IL-12, IL-18, TNF α が知られている。今回の結果, IL-1 は 5 例, IL-6 は全例, TNF α は 4 例で発現した。IL-1 には α と β の 2 種類あるが, 生物活性はほとんど同じで, 特異的な作用はない。IL-1 RA は, IL-1 と IL-1 receptor の結合を特異的に阻害す

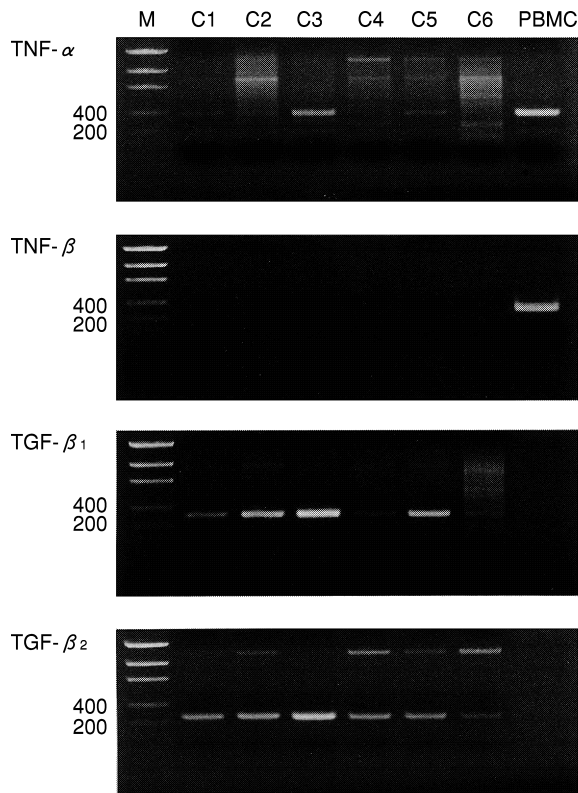


図3 Tumor necrosis factor (TNF), transforming growth factor (TGF) の発現。

TNF α は症例1~3, 5とPBMCで, TNF β はPBMCで発現がみられた。TGFは β 1, β 2とも全例で発現した。

る。IL-1, IL-1 RA の産生細胞は数多くあるが, アレルギー性結膜炎に関与する細胞としてマクロファージや好中球が考えられる。IL-1 β は症例1以外の5例で発現していることから, IL-1 β は重要な働きをしていると考えられる。Leonaldi ら¹⁴⁾は涙液や, 巨大乳頭にIL-1の存在を報告して, 今回の結果と一致する。IL-1 RA は全例で発現しており, VKCの治癒に作用していると考えられた。エンドトキシンショック, リウマチなど^{15)~18)}において, IL-1やIL-1 RAの測定が行われ, IL-1優位になると病状が悪化するといわれている。今回の症例は症状の悪化した時期に切除を受けている。VKCでもIL-1優位が症状の悪化になると考えられる。

IL-8は細胞遊走能を共通の生物活性とするケモカインを代表するサイトカインで, 強力な好中球の浸潤促進作用¹⁹⁾で発見され, 後にリンパ球の浸潤促進作用の亢進²⁰⁾²¹⁾などT細胞に対しても作用があることが発見された。特発性肺線維症, サルコイドーシス²²⁾, 喘息²³⁾など種々の炎症性疾患で発現がみられる。今回の結果, IL-8は全例で発現していた。巨大乳頭組織にはアレルギー反応で重要な作用を持つ好酸球だけではなく, 好中球も旺盛に浸潤しており, IL-8の作用が関与していると考えられる。

TGF β は形態形成を制御するシグナル分子としての

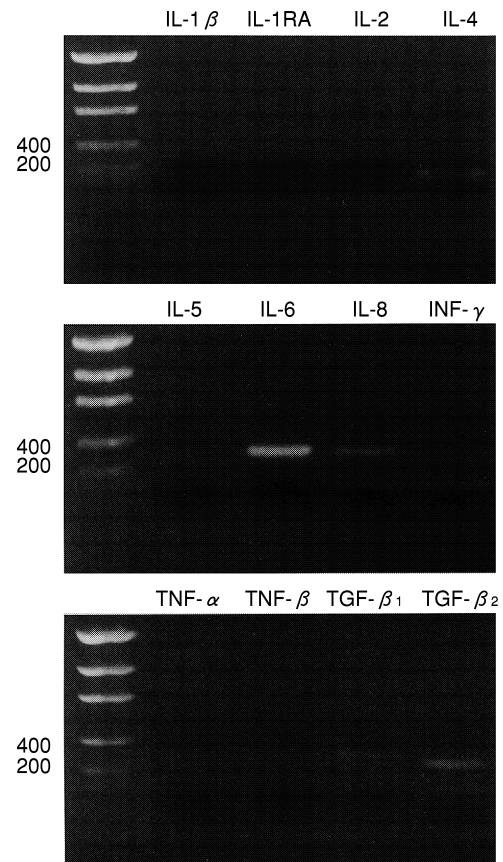


図4 結膜弛緩症例のサイトカインの発現。IL-6, IL-8, TGF β 2が発現した。

役割を持つサイトカインである。多くの細胞に対して強力な増殖抑制因子として働く他, 細胞外マトリックスの産生を促進する。ヒトの前眼部では輪部上皮, 結膜や角膜実質にTGF β が存在しているとの報告²⁴⁾と, 結膜の創傷治癒にTGF β が関与するとの報告²⁵⁾がある。今回の結果, TGF β 1, β 2は全例で発現がみられた。VKCによる結膜, 角膜障害に対して治癒機能が働き, TGF β が分泌されていると考えられる。また, TGF β は線維芽細胞に作用する。巨大乳頭組織では線維芽細胞の増殖を起こしており, TGF β の関与が考えられる。

以上のように, VKCの巨大乳頭組織内では様々なサイトカインが分泌している。これらのサイトカイン同士の関連をさらに研究する必要があると思われた。

稿を終えるに当たり, 実験にご協力いただいた秋元一三先生, 小端哲二教授(獨協医科大学総合医科学研究所)に深謝いたします。

文 献

- 1) Abu El-Asrar AM, Van den Oord JJ, Geboes K, Missotten L, Emarah MH, Desmet V: Immunopathological study of vernal keratoconjunctivitis. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol 227: 374-379, 1989.

- 2) 佐久間靖子, 三田晴久: アレルギー性結膜疾患の涙液ヒスタミン. アレルギー 35 : 1158—1162, 1986.
- 3) Metz DP, Hingorani M, Calder VL, Buckley RJ, Lightman SL : T-cell cytokines in chronic allergic eye disease. J Allergy Clin Immunol 100 : 817—824, 1997.
- 4) Calder VL, Jolly G, Hingorani M, Adamson P, Leonardi A, Secchi AG, et al : Cytokine production and mRNA expression by conjunctival T-cell lines in chronic allergic eye disease. Clin Exp Allergy 29 : 1214—1222, 1999.
- 5) Chomczynski P, Sacchi N : Single step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. Anal Biochem 162 : 156—159, 1987.
- 6) Mosmann TR, Schumacher JH, Street NF, Budd R, O'Garra A, Fong TAT : Diversity of cytokine synthesis and function of mouse CD 4⁺ T cells. Immunol Rev 123 : 209—229, 1991.
- 7) Avunduk AM, Avunduk MC, Dayanir V, Tekelioglu Y, Dayioglu YS : A flow cytometric study about the immunopathology of vernal keratoconjunctivitis. J Allergy Clin Immunol 101 : 821—824, 1998.
- 8) Reinhold U, Pawelec G, Wehrmann W, Kukel S, Oehr P, Kreysel HW : Cytokine release from cultured peripheral blood mononuclear cells of patients with severe atopic dermatitis. Acta Derm Venereol 69 : 497—502, 1989.
- 9) Heijden FL, Wierenga EA, Bos JD, Kapsenberg ML : High frequency of IL-4-producing CD 4⁺ allergen-specific T lymphocytes in atopic dermatitis lesional skin. J Invest Dermatol 97 : 389—394, 1991.
- 10) Grewe M, Bruijnzeel-Koomen CAFM, Schopf E, Thepen T, Langeveld-Wildsch T, Ruzicka T, et al : A role for Th1 and Th2 cells in the immunopathogenesis of atopic dermatitis. Immunol Today 19 : 359—361, 1998.
- 11) Varga EM, Jacobson MR, Till SJ, Masuyama K, O'Brien F, Rak S, et al : Cellular infiltration and cytokine mRNA expression in perennial allergic rhinitis. Allergy 54 : 338—345, 1999.
- 12) Robinson DS, Ying S, Bentley AM, Meng Q, North J, Durham SR, et al : Relationships among numbers of bronchoalveolar lavage cells expressing messenger ribonucleic acid for cytokines, asthma symptoms, and airway methacholine responsiveness in atopic asthma. J Allergy Clin Immunol 92 : 397—403, 1993.
- 13) Herz U, Bunikowski R, Renz H : Role of T cells in atopic dermatitis. Int Arch Allergy Immunol 115 : 179—190, 1998.
- 14) Leonardi A, Borghesan F, Depaoli M, Plebani M, Secchi AG : Procollagens and inflammatory cytokine concentrations in tarsal and limbal vernal keratoconjunctivitis. Exp Eye Res 67 : 105—112, 1998.
- 15) Ohlsson K, Bjork P, Bergenfeldt M, Hageman R, Thompson RC : Interleukin-1 receptor antagonist reduces mortality from endotoxin shock. Nature 348 : 550—552, 1990.
- 16) Gabay C, Smith Jr., MF, Eidlen D, Arend WP : Interleukin 1 receptor antagonist (IL1RA) is an acute-phase protein. J Clin Invest 99 : 2930—2940, 1997.
- 17) 楊 秋波 : ヒト歯肉角化細胞における Interleukin-1 α および Interleukin-1 receptor antagonist の発現について. 日歯周誌 41 : 87—98, 1999.
- 18) Schiff MH : Role of interleukin 1 and interleukin 1 receptor antagonist in the mediation of rheumatoid arthritis. Ann Rheum Dis 59(Suppl II) i 103—i 108, 2000.
- 19) Baggiolini M, Walz A, Kunkel SL : Neutrophil-activating peptide-1/interleukin-8, a novel cytokine that activates neutrophils. J Clin Invest 84 : 1045—1049, 1989.
- 20) Larsen CG, Anderson AO, Appella E, Oppenheim JJ, Matsushima K : The neutrophil-activating protein (NAP-1) is also chemotactic for T lymphocytes. Science 243 : 1464—1466, 1989.
- 21) Wilkinson P, Newman I : Identification of IL-8 as a locomotor attractant for activated human lymphocytes in mononuclear cell culture with anti-CD3 or purified protein derivative of Mycobacterium tuberculosis. J Immunol 149 : 2689—2694, 1992.
- 22) Car BD, Meloni F, Luisetti M, Semenzato G, Gialdroni-Grassi G, Walz A : Elevated IL-8 and MCP-1 in the bronchoalveolar lavage fluid of patients with idiopathic pulmonary fibrosis and pulmonary sarcoidosis. Am J Respir Crit Care Med 149 : 655—659, 1994.
- 23) Marini M, Vittori E, Hollemborg J, Mattoli S : Expression of the potent inflammatory cytokines, granulocyte-macrophage-colony-stimulating factor and interleukin-6 and interleukin-8, in bronchial epithelial cells of patients with asthma. J Allergy Clin Immunol 89 : 1001—1009, 1992.
- 24) Pasquale LR, Dorman-Pease ME, Luty GA, Quigley HA, Jampel HD : Immunolocalization of TGF- β 1, TGF- β 2, and TGF- β 3 in the anterior segment of the human eye. Invest Ophthalmol Vis Sci 34 : 23—30, 1993.
- 25) Cordeiro MF, Reichel MB, Gay JA, D'Esposito F, Alexander RA, Khaw PT : Transforming growth factor- β 1, - β 2, and β 3 *in vivo* : Effects on normal and mitomycin C-modulated conjunctival scanning. Invest Ophthalmol Vis Sci 40 : 1975—1982, 1999.