

平成 15 年度日本眼科学会学術奨励賞 受賞論文総説

重症アレルギー性結膜疾患発症におけるサイトカインの役割： 動物モデルを用いた解析

福島 敦樹

高知大学医学部視覚機能統御学教室

要 約

重症アレルギー性結膜疾患では結膜乳頭増殖と角膜障害がみられるが、これらの組織障害には好酸球が関与している。好酸球には抗原特異的認識能がないため、好酸球浸潤の誘導には抗原特異的 T 細胞の働きが、特に抗原認識による T 細胞活性化に続くサイトカイン産生が重要な役割を果たしていると考えられる。そこで、我々は免疫系細胞あるいは結膜構成細胞が産生するサイトカインの結膜炎細胞浸潤に及ぼす影響を、アレルギー性結膜疾患動物モデル(experimental immune-mediated blepharoconjunctivitis, EC)を用いて検討した。EC を誘導したラット結膜ではインターロイキン(IL)-4 などの Th 2 型サイトカインは、抗原点眼後 6~12 時間目に発現のピークがみられた。一方、インターフェロン(IFN)- γ などの Th 1 型サイトカインは抗原点眼 48 時間後まで発現が持続した。IL-4 の挙動は好酸球浸潤と、IFN- γ の挙動はマクロファージ浸潤と一致していた。これらのサイトカインの役割を検討するためノックアウトマウスに結膜炎を誘導したところ、IL-4 ノックアウトマウスでは炎症細胞浸潤の減弱を、一方 IFN- γ ノックアウト

マウスでは増強がみられた。これらサイトカインの役割をさらに詳細に検討するためにブラウンノルウェーラットに EC を誘導し解析した。IL-4 刺激を受けた T 細胞を移入し EC を誘導することにより、好酸球浸潤の増強がみられた。IFN- γ の全身投与は、能動免疫による EC では好酸球浸潤を抑制したが、受動免疫による EC では炎症細胞浸潤に影響を与えなかった。以上の一連の結果から、IL-4 は結膜好酸球浸潤を、IFN- γ は結膜マクロファージ浸潤に関与することが明らかとなった。また、EC 発症における IFN- γ の抑制能は抗原特異的免疫応答を誘導する際に発揮されることが判明した。結膜において、これらのサイトカインの働きをさらに詳細に解析することにより、アレルギー性結膜疾患の発症機構を正確に理解できるのみならず、サイトカインを標的とした治療への応用が期待できる。(日眼会誌 108 : 682-689, 2004)

キーワード：アレルギー性結膜疾患、サイトカイン、IFN- γ 、IL-4、実験的眼瞼結膜炎

A Review

Roles of Cytokines in the Development of Severe Allergic Conjunctival Diseases : Analyses Using Animal Models

Atsuki Fukushima

Department of Ophthalmology and Visual Science, Kochi Medical School

Abstract

Conjunctival papillary formation and corneal damage, which are seen in severe types of allergic conjunctival diseases, are mediated by eosinophils. Eosinophils themselves are not able to recognize a specific antigen (Ag) and thus, Ag-specific T cells are thought to be important for eosinophilic infil-

tration into the conjunctiva. Cytokines, which are produced by Ag-specific T cells followed by Ag recognition, are considered to be involved in eosinophilic infiltration. Therefore, we investigated the involvement of cytokines, which are produced by immunocompetent cells and conjunctival cells, in the

別刷請求先：783-8505 南国市岡豊町小蓮 高知大学医学部視覚機能統御学教室 福島 敦樹

(平成 15 年 12 月 26 日受付, 平成 16 年 2 月 13 日改訂受理)

Reprint requests to : Atsuki Fukushima, M. D. Department of Ophthalmology and Visual Science, Kochi Medical School. Kohasu, Oko-cho, Nankoku 783-8505, Japan

(Received December 26, 2003 and accepted in revised form February 13, 2004)

infiltration of inflammatory cells into the conjunctiva, using an animal model for allergic conjunctival diseases (experimental immune-mediated blepharoconjunctivitis, EC). The peak of expression of Th 2 cytokines such as interleukin (IL)-4 in the rat conjunctiva was 6 and 12 hours after Ag challenge. In contrast, expression of Th 1 cytokines such as interferon (IFN)- γ persisted up to 48 hours after Ag challenge. The kinetic change of IL-4 was concordant with eosinophilic infiltration into the conjunctiva and that of IFN- γ was in accord with infiltration of macrophages. To investigate the roles of these cytokines, we induced conjunctivitis in cytokine knockout mice. The infiltration of inflammatory cells was attenuated in IL-4 knockout mice, whereas it was augmented in IFN- γ knockout mice. To further elucidate the roles of these cytokines, we induced and analyzed EC in Brown Norway rats. Eosinophilic infiltration was increased in EC induced by the transfer of T cells, which were

stimulated by IL-4. In addition, systemic treatment with IFN- γ inhibited eosinophilic infiltration in EC induced by active immunization, but did not affect infiltration of inflammatory cells in EC induced by passive immunization. These results demonstrate that IL-4 and IFN- γ are involved in the infiltration of eosinophils and macrophages, respectively. In addition, IFN- γ exerts its suppressive effects on the development of EC only during the induction phase of EC. Further detailed studies investigating the roles of cytokines in the conjunctiva will elucidate the developing mechanism of allergic conjunctival diseases. These studies will provide important clues for a therapeutic approach in targeting cytokines. Nippon Ganka Gakkai Zasshi (J Jpn Ophthalmol Soc 108 : 682—689, 2004)

Key words : Allergic conjunctival disease, Cytokine, IFN- γ , IL-4, Experimental immune-mediated blepharoconjunctivitis (EC)

I 緒 言

アレルギー性結膜疾患は I 型アレルギーの関与する結膜疾患の総称と定義されており、アレルギー性結膜炎、アトピー性結膜炎、春季カタル、巨大乳頭性結膜炎の 4 型に分類される¹⁾。日本眼科医会アレルギー性眼疾患調査研究班の分類によると、結膜増殖変化の有無により重症と軽症に大別できる¹⁾。春季カタルのような重症例では結膜に乳頭増殖がみられ、その結果として角膜障害に至る。結膜乳頭は線維芽細胞の増殖と炎症細胞浸潤から構成される。炎症細胞の中でも好酸球は組織障害に関与する顆粒を含有しており、角膜障害との関連性が濃厚である。アトピー性皮膚炎を合併する角結膜炎患者の角膜障害重症度を指標とした報告では、結膜浸潤好酸球数と角膜障害の程度に関連性が証明されている²⁾。また、結膜乳頭に浸潤している好酸球は細胞増殖因子を産生し、乳頭における線維芽細胞増殖にも関与している可能性が推定されている³⁾。すなわち、重症化の鍵を握る細胞は好酸球である。

アレルギー性結膜疾患は抗原特異的な疾患であるが、重症化の鍵を握る好酸球には抗原認識能はない。結膜好酸球浸潤にはエオタキシンの重要性が報告²⁾されているが、エオタキシンが結膜のどの細胞から、どのようなメカニズムで産生されるのかは不明である。一つの仮説として、T 細胞が産生するサイトカインが結膜線維芽細胞を活性化し、その結果エオタキシンを中心とするケモカインが産生され、結膜好酸球浸潤を誘導するカスケード(図 1)が考えられる⁴⁾。この仮説では T 細胞が一連の炎症反応の引き金を引くことになるが、T 細胞は抗原

特異的認識能を持つことから、この仮説は論理的であると思われる。

患者サンプルを用いた研究では、特定の時点での状況しか把握できない。また、上記の仮説を証明するには抗原特異的 T 細胞を患者結膜で同定し、なおかつ T 細胞—好酸球の相互作用を生体内で検討することが必要であるが、現時点では不可能に近い。そこで、著者のグルー

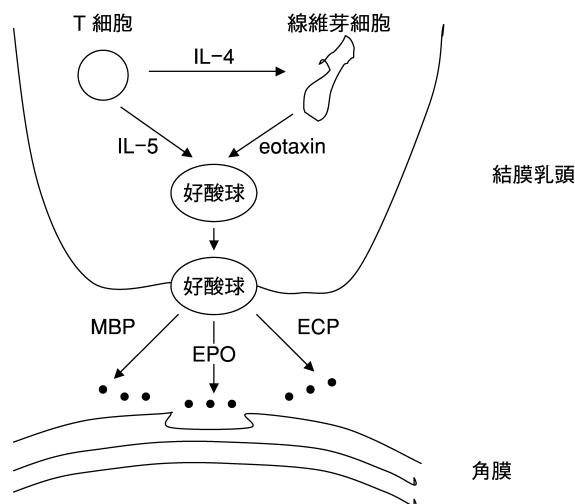


図 1 アレルギー性結膜疾患重症化メカニズムの仮説。結膜に浸潤した T 細胞は interleukin (IL)-4 を産生し線維芽細胞を活性化し、エオタキシンの産生を誘導する。エオタキシンは好酸球浸潤を促す。浸潤した好酸球は T 細胞の産生する IL-5 によりさらに活性化され、組織障害性蛋白 (MBP, EPO, ECP) を放出することにより、結膜のみならず隣接する角膜にも障害を与える。MBP : major basic protein, EPO : eosinophil peroxidase, ECP : eosinophil cationic protein.

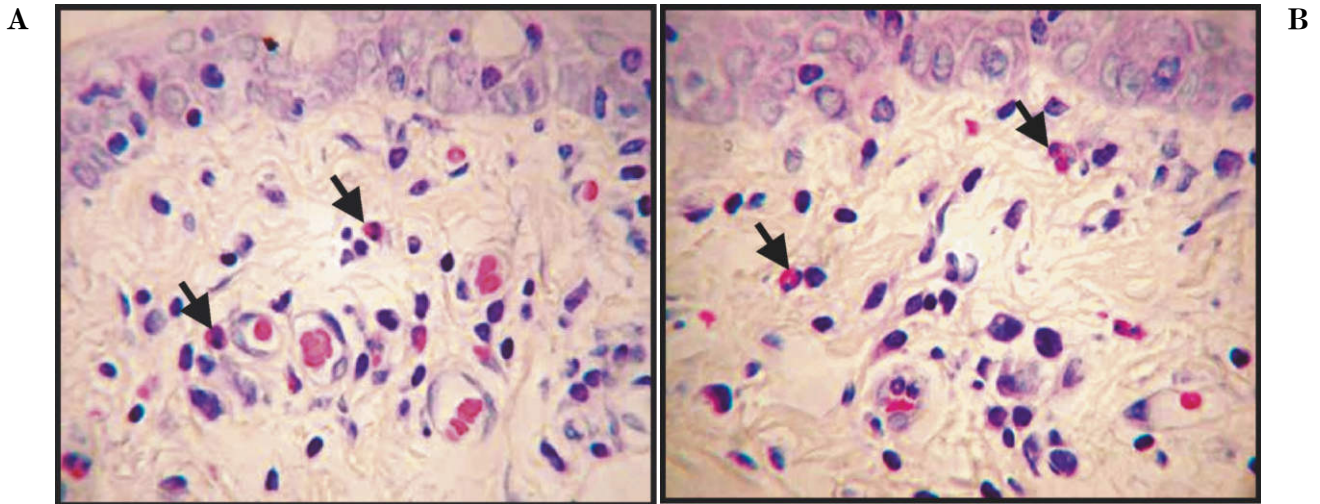


図 2 ブラウンノルウェー(BN)ラット実験的眼瞼結膜炎(EC)の病理像。

能動免疫でも(A), T細胞の移入による受動免疫でも(B), 好酸球を含む炎症細胞浸潤が結膜にみられる。抗原は卵白アルブミン(OVA)。抗原点眼 24 時間後, 結膜を採取し切片を作製した。May-Giemsa 染色。矢印: 好酸球。

プはアレルギー性結膜疾患動物モデルを作製し, T細胞の産生するサイトカインが結膜炎炎症細胞浸潤にどのような影響を及ぼすかを検討した。

II 動物モデルの作製

I 型アレルギー反応には IgE が関与する。そのためには Th2 免疫応答が優位に誘導される系統を用いる必要がある。そこで, 我々はブラウンノルウェー(BN)ラットに卵白アルブミン(OVA)あるいは short ragweed pollen(RW)を抗原としてアジュバントとともに能動免疫し, 免疫後 2~3 週間目に抗原を点眼し結膜炎を誘導した。この結膜炎を実験的眼瞼結膜炎(experimental immune-mediated blepharoconjunctivitis, EC)と名付けた^{5)~10)}。抗原点眼後 24 時間目には単核球と好酸球を中心とする炎症細胞浸潤がみられ(図 2 A)⁶⁾, ヒトアレルギー性結膜疾患の病像に合致すると考えられた。このモデルで特筆すべき点は, 能動免疫のみならず抗原特異的 T 細胞の移入による受動免疫でも感作状態が誘導できる点である。すなわち, BN ラットに抗原特異的 T 細胞を移入し, その 4 日後, 抗原を点眼すると好酸球を含む結膜炎炎症細胞浸潤が誘導できる(図 2 B)⁶⁾。

III 結膜におけるサイトカインの挙動

EC では単核球と好酸球の結膜への浸潤がみられる。上記の仮説(図 1)に従えば, それらの細胞浸潤の誘導にはサイトカイン, ケモカインが関与する。そこで, 結膜におけるサイトカイン, ケモカイン発現を経時的に検討した。EC を誘導した BN ラット結膜から RNA を抽出し reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) 法により解析した。能動免疫においても受動免疫(図 3)においても, 抗原点眼することにより結膜で

種々のサイトカイン(図 3 A), ケモカイン(図 3 B)の発現がみられた¹⁰⁾。検討したサイトカイン, ケモカインの多くは抗原点眼 6 時間目より発現が増強していた(図 3 A, B)。興味あることに, インターフェロン(IFN)- γ や IFN- γ inducible protein(IP)-10 に代表される Th1 型のサイトカインやケモカインは, その発現が 48 時間目まで持続したが, インターロイキン(IL)-4 に代表される Th2 型のサイトカインは 6~12 時間をピークとし, その後, 発現は減弱した(図 3 A, B)。それらの分子の挙動と一致して, 好酸球浸潤は 12 時間をピークとし(図 3 C), マクロファージは経時的に増加した(図 3 D)。これらの結果から, Th1 型細胞は IFN- γ を介してマクロファージ浸潤を, 一方 Th2 型細胞は IL-4 を介して好酸球浸潤を誘導することが推定された。

IV サイトカインの役割の検証: サイトカインノックアウトマウスを用いた解析

上記のように結膜におけるサイトカインの挙動が判明した。しかし, これらのサイトカインが本当に結膜炎発症に関与しているか否かを検証するには, サイトカインが過剰な状況(トランスジェニック)あるいはサイトカインが全くない状況(ノックアウト)で病像にどのような変化がみられるかを検討する必要がある。ラットではサイトカイントランスジェニック, サイトカインノックアウトは汎用されていないため, マウス(系統は C57BL6)を用いて解析を行った¹¹⁾。IL-4 あるいは IFN- γ ノックアウトマウス, 対照として野生型(WT)に RW を抗原として能動免疫を行い, その 10 日後に RW を点眼することにより結膜炎を誘導した。その結果, IL-4 ノックアウトマウスでは炎症細胞浸潤が誘導されないこと(図 4 B), IFN- γ ノックアウトマウス(図 4 C)では WT(図

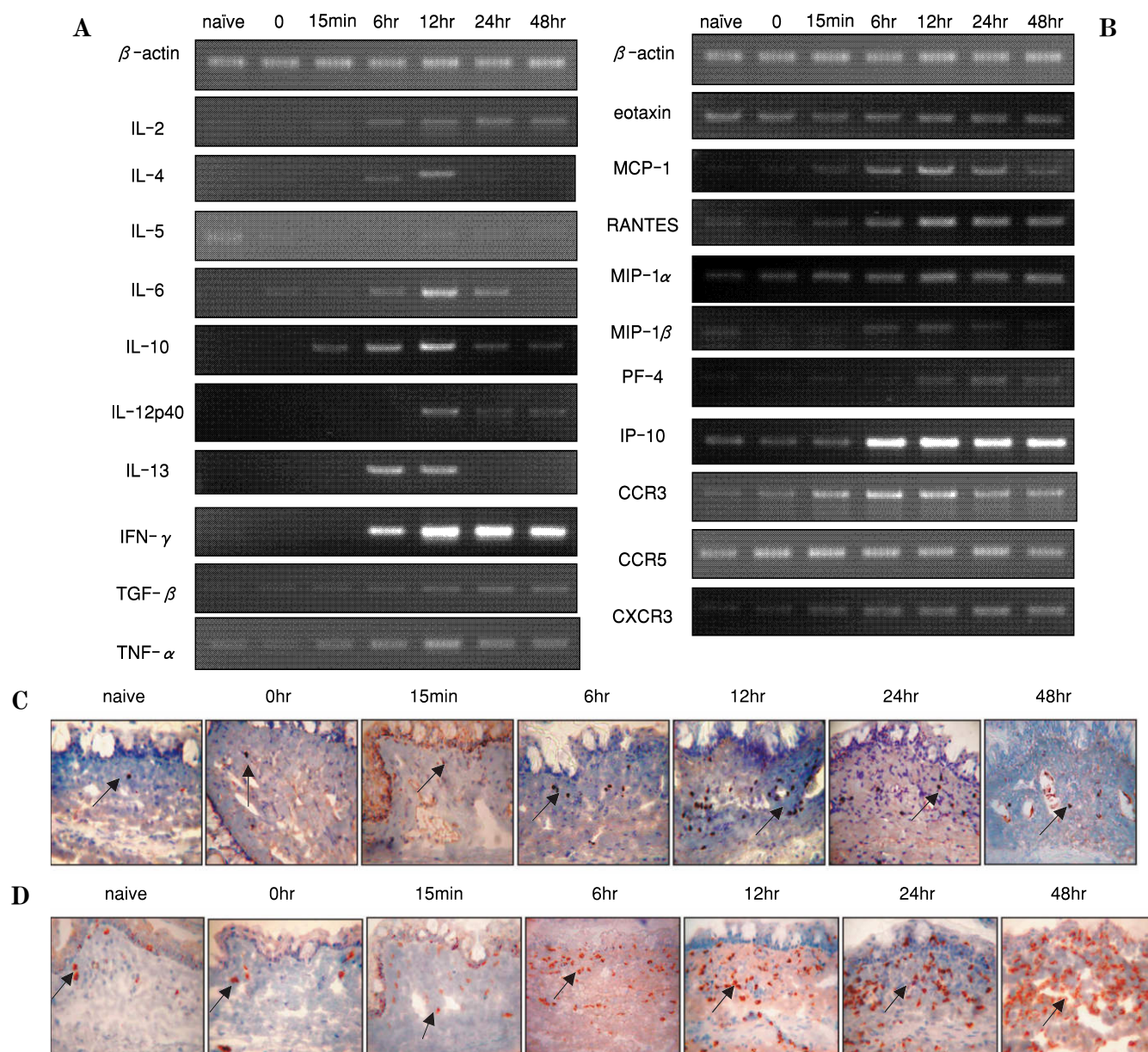


図 3 EC を誘導した BN ラット結膜におけるサイトカイン，ケモカインの経時的発現と好酸球，マクロファージの経時的浸潤。

T 細胞の移入により EC を誘導し，抗原(OVA)を点眼前，点眼 15 分，6，12，24，48 時間後に結膜を採取し，reverse transcription-polymerase chain reaction(RT-PCR)法を用いてサイトカイン(A)，ケモカイン(B)の発現を検討した。抗原点眼 6 時間目より多くのサイトカイン，ケモカインの発現増強がみられた。また，interferon(IFN)- γ や IFN- γ inducible protein(IP)-10 などの Th1 型サイトカイン，ケモカインは発現の持続がみられたが，IL-4 などの Th2 型サイトカインは 6～12 時間目に発現のピークを認めた。同様に採取した結膜から切片を作製し抗 major basic protein(MBP)抗体を用い好酸球(C)の，抗 CD 68 抗体(ED 1)を用いてマクロファージ(D)の経時的浸潤を検討した。好酸球は抗原点眼 12 時間目に浸潤のピークがみられたが，マクロファージは経時的に増加した。矢印：抗体染色陽性細胞。文献 10 より抜粋。

4 A)と比べて強い炎症細胞浸潤が誘導されることがわかった。この結果から，IL-4 は結膜炎細胞浸潤の誘導に必須であること，一方 IFN- γ は結膜炎細胞浸潤の誘導に抑制的に働くことが推定された。しかし，これらノックアウトマウスにおいては，IL-4 あるいは IFN-

γ が全身のいずれの臓器でも発現しておらず，免疫系の産生するサイトカインが炎症細胞浸潤の差異に関与するのか，あるいは結膜局所の細胞が産生するサイトカインが関与するのかは不明であった。そこで，IL-4 と IFN- γ の個々の役割を検討するため，次の研究へと進んだ。

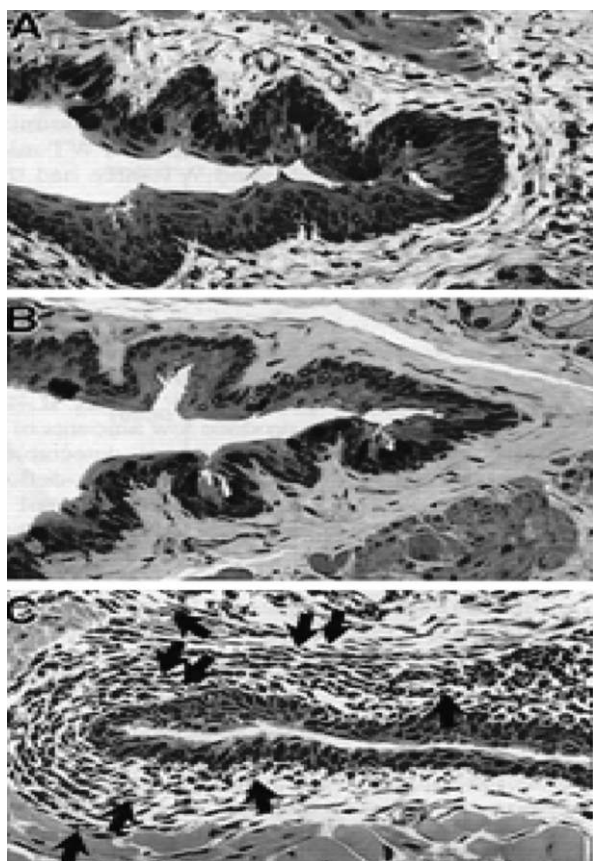


図 4 サイトカインノックアウトマウスにおける結膜炎炎症細胞浸潤。

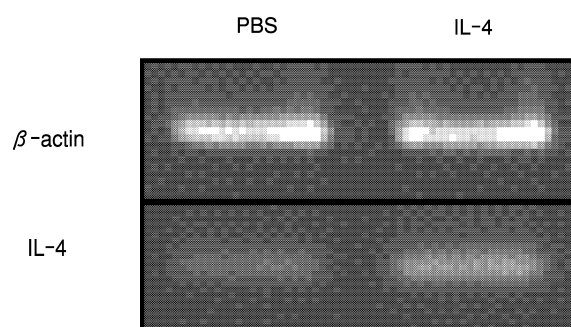
野生型(WT), IL-4 ノックアウト, IFN- γ ノックアウトマウスに short ragweed pollen(RW)を抗原として能動免疫で結膜炎を誘導し, 採取した結膜から切片を作製した。WT(A)と比較し, IL-4 ノックアウト(B)では炎症細胞浸潤の減弱を, IFN- γ ノックアウトマウス(C)では増強を認めた。Giemsa 染色。矢印: 好酸球。文献 11 より抜粋。

V 免疫系細胞が IL-4 を多量に産生する場合

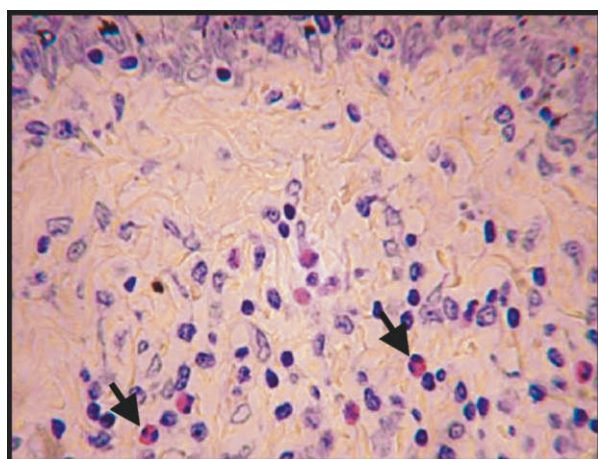
IL-4 は Th2 細胞から産生されるのみならず, Th2 細胞の分化誘導にも重要であることが知られている。そこで, BN ラットに RW を抗原としたシステムで, 免疫系細胞から IL-4 が過剰に産生される場合, 病像にどのような影響を与えるかを検討した¹²⁾。RW を免疫した所属リンパ節細胞に *in vitro* で抗原刺激を加える際 IL-4 を添加し, 72 時間後に細胞を回収し, IL-4 の発現を RT-PCR 法により検討した。その結果, IL-4 を添加することによりリンパ節細胞で IL-4 の mRNA 発現が増強していた(図 5 A)¹²⁾。続いて, この細胞を BN ラットに移入し, 上記と同様に結膜炎炎症細胞浸潤を評価した。IL-4 刺激を受けたリンパ節細胞は対照群と比較し強い好酸球浸潤を誘導した(図 5 B)¹²⁾。すなわち, 免疫系細胞の産生する IL-4 は結膜において好酸球浸潤に関与することが証明され, 仮説(図 1)を支持する結果となった。

A

in vitro 刺激

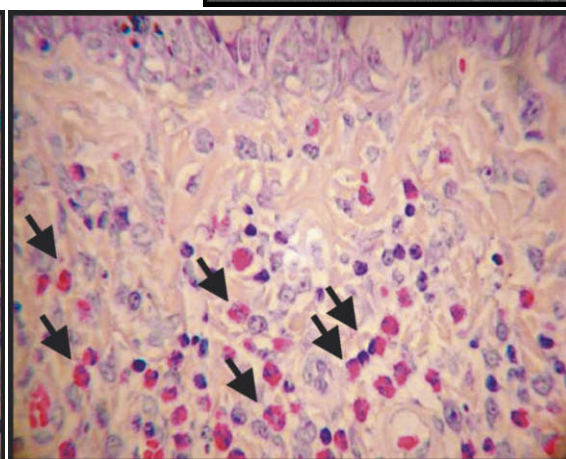


B



PBS

C



IL-4

図 5 結膜好酸球浸潤に及ぼす IL-4 の影響。

RW 感作を受けた BN ラットリンパ節細胞に RW 刺激を加える際, IL-4 を添加した群としない群とを比較し, IL-4 の及ぼす影響を検討した。IL-4 を添加することによりリンパ球における IL-4 mRNA の発現上昇がみられた(A, RT-PCR 法)。細胞移入による結膜好酸球浸潤を比較したところ, IL-4 を添加した細胞を移入した群でより強い好酸球浸潤がみられた(B, May-Giemsa 染色)。矢印: 好酸球。

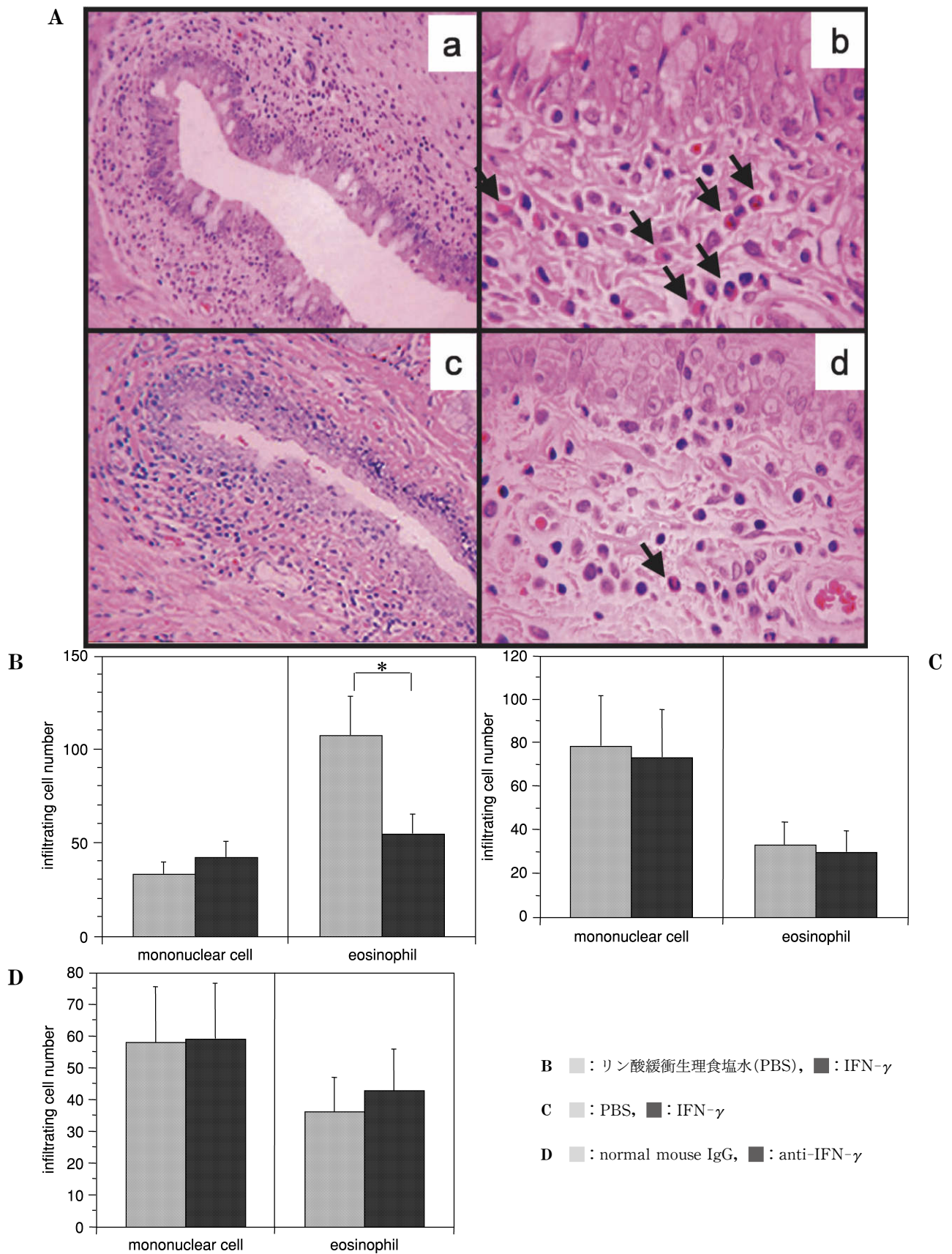


図 6 IFN- γ による結膜炎細胞浸潤抑制機序の検討.

BN ラットに OVA を抗原とし、能動免疫(A, B)と T 細胞の移入による受動免疫(C, D)により EC を誘導した。能動免疫の際に IFN- γ を全身投与することにより(弱拮: A-c, 強拮: A-d), 対照群(PBS 全身投与, 弱拮: A-a, 強拮: A-b)と比較し結膜への好酸球浸潤の減弱をみた(A の矢印: 好酸球, B の*: $p < 0.05$)。一方, 受動免疫の際に IFN- γ を投与しても(C), 抗 IFN- γ 抗体を投与しても(D), 対照群と比較し明らかな差はみられなかった。文献 13 より抜粋。

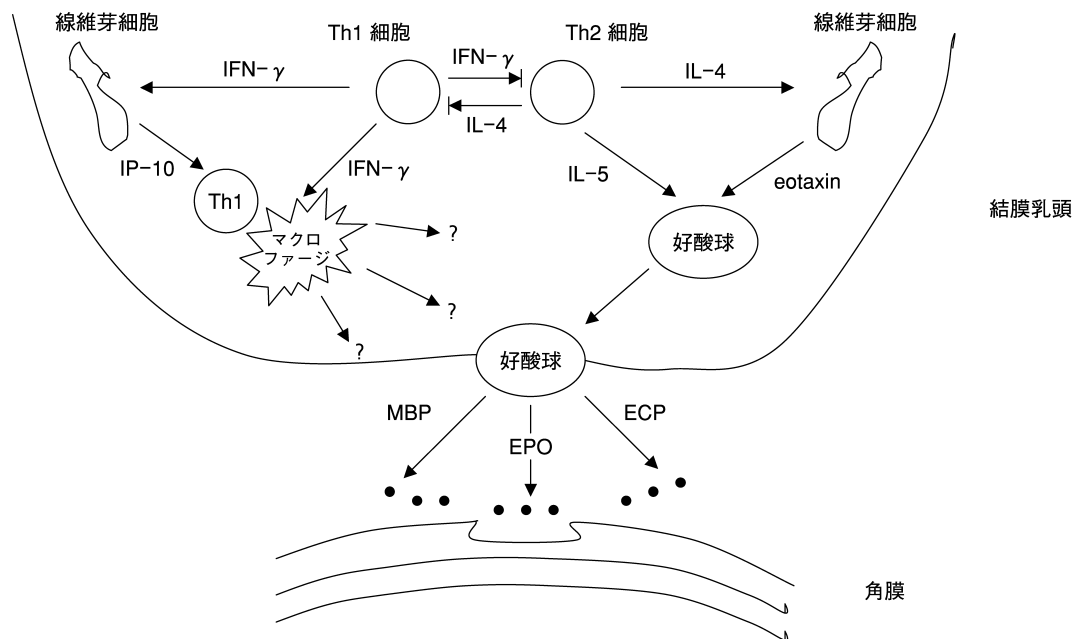


図 7 Th1 細胞の関与を含めたアレルギー性結膜疾患重症化メカニズムの仮説。

結膜に浸潤した Th2 細胞は IL-4 を産生し線維芽細胞を活性化し、エオタキシンの産生を誘導する。エオタキシンは好酸球浸潤を促す。浸潤した好酸球は Th2 細胞の産生する IL-5 によりさらに活性化され、結膜のみならず隣接する角膜にも障害を与える。同様に Th1 細胞から産生された IFN- γ は線維芽細胞を活性化し、IP-10 の産生を誘導する。IP-10 などが Th1 細胞やマクロファージを浸潤させ、浸潤したマクロファージは IFN- γ によりさらに活性化される。活性化されたマクロファージの結膜組織障害における役割は現時点では不明である。また Th1 細胞と Th2 細胞は互いに抑制している可能性が考えられる。

VI IFN- γ による結膜炎症細胞浸潤抑制メカニズム

ノックアウトマウスでの解析結果¹¹⁾から、IFN- γ は結膜炎症細胞浸潤に抑制的に働くことが判明した。しかし、このマウス結膜炎は能動免疫により誘導されており、IFN- γ がどの時点でその抑制能を発揮しているかは不明であった。そこで、我々は BN ラットのシステムで IFN- γ の果たす役割を解析した。能動免疫を用いることにより抗原特異的免疫応答が成立する過程 (induction phase) での IFN- γ の役割を、抗原特異的 T 細胞の移入を用いることにより結膜炎を誘導する過程 (effector phase) での IFN- γ の役割を検討した¹³⁾。能動免疫により誘導する際に IFN- γ を繰り返し全身投与することにより、結膜での好酸球浸潤が有意に抑制された (図 6 A, B)¹³⁾。一方、T 細胞の移入による受動免疫では、IFN- γ の投与は結膜炎症細胞浸潤に明らかな影響を与えなかった (図 6 C)¹³⁾。すなわち、effector phase では IFN- γ は結膜炎症細胞浸潤に関して抑制能を持たないと考えられた。続いて、IFN- γ の機能を抑制するため、受動免疫されたラットに抗 IFN- γ 抗体を投与したが、結膜炎症細胞浸潤に明らかな影響はみられなかった (図 6 D)¹³⁾。以上の結果から、ノックアウトマウスを用いた実験で判明した、IFN- γ の結膜炎症細胞浸潤抑制能は、抗原特異的免疫応答の成立過程 (induction

phase) に発揮されているものと考えられた。

VII 仮説の再考

はじめに提示した仮説 (図 1) は Th2 応答が関与する場合のみに限定したものである。しかしヒトの場合は、Th1 応答が全く誘導されず Th2 応答のみが誘導され、その結果、アレルギー性結膜疾患が誘導される状況は非常に稀である。すなわち、Th1 応答も何らかのかたちで同時に関与しているはずである。実際、Th2 応答が優位であるといわれている春季カタルにおいても結膜で IFN- γ が全くみられないわけではない¹⁴⁾、アトピー角結膜炎では IFN- γ の発現が IL-4 よりも顕著であると報告¹⁵⁾¹⁶⁾されている。我々の報告している EC は Th1 と Th2 が混在しており、IL-4 も IFN- γ もみられることから、サイトカインパターンからするとアトピー角結膜炎に合致するモデルであると思われる。そこで、本研究で得られた事実を加味して、Th1 応答の関与を含めて仮説を再考した (図 7)。好酸球浸潤には抗原特異的 Th2 細胞が結膜で抗原を認識することにより産生する IL-4 が重要であり、産生された IL-4 はおそらく線維芽細胞に働きかけることにより、エオタキシンなどのケモカインの産生を促し、その結果として好酸球浸潤が誘導される。一方、抗原特異的 Th1 細胞が活性化されることにより IFN- γ を産生し、IFN- γ がおそらく線維芽細胞に働きかけることにより IP-10 などが産生され Th1 細胞

やマクロファージ浸潤を誘導する。浸潤したマクロファージは IFN- γ により、さらに活性化されると考えられる。現時点ではアレルギー性結膜疾患におけるマクロファージの役割は不明な部分が多い。また、Th1 細胞、Th2 細胞は結膜に混在しているが、両者間のクロストークに関しても現時点では不明である。しかし、EC を誘導した結膜において Th2 型サイトカインは抗原チャレンジ後 12 時間以降に減弱するが、Th1 型サイトカインの発現は持続することから(図 3 A), IFN- γ の発現が持続することにより IL-4 などの Th2 型サイトカイン発現が negative regulation を受けている可能性が考えられる。

VIII 結 語

以上の一連の研究から、アレルギー性結膜疾患発症におけるサイトカインの役割の一部が明らかとなった。しかし、それぞれのサイトカインが結膜でどの細胞を標的として働いているか、またその標的細胞がサイトカインによる刺激を受けてどのような機能を発揮するかにしては不明な部分が多い。これら不明な部分を解析することにより、アレルギー性結膜疾患発症におけるサイトカインの役割を正確に理解し、結膜局所でサイトカインの機能を抑制あるいは増強することが治療の上で役に立つかどうかを明らかにしたい。

すべての研究に対し、ご指導ならびにご援助していただいている高知大学医学部視覚機能統御学教室上野脩幸教授に感謝いたします。また、多くの実験を行ってきた高知大学医学部視覚機能統御学教室の大学院生の先生方ならびに技術補佐員の方々に感謝いたします。

本研究の一部は文部科学省科学研究費、高知信用金庫安心友の会学術奨励賞、高知医科大学学長裁量経費ならびにアカデミア高知の援助を受けました。

文 献

- 1) 日本眼科医会アレルギー性眼疾患調査研究班：アレルギー性結膜疾患の臨床像と鑑別診断。日本の眼科 67：付録，1996。
- 2) Fukagawa K, Nakajima T, Tsubota K, Shimura S, Saito H, Hirai K：Presence of eotaxin in tears of patients with atopic keratoconjunctivitis with severe corneal damage. J Allergy Clin Immunol 103：1220—1221, 1999。
- 3) Leonardi A, Brun P, Tavolato M, Abatangelo G, Plebani M, Secchi AG：Growth factors and collagen distribution in vernal keratoconjunctivitis. Invest Ophthalmol Vis Sci 41：4175—4181, 2000。
- 4) 眼アレルギーフォーラム 21：眼アレルギークリニックエッセンス。p 10, 2001。
- 5) Yoshida O, Yoshida H, Iwamoto H, Nishino K, Fukushima A, Ueno H：Genetic background determines the nature of immune responses and experimental immune-mediated blepharoconjunctivitis(EC). Curr Eye Res 18：117—124, 1999。
- 6) Iwamoto H, Nishino K, Magone TM, Whitcup SM, Yoshida O, Yoshida H, et al：Experimental immune-mediated blepharoconjunctivitis(EC) in rats induced by immunization with ragweed pollen(RW). Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol 238：346—351, 2000。
- 7) Nishino K, Fukushima A, Okamoto S, Ohashi Y, Fukata K, Ozaki A, et al：Suppression of experimental immune-mediated blepharoconjunctivitis in Brown Norway rats by topical application of Fk506. Graefes Arch Clin. Exp Ophthalmol 240：137—143, 2002。
- 8) Ozaki A, Fukushima A, Fukata K, Ueno H：Mast-cell activation augments the late phase reaction in experimental immune-mediated blepharoconjunctivitis. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol 241：394—402, 2003。
- 9) Fukushima A, Ozaki A, Fukata K, Ueno H. Differential expression and signaling of IFN- γ in the conjunctiva between Lewis and Brown Norway rats. Microbiol Immunol 47：785—796, 2003。
- 10) Fukushima A, Ozaki A, Fukata K, Ishida W, Ueno H：Ag-specific recognition, activation and effector function of T cells in the conjunctiva developing experimental immune-mediated blepharoconjunctivitis. Invest Ophthalmol Vis Sci 44：4366—4374, 2003。
- 11) Magone TM, Whitcup SM, Fukushima A, Chan C-C, Silver PB, Rizzo LV：IL-12 is essential for the induction of late phase cellular infiltration in a murine model of allergic conjunctivitis. J Allergy Clin Immunol 105：299—308 2000。
- 12) Ozaki A, Fukushima A, Fukata K, Ueno H：Effects of IL-4 and IL-12 on experimental immune-mediated blepharoconjunctivitis in Brown Norway rats. Clin Exp Immunol 122：28—34, 2000。
- 13) Fukushima A, Fukata K, Ozaki A, Takata M, Kuroda N, Enzan H, et al：Exertion of the suppressive effects of IFN- γ on experimental immune-mediated blepharoconjunctivitis in Brown Norway rats during the induction phase but not the effector phase. Br J Ophthalmol 86：1166—1171, 2002。
- 14) Leonardi A, DeFranchis G, Zancanaro F, Crivellari G, De Paoli M, Plebani M, et al：Identification of local Th2 and Th0 lymphocytes in vernal conjunctivitis by cytokine flow cytometry. Invest Ophthalmol Vis Sci 40：3036—3040, 1999。
- 15) 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。
- 16) 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。