

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—

庄司 純, 稲田 紀子, 高浦 典子, 澤 充

日本大学医学部眼科学教室

要 約

アレルギー性結膜炎の際の角結膜および涙腺の病態を解明するために、動物モデルを用いて、炎症細胞浸潤と接着分子の関係を組織化学的に検討した。ハートレイ系モルモットに卵白アルブミン-水酸化アルミニウムの混合液を腹腔内投与して感作した後、卵白アルブミン溶液を点眼してアレルギー性結膜炎を誘発した。抗原点眼後、経時的に角膜、結膜および涙腺の凍結切片を作製し、酸性ギムザ染色で浸潤細胞を、酵素抗体法によって intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) および vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) について検討した。浸潤細胞は、抗原点眼後6時間では好中球、12

時間後では好酸球、24時間後では好酸球とリンパ球が主体であった。また、ICAM-1は点眼6時間以後に、VCAM-1は点眼24時間以後に結膜下組織および涙腺の血管に観察された。アレルギー性結膜炎の際の炎症細胞の組織内浸潤に接着分子の関与が示唆された。(日眼会誌 99:129-134, 1995)

キーワード：アレルギー性結膜炎、接着分子、イムノグロブリン スーパーファミリー、好酸球、免疫組織化学

Histological Study of Allergic Conjunctivitis

—1. Study on the Adhesion Molecules to Allergic Conjunctivitis—

Jun Shoji, Noriko Inada, Noriko Takaura and Misturu Sawa

Department of Ophthalmology, School of Medicine, Nihon University

Abstract

We performed an immunohistochemical study on the relationship between inflammatory cells and adhesion molecules to investigate inflammatory reaction in allergic conjunctivitis. Guinea pigs were sensitized with an intraperitoneal injection of ovalbumin with hydroxylaluminium. Ovalbumin was applied topically to the conjunctiva 3 weeks after the initial treatment. Then the cornea, conjunctiva and lacrimal gland were taken and processed for frozen sections. The specimens were stained with acid Giemsa for inflammatory cells and enzyme-labelled antibody for ICAM-1 and VCAM-1. Neutrophils were dominantly observed 6 hours after the chal-

lenge with the antigen, eosinophils at 12 hours, and eosinophils and lymphocytes at 24 hours, respectively. ICAM-1 and VCAM-1 were detected at 6 and 24 hours in the vascular tissue in the subconjunctival tissue and lacrimal gland. These results suggest that adhesion molecules play a role in the infiltration of inflammatory cells in allergic conjunctivitis. (J Jpn Ophthalmol Soc 99:129-134, 1995)

Key words: Allergic conjunctivitis, Adhesion molecules, Immunoglobulin superfamily, Eosinophils, Immunohistochemistry

I 緒 言

アレルギー反応は Coombs & Gell 分類で I~IV 型に分けられている。アレルギー性結膜炎は I 型アレルギー

(即時型アレルギー) 反応によって起こる結膜炎であり、肥満細胞の IgE レセプターに結合した IgE とアレルギー抗原が反応し、IgE レセプターの bridging (架橋形成) が起こると、肥満細胞からヒスタミン、セロトニン、トロン

別刷請求先：173 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 庄司 純
(平成6年7月11日受付, 平成6年9月29日改訂受理)

Reprint requests to: Jun Shoji, M.D. Department of Ophthalmology, School of Medicine, Nihon University, 30-1 Ohyaguchi Kami-machi, Itabashi-ku, Tokyo 173, Japan

(Received July 11, 1994 and accepted in revised form September 29, 1994)

ボキサン A₂などの化学伝達物質が放出され、結膜充血、結膜浮腫などの臨床症状を呈するものと考えられてきた¹⁾。

気管支喘息患者にアレルゲンを吸入させると、吸入後15～30分をピークとして観察される即時性の気道収縮と、4～6時間後から徐々に起こってくる持続性の長い気道収縮とが観察される。前者は即時型喘息反応(immediate asthmatic response, IAR)、後者は遅発型喘息反応(late asthmatic response, LAR)と呼ばれ、1972年には Hargreave ら²⁾により LAR の病態生理学的特徴が報告された。以来、I型アレルギー反応は、即時型反応(early phase reaction, EPR)と遅発型反応(late phase reaction, LPR)に分けられている。特に、LPRは、アレルギー反応の遷延化および複雑化に関与する反応であり、組織に浸潤してくる好酸球、好中球、リンパ球を中心とした細胞反応や浸潤細胞が遊離する組織障害性のメディエーターなど種々の因子が LPR の病態に関与する因子となり得るとして検討がなされている^{3,4)}。また、アレルギー反応における好酸球を主体とした細胞浸潤は、炎症反応としての側面を持っており、その病態はアレルギー性炎症として検討されている。

アレルギー性炎症に関与する細胞は、好酸球をはじめとして、好中球、好塩基球、肥満細胞、さらにはリンパ球、マクロファージ、血小板などが報告されている⁴⁾。また、サル喘息モデルにおいて抗 ICAM-1 抗体の投与によって気道への好酸球浸潤および過敏反応などの LPR を抑制することが報告⁵⁾され、LPR に関与する炎症細胞の病巣局所への選択的な遊走には、炎症細胞や血管内皮細胞に発現されている接着分子が重要な役割を演じていると考えられている^{6,7)}。

アレルギー性結膜炎における LPR については、Allan-smith ら⁸⁾によってラットの実験モデルで、雑賀ら⁹⁾は臨床研究によって報告している。しかし、アレルギー性結膜炎の LPR における接着分子の関与、浸潤細胞の種類や動態についてはまだ不明な点が数多く残されている。今回我々は、腹腔内感作によるモルモットに抗原溶液を点眼し、アレルギー性結膜炎に類似した臨床症状を発現せしめ、この動物モデルを使用して、結膜における炎症細胞の動態と接着分子の発現について組織学的に検討したので報告する。

II 実験方法

1. アレルギーモデルの作製

実験動物には、300～500 g ハートレイ系モルモットを使用した。抗原には卵白アルブミン(Sigma)を使用した。卵白アルブミン 100 μg/ml と水酸化アルミニウム 5 mg/ml の混合液を作製し、その 1 ml を1週間に1回、合計2回の腹腔内投与を行った。卵白アルブミン 5 mg/ml の溶液を作製し、最終の腹腔内投与から3週間後にその

0.05 ml を点眼した。点眼後は、30分、6、12、24時間後に肉眼的に臨床症状を観察した後、過量のペントバルビタールナトリウム(ネプタール®)を腹腔内投与して屠殺し、眼瞼、眼球および涙腺を摘出し、以下の組織学的検討を行った。

2. 組織学的検討

摘出した組織は、2% periodate-lysis paraformaldehyde で1時間固定した後、OCT compound に包埋し、ドライアイス-イソペンタンで急速凍結した。凍結した試料は、クライオスタットで約 8 μm の連続切片に作製した。

切片の一部は、70% エタノール溶液に5分間浸漬した後、風乾し、Diff Quick®(ミドリ十字)を用いて、キットの染色方法に従って酸性ギムザ染色を行った。

残りの切片は、風乾した後、間接酵素抗体法に使用した。第一抗体には、モノクローナル抗ラット intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) 抗体 (1A 29) (生化学工業) またはモノクローナル抗 vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) 抗体 (1G 11) (コスモバイオ) を用い、Vectastain® ABC-GO キット(フナコシ)を用いて間接酵素抗体法(ABC グルコースオキシダーゼ法)を施行した。発色には、グルコースオキシダーゼ基質キット(フナコシ)の nitroblue tetrazolium 法を使用し、核染色にはメチルグリーンを用いた。組織標本の観察は、光学顕微鏡で行った。

III 結果

1. 臨床所見

肉眼的観察では、点眼30分後に結膜充血と著しい結膜浮腫が観察された(図1)。点眼6時間後では、結膜浮腫は消失していたが、結膜充血が観察されるとともに、眼瞼腫脹を伴う高度の結膜肥厚を認めた(図2)。この所見は点眼6時間をピークとして点眼24時間後まで観察された。

2. 酸性ギムザ染色

点眼30分後では、結膜上皮下組織の浮腫および血管拡張を認め、拡張した血管内には好中球が観察されたが、血管の周囲に浸潤細胞はほとんどみられなかった(図3)。点眼6～12時間では、結膜下組織、輪部上皮下および涙腺導管周囲を中心に好中球および好酸球の浸潤を認めた。浸潤細胞は、点眼6時間後では好中球が主体であったが、点眼12時間後では好酸球が主体であった(図4)。点眼24時間後では、結膜下組織および輪部上皮下および涙腺導管周囲に好酸球およびリンパ球が認められた。また、好酸球は、結膜上皮や涙腺導管上皮内にも浸潤していたが、涙腺の腺房間にはほとんどみられなかった。また、結膜下組織に、好酸球およびリンパ球の浸潤が強い眼瞼結膜では、結膜上皮が層状に脱落していた(図5、6)。

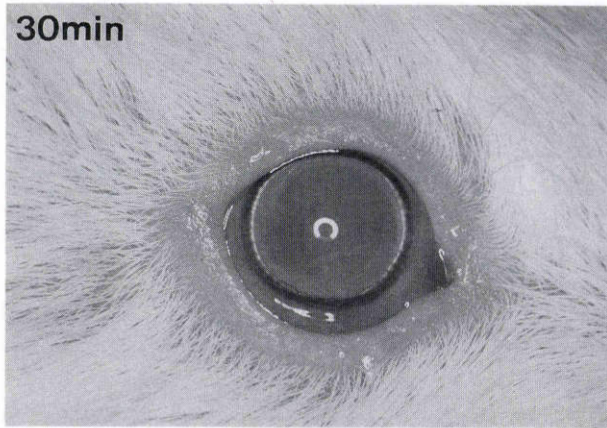


図1 点眼後30分の臨床所見。
著しい結膜浮腫を認める。

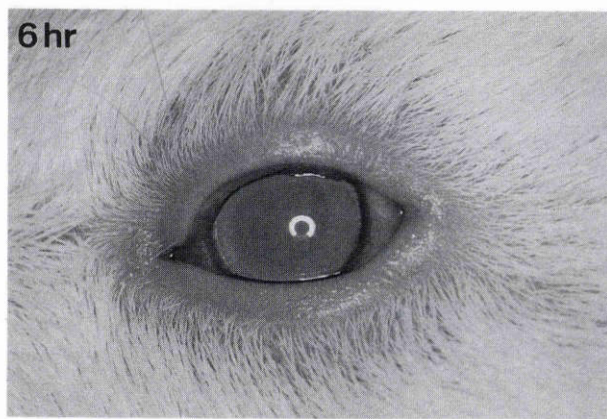


図2 点眼後6時間の臨床所見。
眼瞼の腫脹および結膜充血を認める。

3. 免疫組織化学

点眼前および点眼30分後では、ICAM-1陽性所見はほとんど観察されなかった。点眼6時間後から、瞼結膜から球結膜および輪部に至るほぼ全域の結膜下組織の血管内皮にICAM-1陽性像が散見されたが、中でも、結膜濾胞周囲、輪部および瞼縁付近の瞼結膜の血管に多数の陽性所見を認め、点眼12時間後では、血管周囲に浸潤した一部の細胞もICAM-1陽性であった(図7, 8)。また、点眼6時間以降の涙腺内の血管にICAM-1陽性の所見を認めた(図10)。VCAM-1は、点眼前から点眼6時間後までは、ほとんど陽性所見を認めなかった。点眼12時間では、血管周囲に浸潤した細胞の一部に陽性所見を認めたものの、輪部および結膜下の血管内皮にはほとんど陽性所見を認めなかった。点眼24時間では、瞼結膜から輪部にかけてのほぼ全域で、上皮下の血管内皮に陽性所見が観察された(図9)。また、涙腺内の血管では、点眼24時間後にVCAM-1陽性の所見を認めた(図10)。連続切片により、ICAM-1またはVCAM-1の陽性所見を比較検討すると、点眼24時間後では、ほぼ同一の血管でICAM-1およびVCAM-1の両者とも陽性を示した(図11)のに対して、点眼12時間後ではICAM-1のみ陽性で

あった。

IV 考 按

今回、アレルギー性結膜炎の動物モデルを使用して、その炎症反応を組織化学的に検討した。Ovalbumin(OA)を抗原としたモルモットのアレルギーモデルとしては、抗原特異的IgEおよびIgG抗体を多量に含んだ同種OA血清を静脈内投与して感作した動物を使用する受身感作法と、アジュバントとともにOAを腹腔内に投与し、抗体価の上昇した動物を使用する能動感作法とがある。喘息モデルで両者を検討した結果、受身感作法よりも能動感作法の方が強い好酸球浸潤と遷延性の細胞浸潤が認められたと報告されており、受身感作法を用いた場合には、late phase reaction(LPR)が起こらなかったと報告¹⁰⁾されている。今回我々は、アレルギー性結膜炎におけるLPRの存在、細胞浸潤と接着分子の関与を検討することを目的としたため、アレルギーモデル作製には能動感作法を用いた。

臨床的観察では、抗原(ovalbumin, OA)点眼後30分をピークとして球結膜の浮腫および充血を主体とした結膜炎症状と、点眼後6時間以降に眼瞼の腫脹を伴った結膜充血との二峰性の反応が観察され、前者がearly phase reaction(EPR)、後者がLPRであると考えられた。一方、組織学的に検討すると、点眼30分後の試料では、組織の浮腫および血管拡張がみられたが、浸潤細胞はほとんど観察されなかった。また、点眼6時間後では、好中球が主体の細胞浸潤がみられ、点眼12時間後では好酸球主体の細胞浸潤に、点眼24時間後では好酸球とリンパ球主体の細胞浸潤へと変化し、結膜上皮にも障害がみられた。これらの所見と喘息モデルとを比較すると、Iijimaら¹¹⁾は、アスカリス抗原感作モルモットではLPRの発現時に好酸球と好中球の増加がみられたと報告し、阿久津ら¹²⁾は卵白アルブミン能動態感作モルモットでLPR時の好酸球の増加を報告している。また、浸潤細胞の中でも、特に好酸球の浸潤と上皮障害に深い関係があり、Wardlaw¹³⁾は、気管支肺洗浄で剝離上皮細胞数、好酸球数および好酸球顆粒蛋白濃度との間に相関関係が認められることを報告している。皮膚科の領域では、Frewら¹⁴⁾が原因抗原を皮内に注射し、経時的に生検組織を検討し、抗原誘発6時間後の浸潤細胞は好酸球、好中球、Tリンパ球であったのに対して、24時間後では、好中球は消失し、好酸球とTリンパ球になっていたこと報告している。以上のことから、結膜に生じた好酸球、好中球およびリンパ球を中心とした細胞浸潤の所見はアレルギー性結膜炎におけるアレルギー反応においてもLPRならびにアレルギー性炎症が起こっている可能性を示唆する組織学的所見であると考えられる。

今回、接着分子に関してはイムノグロブリンスーパーファミリーに属するintercellular adhesion molecule-

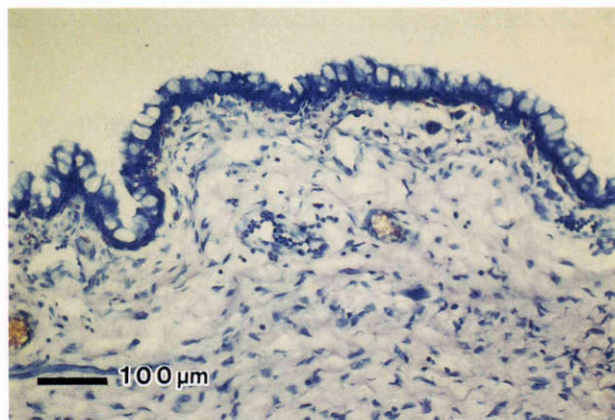


図3 点眼後30分の瞼結膜（酸性ギムザ染色）。
結膜下組織に浮腫および血管拡張を認めるが、炎症細胞はほとんど認めない。

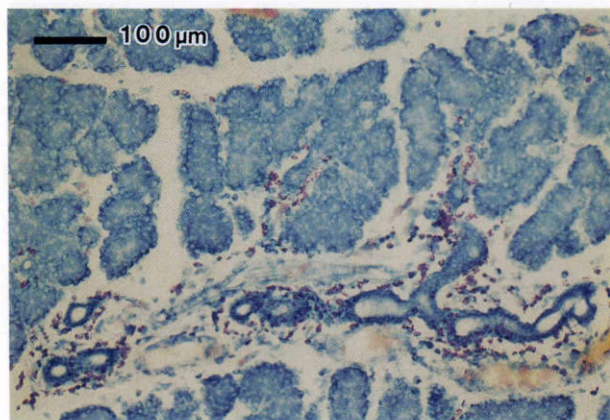


図6 点眼後24時間の涙腺（酸性ギムザ染色）。
涙腺導管周囲に好酸球の浸潤を認める。

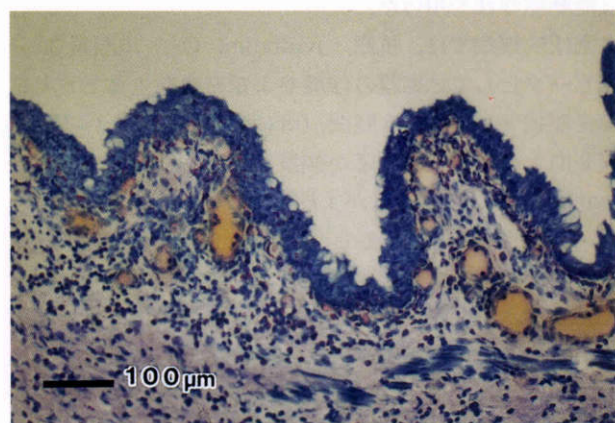


図4 点眼後12時間の瞼結膜（酸性ギムザ染色）。
結膜下組織に好中球および好酸球の浸潤を認める。

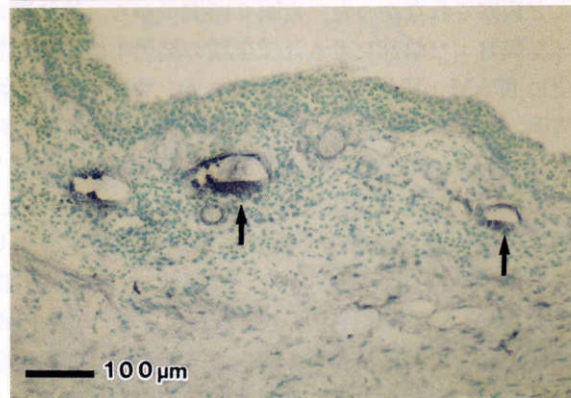
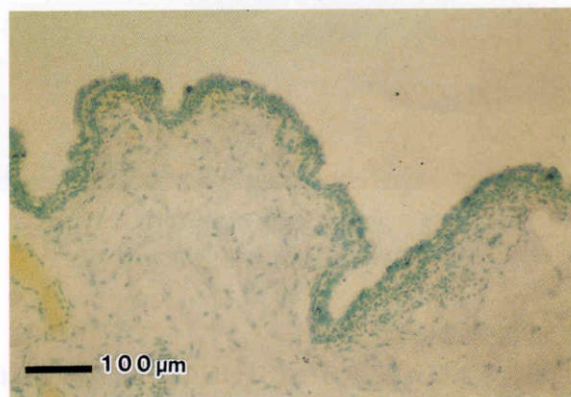


図7 瞼結膜のICAM-1（酵素抗体法）。
点眼後30分（上段）では結膜下組織の血管はICAM-1陰性であるが、24時間（下段）ではICAM-1陽性である（矢印）。

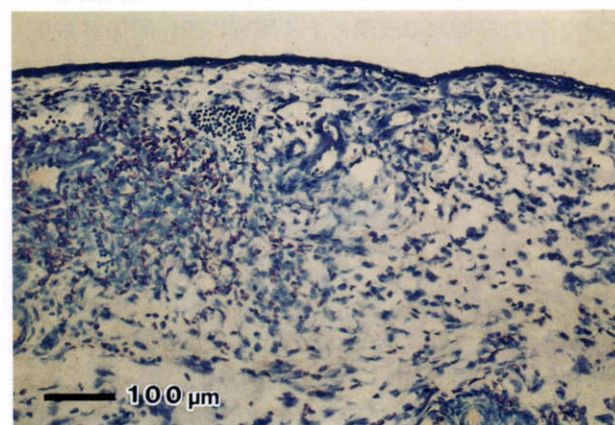


図5 点眼後24時間の瞼結膜（酸性ギムザ染色）。
結膜下組織に好酸球およびリンパ球主体の細胞浸潤を認める。結膜上皮は一部脱落し、goblet細胞も減少している。

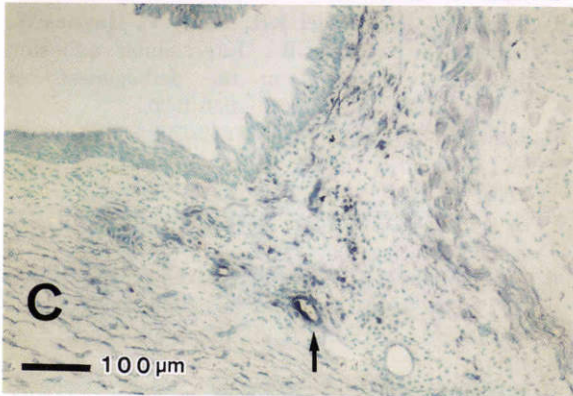
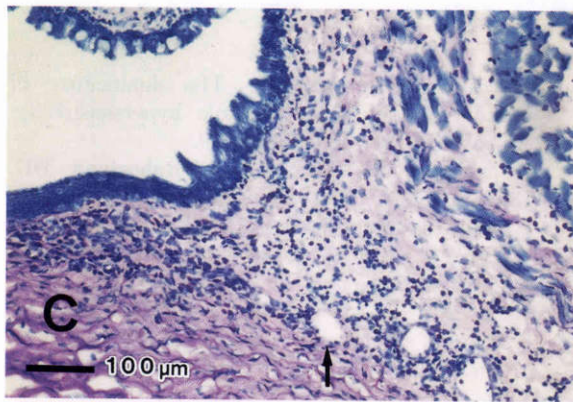


図8 点眼後12時間の輪部(上段:酸性ギムザ染色・下段:ICAM-1).
輪部結膜上皮下に好中球および好酸球の浸潤を認め、血管内皮細胞にはICAM-1が発現されている(矢印).
浸潤細胞の一部もICAM-1陽性である. C:角膜

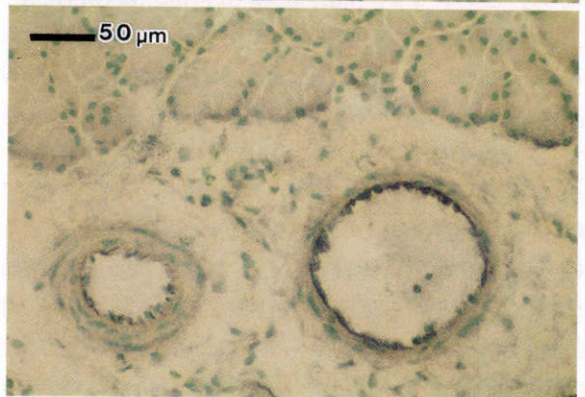
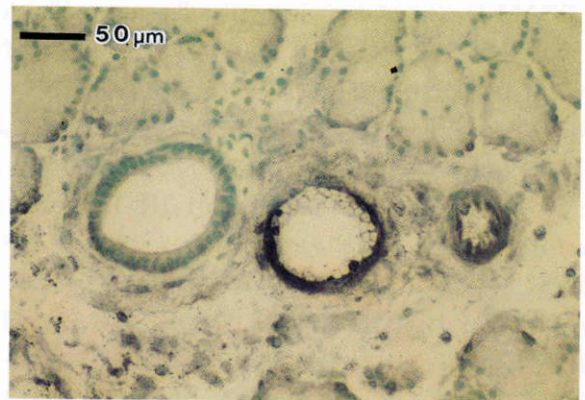


図10 涙腺組織内の血管に発現された接着分子.
上段:点眼6時間後ではICAM-1陽性の血管を認める.
下段:点眼24時間後ではVCAM-1陽性の血管を認める.

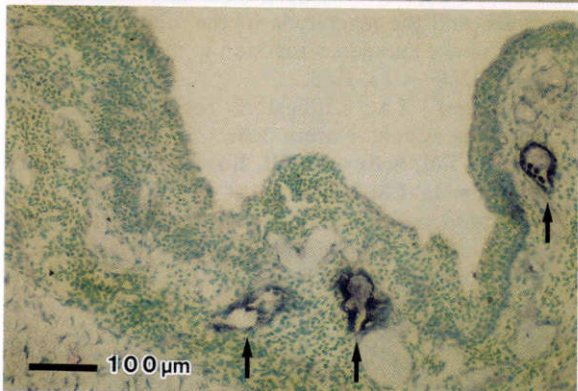
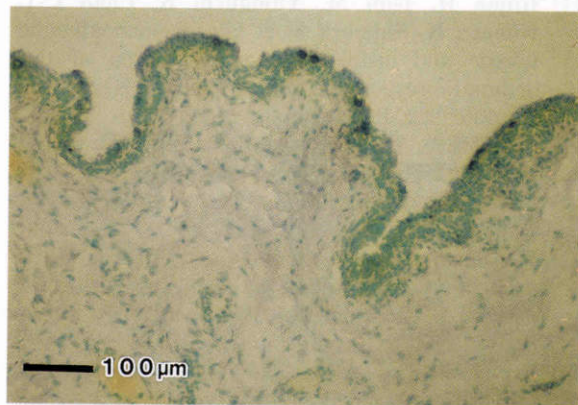


図9 瞼結膜のVCAM-1(酵素抗体法).
点眼後30分(上段)では結膜下組織の血管はVCAM-1陰性であるが、24時間(下段)ではVCAM-1陽性である(矢印).

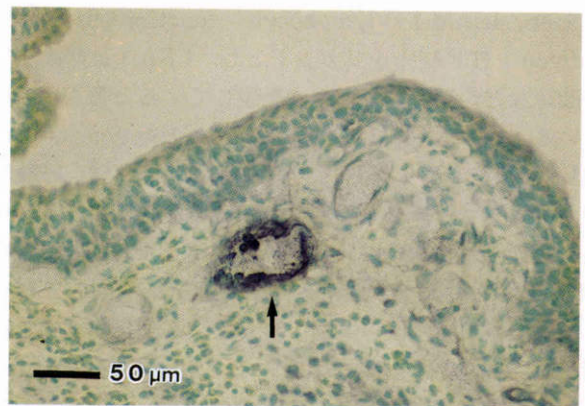


図11 点眼後24時間の瞼結膜(連続切片・酵素抗体法).
ICAM-1(上段)およびVCAM-1(下段)は結膜上皮下の同一の血管に発現されている(矢印).

1 (ICAM-1) および vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) について検討を行った。ICAM-1 および VCAM-1 は血管内皮細胞に発現される接着分子として知られている¹⁵⁾。ヒト臍帯静脈血管内皮細胞の培養による検討では、無刺激の状態では軽度の ICAM-1 が発現されているのみであるが、interleukin-1 (IL-1) や tumor necrotic factor- α (TNF- α) などのサイトカインで 24 時間刺激すると、ICAM-1 の発現増加に伴って VCAM-1 も発現されるようになると報告¹⁶⁾¹⁷⁾されている。また、肥満細胞およびマクロファージが放出するメディエーターのうち、ヒスタミン、platelet-activating factor (PAF)、IL-1、TNF- α は血管内皮細胞の接着分子の発現を高め、leukotriene B₄ (LTB₄)、PAF は炎症細胞の接着分子の発現を高めると報告¹⁸⁾されている。今回の実験では、結膜および涙腺の血管を中心に OA 点眼 30 分では ICAM-1 および VCAM-1 とともに観察されないが、OA 点眼 6~12 時間後から ICAM-1 が、OA 点眼 24 時間から VCAM-1 が免疫組織化学的に観察された。これらの所見は、結膜や涙腺にアレルギー反応が生じることによって局所の肥満細胞やマクロファージからサイトカインが産生され、血管内皮細胞に ICAM-1 や VCAM-1 の発現が増強したため、免疫組織化学的に観察されるようになったと推察される。しかし、実際、結膜組織において、どの細胞がどのようなサイトカインを産生しているかという点については今回検討していないため不明であった。

また、ICAM-1 は lymphocyte function-associated antigen-1 (LFA-1) をリガンドとし、LFA-1 は好中球や好酸球などの顆粒球系細胞に発現していると報告¹⁵⁾されている。また、VCAM-1 は very late activation antigen-4 (VLA-4) をリガンドとし、VLA-4 はリンパ球、好酸球やマクロファージに発現されていると報告¹⁵⁾され、これらの炎症細胞は、ICAM-1/LFA-1 経路または VCAM-1/VLA-4 経路によって血管から炎症組織に浸潤していくと考えられる。今回の実験で得られた浸潤炎症細胞と接着分子との関係を検討してみると、血管内皮細胞に ICAM-1 の発現が増強することによって、好中球および好酸球の結膜および涙腺への浸潤が増加し、VCAM-1 の発現によって好酸球およびリンパ球の浸潤が増加したものと考えられる。すなわち、アレルギー性炎症が生じた組織の血管では、経時的に発現される接着分子が変化し、それに伴って浸潤細胞も変化したと考えられるが、はじめは好中球を含んだ非特異的な炎症反応であったものが、時間の経過とともにアレルギー反応に特異的な好酸球とリンパ球の浸潤に変化していったものと考えられる。このような局所の変化に伴って、発現される臨床病態も変わって行くものと推察される。そこで今後は、個々の細胞がどの経路を主に使用して局所に浸潤していくのかを明確にしていくことが、アレルギーの病態を解明し、

治療へと展開していくのに重要であると考えられる。

文 献

- 1) Ishizaka K, Ishizaka T: The significance of immunoglobulin E in reaginic hypersensitivity. *Ann Allergy* 28: 189-194, 1970.
- 2) Hargreave FE, Dolovich J, Robertson DG, Kerigan AT: The late asthmatic responses. *Canad Med Assoc J* 110: 415, 1974.
- 3) 牧野荘平: アレルギーの病態生理. 診断と治療 81: 1140-1146, 1993.
- 4) Ricci M, Rossi O: Dysregulation of IgE responses and airway allergic inflammation in atopic individuals. *Clin Exp Allergy* 20: 601-609, 1990.
- 5) Wegener CD, Gundel RH, Reilly P, Haynes N, Letts LG, Rothlein R: Intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) in the pathogenesis of asthma. *Science* 247: 456-459, 1990.
- 6) 荏原順一, 中島重徳: 好酸球の炎症反応部位への集積と接着分子との関連. *臨床免疫* 25: 471-477, 1993.
- 7) 辻 勉: 細胞接着の分子機構. *免疫薬理* 10: 373-380, 1992.
- 8) Allansmith MR, Baird RS, Greiner JV, Bloch KJ: Late-phase reaction in ocular anaphylaxis in the rat. *J Allergy Clin Immunol* 73: 49-55, 1984.
- 9) 雑賀寿和, 良田夕里子, 清水由規: アレルギー性結膜炎における Late Phase Reaction について. *臨眼* 44: 298-299, 1990.
- 10) 湯川龍雄, 寺師義典, 福田 健, 牧野荘平: 抗原の侵入経路とアレルギーの発症. *臨床免疫* 22: 720-730, 1990.
- 11) Iijima H, Ishii M, Yamauchi K, Chao C-L, Kimura K, Shimura S, et al: Bronchoalveolar lavage and histologic characterization of late asthmatic response in guinea pigs. *Am Rev Respir Dis* 136: 922, 1987.
- 12) 阿久津郁夫, 福田 健, 中島宏和, 沼尾利郎, 天下井正弘, 牧野荘平: モルモット気管支喘息モデルの好酸球浸潤に対するサイクロスポリン A の効果. *アレルギー* 38: 934, 1989.
- 13) Wardlaw AJ: Eosinophils and mast cells in bronchoalveolar lavage in subjects with mild asthma: Relationship to bronchial hyper-reactivity. *Am Rev Respir Dis* 137: 62-69, 1988.
- 14) Frew AJ, Kay AB: The relationship between infiltrating CD4+ lymphocytes, activated eosinophils, and the magnitude of the allergen-induced late phase cutaneous reaction in man. *J Immunol* 141: 4158-4164, 1988.
- 15) Springer TA: Adhesion receptors of the immune system. *Nature* 346: 425-434, 1990.
- 16) Carlos TM, Schwartz BR, Kovach NL, Rosso M, Osborn L, Chi-Rosso G, et al: Vascular cell adhesion molecule-1 mediates lymphocyte adherence to cytokine-activated cultured human endothelial cell. *Blood*, 76: 965-970, 1990.
- 17) 竹内 勤: VCAM-1 の構造, 機能とその発現調節. *血管と内皮* 4: 136-143, 1994.
- 18) Schleimer RP, Benenati SV, Friedman B, Bochner BS: Do cytokines play a role in leukocyte recruitment and activation in the lungs? *Am Rev Respir Dis* 143: 1169-1174, 1991.