

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月31日現在

機関番号：16401

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22791666

研究課題名（和文）自然免疫の制御による角膜感染に伴う炎症の抑制

研究課題名（英文）Suppression of inflammation with the cornea infection by the control of the natural immunity

研究代表者

角環（SUMI TAMAKI）

高知大学・教育研究部医療学系・助教

研究者番号：70385243

研究成果の概要（和文）：C57BL/6 マウスに LPS にて角膜炎を発症させた。角膜内に浸潤した好中球とマクロファージの出現時期は異なっていた。種々の液性因子の発現時期も異なっていた。マウス緑膿菌角膜炎モデルを作成した。緑膿菌の臨床分離株  $5 \times 10^6$  CFU 濃度により強い角膜炎を安定して誘導することができた。C57BL/6 マウスに比し、BALB/c マウスでは、角膜炎の臨床症状が軽度であった。

研究成果の概要（英文）：Keratitis was induced by the application of LPS in C57BL/6 mice. Time-points of infiltration into cornea differed between macrophages and neutrophils. Similarly, humoral factors such as cytokines and chemokines were detected at different time-point. I made a mouse model of *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) keratitis. Severe keratitis was induced by  $5 \times 10^6$  of CFU *P. aeruginosa*. (clinical separation). The average clinical score of keratitis was lower in the BALB/c than C57BL/6 mice.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2011年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,600,000	780,000	3,380,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・眼科学

キーワード：角膜感染症、緑膿菌、角膜炎、サイトカイン、好中球

## 1. 研究開始当初の背景

近年、角膜感染症の若年化が問題となっている。若年層における角膜感染症ではコンタクトレンズ使用中の感染が9割以上を占めており、細菌性角膜感染症の原因菌では緑膿菌によるものが大半である。緑膿菌感染では眼脂、充血、視力低下などの症状発現から悪化までの経過が非常に早く、時に角膜実質融解が強く起こると角膜穿孔を来とし、数日で失

明に至る場合もある重篤かつ急性の疾患である。

## 2. 研究の目的

角膜感染症では、感染による組織障害に加えて、病原体に対する免疫応答が誘導される結果、病変部に炎症細胞が浸潤する。この時角膜実質細胞は活性化し、病原体排除に働いていると考えられているが、遷延すると角膜

実質融解が生じ、角膜潰瘍を生じる。

今回の研究では角膜感染発症時の角膜組織障害における免疫応答の果たす分子メカニズムを解析し、最終的には自然免疫の制御による角膜感染に伴う炎症の抑制を試みることを目的とした。

### 3. 研究の方法

(1) C57BL/6 マウスに 26G 針にて角膜上皮に擦過傷を作ったのちに緑膿菌由来の LPS  $1\mu\text{g}$  を点眼した。LPS 点眼後 6 時間および 24 時間後にマウスを安楽死させ、角膜を摘出した。摘出した角膜は OCT コンパウンドに包埋し、凍結切片を作成した。好中球およびマクロファージに対する抗体を用いて免疫染色し、角膜へ浸潤した炎症細胞数を定量化した。

(2) 摘出した角膜をホモジナイズして、角膜に含まれる 23 種類のサイトカイン、8 種類のケモカインを網羅的に multiplex bead array 法を用いて検討した。

(3) 緑膿菌の臨床分離株を用いて、マウス緑膿菌角膜炎モデルを作成した。C57BL/6 マウスおよび BALB/c マウスに 26G 針にて角膜上皮に擦過傷を作ったのちに、種々の濃度の緑膿菌を点眼し、経時的に臨床所見を観察した。

(4) C57BL/6 および BALB/c マウスに、26G 針にて 3本の直線の角膜上皮欠損を作製し、緑膿菌の臨床分離株 ( $5 \times 10^6 \text{CFU}/5\mu\text{l}$ ) を点眼して感染させ、その後経時的に角膜の臨床所見を観察した。感染後 5 日目にマウスを安楽死させ、眼球を摘出し、角膜内の生細菌数や切片、あるいは RNA を抽出した。

(5) C57BL/6 および BALB/c 背景の IL-17A 遺伝子欠損 (KO) マウスを用いて、緑膿菌の臨床分離株を点眼して感染させ、その後経時的に角膜の臨床所見を観察した。感染後 5 日目にマウスを安楽死させ、眼球を摘出し、角膜内の生細菌数、好中球数を計数した。

### 4. 研究成果

(1) C57BL/6 マウスに LPS にて角膜炎を発症させた結果、好中球は 6 時間から角膜内へ浸潤して、24 時間後もほぼ同数であった。マクロファージは、6 時間で浸潤が有意に増加したが、24 時間後にさらに増加していた。

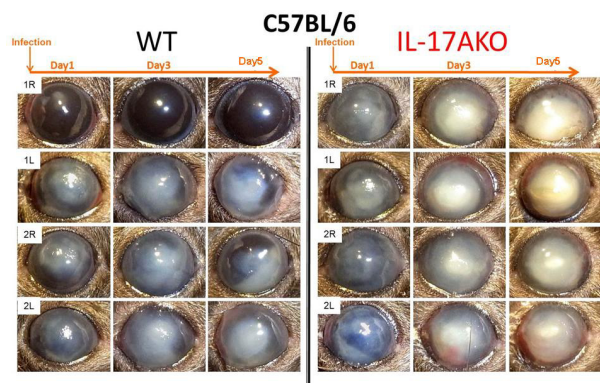
(2) LPS 角膜炎において、炎症性サイトカイン (IL-1 $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 、IL-6)、Th1 サイトカイン (IL-12、IL-15、IL-18)、ケモカイン (KC、MCP-1、MIP-1 $\beta$ 、RANTES、MIP-2、MIG)、成長因子 (G-CSF、M-CSF、PDGF-BB、VEGF) の発現が上昇した。これらのうち、IL-6、IL-12、IL-18、MCP-1、M-CSF、PDGF-BB は LPS 点眼後 6 時間のみで上昇し、これら以外は 6 時間後と 24 時間後共に上昇が認められた。また Th2 サイトカインである IL-13 の発現のみ 24 時間後に減少した。

(3) 緑膿菌の臨床分離株を用いた、マウス緑膿菌角膜炎モデルを作成の結果、 $5 \times 10^6 \text{CFU}$  の濃度の緑膿菌により強い角膜炎が安定して誘導されることが分かった。C57BL/6 マウスにおいては、感染 1 日後は輪状膿瘍の所見を呈し、3 日後は角膜全体が白濁し、5 日後は角膜が穿孔するマウスが多く見られた。一方、BALB/c マウスにおいては、同濃度の緑膿菌を感染させても C57BL/6 に比し、角膜炎の臨床症状が軽度であり、マウスの系統により臨床所見に差が認められた。

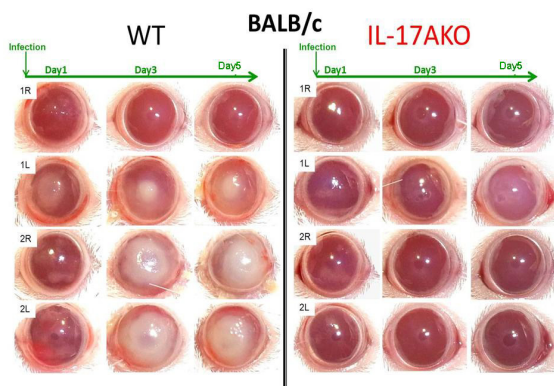
(4) 臨床所見は C57BL/6 マウスにおいて、経時的に増悪していき、感染 5 日後にはほとんどのマウスで角膜が穿孔していた。組織学的検討およびミエロペルオキシダーゼ活性の測定により、角膜病巣部には多数の好中球が浸潤していた。一方、BALB/c マウスにおいては、C57BL/6 マウスに比して角膜混濁などの臨床所見は軽度であり、感染 5 日後の角膜内生細菌数および浸潤した好中球数も C57BL/6 に比して低かった。ただ、個体により感染・臨床症状の程度に大きなばらつきが認められ、これにより実験群間の統計学的有意差が出なかった。

(5) C57BL/6 背景の IL-17A KO マウスにおいては、野生型マウスに比して臨床所見が重篤で、感染 5 日後の角膜内の生細菌数および好中球数が多い傾向が認められた。反対に BALB/c 背景の IL-17A KO マウスにおいては、野生型マウスに比して臨床スコア、角膜内の生細菌数および好中球数共に低い傾向にあった。

### Clinical findings



## Clinical findings



### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 11 件)

- ① Ishida W, Fukuda K, Kajisako M, Sumi T, Matsuda H, Yagita H, Fukushima A. B and T lymphocyte attenuator regulates the development of antigen induced experimental conjunctivitis. Graefe's Arch Clin Exp Ophthalmol, 査読有, Vol. 250, 2012, 289-295
- ② 角 環, 山田美絵, 高橋祐次, 今井俊祐, 葛西洋芳, 石田 わか, 福島敦樹. アレルギー薬によるマスト細胞からのメディエーター遊離抑制効果の比較. あたらしい眼科, 査読有, 29 巻, 2012, 103-108
- ③ Yoneda T, Sumi T, Takahashi A, Hoshikawa Y, Kobayashi M, Fukushima A. Automated hyperemia analysis software reliability and reproducibility in healthy subjects. Jpn J Ophthalmol, 査読有, Vol. 56, No. 1, 2012, 1-7
- ④ Ishida W, Fukuda K, Sumi T, Ebihara N, Kajisako M, Matsuda H, Yagita H, Fukushima A. Adjuvants determine the contribution of basophils to antigen sensitization in vivo. Immunol Lett, 査読有, Vol. 136, 2011, 49-54
- ⑤ Fukushima A, Ishida W, Ojima A, Kajisako M, Sumi T, Yamada J, Tsuru E, Miyazaki J-i, Tominaga A, Yagita H. Participation of CD11b and F4/80 molecules in the conjunctival eosinophilia of experimental allergic conjunctivitis. Int Arch Allergy Immunol, 査読有, Vol. 151, 2010, 129-136.
- ⑥ Sumi T, Ishida W, Ebihara N, Fukushima A. T cell-related co-stimulatory molecules in the conjunctiva of

patients with severe allergic conjunctivitis. Cornea, 査読有, Vol. 29, 2010, 622-627

- ⑦ Miyazaki D, Ishida W, Tominaga T, Sumi T, Fukushima A. Aggravation of conjunctival early-phase reaction by staphylococcus aureus enterotoxin B via augmentation of IgE production. Jpn J Ophthalmol, 査読有, Vol. 54, No. 5, 2010, 476-480
- ⑧ Takahashi A, Sumi T, Tada K, Mibu, Shii D, Kayasuga A, Fukushima A. Evaluation of histamine-induced conjunctival edema in guinea-pigs using image analysis. Br J Ophthalmol, 査読有, Vol. 94, No. 12, 2010, 1657-1661
- ⑨ Ishida W, Kajisako M, Takahashi A, Sumi T, van Rooijen N, Fukuda K, Fukushima A. Conjunctival macrophages act as antigen-presenting cells in the conjunctiva during the development of experimental allergic conjunctivitis. Mol Vision, 査読有, Vol. 16, 2010, 1280-1285
- ⑩ 中平 麻美, 角 環, 多田 憲太郎, 佐々木 香る, 井口みつこ, 弘井 誠, 刑部安弘, 福島 敦樹. 眼瞼と眼球結膜に局限したアミロイドーシスの1例. 臨床眼科, 64 巻, 8 号, 査読有, 2010, 1331-1335
- ⑪ 角 環. アレルギー性結膜疾患発症に關与する細胞と分子. 日本眼炎症学会誌 12 巻, 査読有, 16-19, 2010

[学会発表] (計 12 件)

- ① 角 環, 福田憲, 笠井真央, 樽谷勝仁, 永野弓枝, 佐野栄紀, 福島敦樹. Sporothrix schenckii による眼瞼炎と強膜膿瘍を認めた一例. 角膜カンファランス, 2012年2月24日, 東京.
- ② 米田剛, 角 環, 小松あゆみ, 高橋亜矢子, 福田憲, 福島敦樹. アンケート調査による結膜充血の認識について. 第 36 回日本角膜学会総会, 2012年2月24日, 東京
- ③ 福島敦樹, 石田わか, 角 環, 福田憲, 椎大介, 今井順也. 結膜アレルギーにおけるヒスタミンの関与: 他覚所見の評価系, ならびにヒスタミンH<sub>1</sub>受容体発現の評価系の確率. 第 15 回日本ヒスタミン学会, 2011年10月21日, 岩手
- ④ 角 環, 画像診断解析による眼球結膜充血の客観的評価, 第 65 回日本臨床眼科学会, 2011年10月7日, 東京
- ⑤ 三浦悠作, 角 環, 宮崎千歌, 福島敦樹. 涙嚢炎を合併した眼類天疱瘡の一例. 第 65 回日本臨床眼科学会, 2011年10

- 月 7 日、東京
- ⑥ 角 環、米田 剛、高橋亜矢子、星川靖裕、小林正彦、福島敦樹. 解析ソフトを用いた眼球結膜充血の定量化. 第23回日本アレルギー学会春季臨床大会、2011年5月14日、千葉.
  - ⑦ 角 環、山田美絵、高橋佑次、今井俊佑、葛西洋芳、福島敦樹. 各種抗アレルギー薬によるメディエーター遊離抑制作用の検討. 第35回日本角膜学会総会、2011年2月18日、東京
  - ⑧ Tamaki Sumi, Tsuyoshi Yoneda, Ayako Takahashi, Kentaro Tada, Yasuhiro Hoshikawa, Masahiko Kobayashi, Ken Fukuda, Atsuki Fukushima. Image analyses of conjunctival hyperemia in humans. The 2<sup>nd</sup> Asia Cornea Society Biennial Scientific Meeting, December 2, 2010, Kyoto
  - ⑨ 石田わか、高橋亜矢子、角 環、福田憲、福島敦樹. マウスアレルギー性結膜炎モデルにおける抗原提示細胞の解析. 第60回日本アレルギー学会秋季学術大会、2010年11月25日、東京
  - ⑩ 深川和己、藤島浩、福島敦樹、角 環、他. アレルギー性結膜疾患の疾患特異的QOL 調査票の確率. 第64回日本臨床眼科学会、2010年11月11日、神戸
  - ⑪ 福田憲、石田わか、角 環、海老原伸之、八木田秀雄、福島敦樹. 実験的アレルギー性結膜炎発症における  $Fc\epsilon RI\alpha$  陽性細胞の果たす役割. 第44回日本眼炎症学会. 2010年7月9日、東京.
  - ⑫ 高橋亜矢子、角 環、多田憲太郎、星川靖裕、小林正彦、福島敦樹. 眼球結膜充血を定量的に評価するソフト. 第114回日本眼科学会総会、2010年4月15日、名古屋

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

角 環 (SUMI TAMAKI)

高知大学・教育研究部医療学系・助教

研究者番号：70385243