

スギ花粉によるアレルギー性結膜炎の実験的・組織学的研究

獨協医科大学眼科学教室

石崎道治

抗スギ花粉血清を用いてモルモットを受身感作し、スギ花粉を結膜に噴霧して結膜局所の変化を観察した。

感作モルモット群では花粉噴霧20分以内に結膜の充血と浮腫を認めた。経時的組織学的検討の結果、好酸球の浸潤は花粉噴霧6時間後に peak となり、好中球は花粉噴霧6-8時間後に peak となった。肥満細胞数は花粉噴霧2時間後最低、12時間後最高となった。花粉噴霧8時間後に好酸球・好中球の浸潤を伴った結膜上皮の欠損を認めた。抗アレルギー剤の DSCG, ketotifen 点眼により花粉噴霧6時間後の細胞浸潤は有意に抑制された。

感作モルモットの結膜に即時型アレルギー反応を起こさせ、好酸球・好中球・肥満細胞数の経時変化を確認し、本実験モデルがアレルギー性結膜炎の研究に有用であることが判明した。

Key words: allergic conjunctivitis — experimental model — histological study — Japanese cedar pollen — passively sensitization

緒言

方法

スギ花粉症は1964年に堀口・斉藤により初めて報告¹⁾され、日本の代表的な季節性アレルギーとして注目されてきた。以後、花粉飛散量の調査、抗原分析、疫学調査、臨床研究などについて多くの報告²⁾⁻⁶⁾がなされてきた。しかし、動物実験に関する報告は少なく^{7,8)}、スギ花粉症の動物モデルでアレルギー性結膜炎を検討した報告はない。もし、スギアレルギー性結膜炎の動物モデルが作製できれば、その診断、病理学的解明、抗アレルギー剤の効果判定などに極めて有益である。

今回、抗スギ花粉血清を用いてモルモットを受身感作し、スギ花粉噴霧にて肉眼的にヒト類似のアレルギー性結膜炎を起こすことができた。その結膜局所の経時変化を組織的に検討し、アレルギー反応であることを確かめた。また、抗アレルギー剤点眼による効果も組織学的に検討した。

1. スギ花粉精製抗原の作製

安枝ら⁹⁾の方法に準じて、スギ花粉アレルゲンの精製を行った。

a) 脱脂スギ花粉

スギ花粉(1980年の飛散期に日光地方で採取したもの)を2倍量のエーテルで5回以上処理して脱脂した。自然乾燥後使用時まで-20℃に保存した。

b) 精製抗原

脱脂スギ花粉100gに0.125M NH_4HCO_3 2lを加え、室温で攪拌しながら24時間抽出した。遠心(10000×g 30分)により上清と沈渣に分け、全上清を Seamless Cellulose Tubing 36/32 (Visking Company 社製)に入れ、4℃下で約2週間、1/3量まで濃縮した。濃縮液に固体硫酸を80%飽和になるように加え、4℃下で4時間以上攪拌後、遠心(10000×g 30分)により80%硫酸沈殿物を得た。沈殿物を200mlの0.01M Tris-phosphate buffer pH 7.8に溶解し、Seamless Cellulose Tubing 36/32に入れ、同 buffer で透析した。同 buffer で平衡化した DEAE-cellulose column (Pharmacia 社製 Column K 26/40) に透析した試料を流し、カラムに吸着されない蛋白成分を集めた。この溶液を Seamless Cellulose Tubing 36/32に入れ、0.01M citrate-phosphate buffer pH 4.5で透析した。次いで、同 buffer で平衡化した CM-cellulose column (Phar-

Received: September 3, 1986

Accepted: October 14, 1986

Abbreviations: DSCG disodium cromoglycate; IAR immediate asthmatic response; LAR late asthmatic response; MBP major basic protein; PCA passive cutaneous anaphylaxis

macia 社製 Column K 16/40) に滴下し、未吸着成分を同 buffer で洗い流した。吸着された蛋白成分を 0.01 M citrate-phosphate buffer pH 8.0+1.5M NaCl で溶出した。溶出後は凍結乾燥し、Lowry-Folin 法により蛋白を定量し、精製抗原として凍結保存した。

2. 抗スギ花粉血清の作製

湯川ら⁸⁾の方法に準じて、Hartley 系雄モルモット (埼玉実験動物) を用いて抗スギ花粉血清を作製した。

1 で得られたスギ精製抗原 $1\mu\text{g}$ を $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$ と NaOH を用いて、10mg/ml に調整した水酸化アルミニウムゲル 5mg とともに、体重約 300g のモルモット 40 匹の腹腔内に注射した。4 週間隔で最低 3 回感作 1 週後に耳朶より採血し、Ovary の方法⁹⁾に準じて、抗血清希釈系列を体重約 250g の雄モルモット背部に各 0.1ml 皮内に注射した。48 時間後にスギ精製抗原 $10\mu\text{g}$ と 0.5% Evans Blue 液 1ml を静注し、PCA (passive cutaneous anaphylaxis) 反応を施行した。PCA 反応の判定は、20 分後に直径 8mm 以上青色化したものを陽性とし、PCA titer 160 倍以上のモルモット 18 匹より全採血し、血清分離した。各モルモットより得た抗血清を混合し均一化して -80°C に保存した。混合抗血清の PCA titer は、48 時間 PCA titer 640 倍以上・7 日間 PCA titer 160 倍以上、 56°C 4 時間熱処理抗血清 4 時間 PCA titer 160 倍以上・同 7 日間 PCA titer 40 倍以下であった。

3. 受身感作・結膜反応

2 で得られた均一抗スギ血清 1ml を体重約 300g の

Hartley 系雄モルモットに静注し、受身感作した。感作 48 時間後、1 で得られた脱脂スギ花粉をミクロスパーテル ((株) 井内盛栄堂製 6-440-03) で約 5mg とり、モルモットの眼に噴霧して反応を観察した (40 匹 80 眼)。また、未感作モルモット (10 匹 20 眼) にも花粉を噴霧して反応を肉眼的に観察した (Fig. 1)。

4. 経時的組織学的検討

3 で変化のあった 78 眼を花粉噴霧後 30 分、1 時間、2 時間、4 時間、6 時間、8 時間、12 時間、16 時間、24 時間、48 時間、72 時間、1 週間のグループに分け、花粉噴霧前、噴霧後 5 分のグループを加え、結膜の形態的变化、結膜中の好酸球・好中球・肥満細胞数の経時的变化を組織学的に観察した。6 時間・12 時間・72 時間群はそれぞれ 8 眼・12 眼・4 眼、他は 6 眼ずつ計 90 眼について経時的組織学的検討を行った。各時間に合わせエーテル麻酔後、眼瞼・眼窩内容を取り出し、ホルマリン固定後、パラフィンで包埋した。眼球の最大断面で $2\mu\text{m}$ の薄切片を 2 枚作り、hematoxylin-Hansel の重染色で結膜の形態的变化と好酸球・好中球数を、他は Hansel 染色で肥満細胞数を光学顕微鏡 ($\times 400$) で観察した (Fig. 2)。体重約 300g と 350g Hartley 系雄モルモットの眼球最大断面での結膜上皮下の長さはそれぞれ $13.195 \pm 0.040\text{mm}$ 、 $13.188 \pm 0.034\text{mm}$ であった ($n=$ 各 6 眼)。未感作モルモットと花粉噴霧前感作モルモットの結膜の組織学的所見に差を認めなかった。花粉噴霧 1 週間後のモルモットの体重は約 350g であった。このように最大断面での全結膜の面積

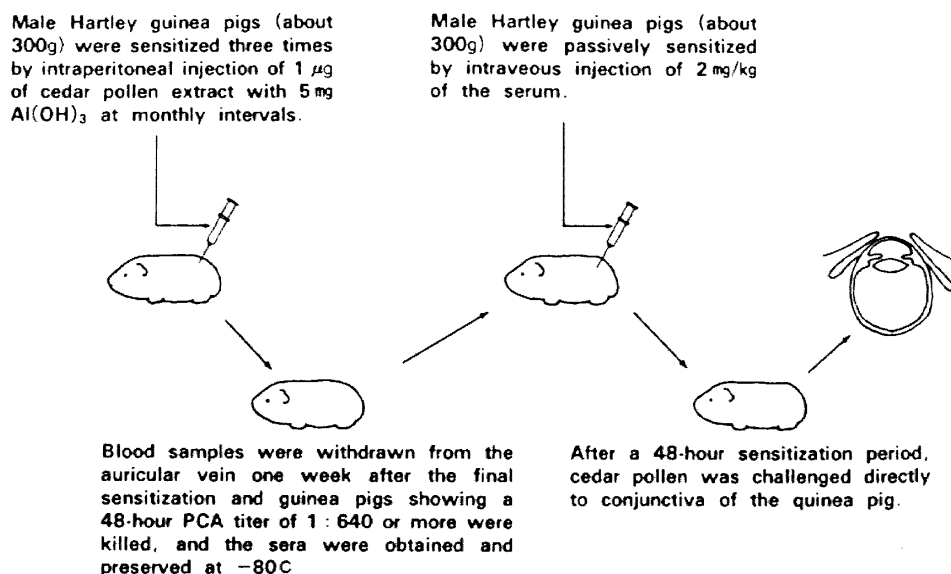


Fig. 1. Schematic illustration of the experimental design to study the influence of allergen-induced anaphylaxis on histological findings of the conjunctiva.

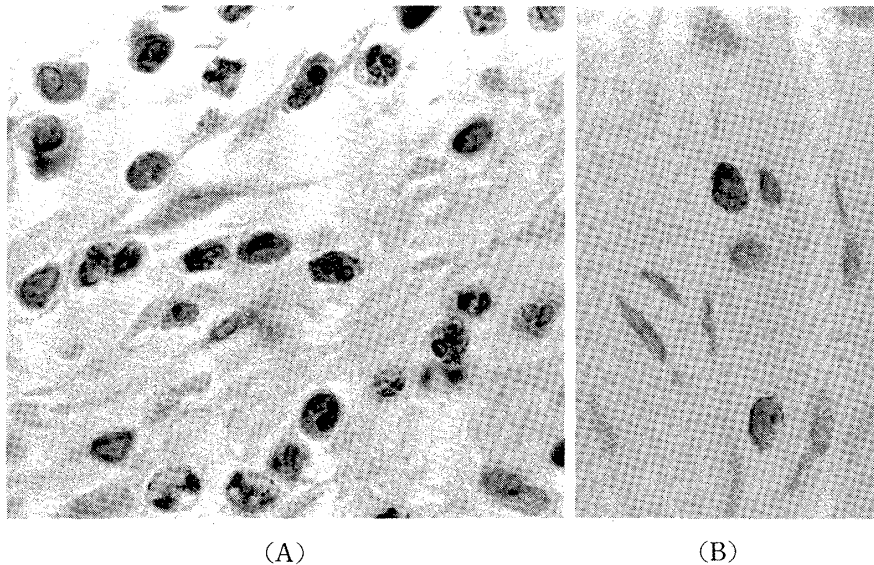


Fig. 2. (A): Infiltration of eosinophils and neutrophils in the guinea pig conjunctiva was observed by hematoxylin-Hasel stain. Fig. shown at 6 hours after antigen challenge ($\times 400$).

(B): Mast cells were observed by Hansel stain. Fig. shown before the challenge ($\times 400$).

は一定であるとみなし得たので、細胞の測定範囲は結膜上皮、血管内、リンパ節内を除いた全結膜内とした。

5. 抗アレルギー薬の点眼

体重約300gのHartley系雄モルモットにDSCG (disodium cromoglycate), ketotifen, dexamethasone sodium sulfate, hydrocortisone sodium succinateを点眼し、花粉噴霧6時間後の結膜内好酸球・好中球数を測定し、各薬剤の効果を判定した。2で作成した均一抗血清を用い、花粉噴霧48時間前に受身感作した。各薬剤を右眼に点眼し、左眼(fellow eye)は対照として、両眼に花粉を噴霧した($n=$ 各6匹)。

DSCG (100mg/ml), ketotifen (1mg/ml) 溶液を花粉噴霧1週間前より1日4回 $20\mu\text{l}$ を点眼し、花粉噴霧30分前にも点眼した。dexamethasone (5mg/ml), hydrocortisone (125mg/ml) 溶液は、花粉噴霧2日前より1日4回 $20\mu\text{l}$ を点眼し、花粉噴霧30分前にも点眼した。

有意差の検定は絶えず student t test を用いて行った。

結 果

1. 結膜反応

受身感作モルモット群では、花粉噴霧後20分以内に

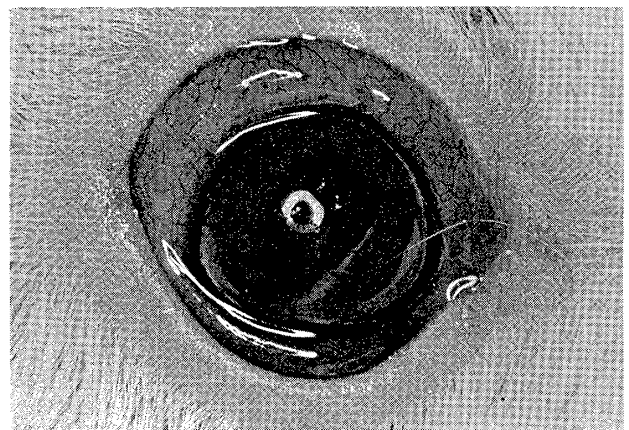


Fig. 3. Immediate response in guinea pig conjunctiva 20 minutes after challenge with cedar pollen. Severe hyperemia and edema of the conjunctiva were observed.

著明な結膜充血と浮腫を認めた(Fig. 3)。結膜の充血と浮腫は、花粉噴霧後1時間半から3時間以内に消失し、以後肉眼的には特に変化を認めなかった。受身感作し、花粉噴霧20分後の反応を観察したモルモット40匹80眼中、39匹78眼はFig. 3に示すような結膜浮腫・充血を認めた。残りの1匹2眼の結膜浮腫・充血は軽度であった。この2眼は経時的組織学的観察より除いた。

未感作モルモット群では、花粉噴霧後軽度の結膜充血を認めたが、20分以内に消失し、以後変化を認めな

Table 1 Immediate response 20 min after challenge

Guinea-pig	Eyes	Chemosis		
		(-)	(±)	(+)
Non sensitization	20	20	0	0
Sensitization	80	0	2	78

The conjunctival condition were rated as (-)-(+) in terms of the degree of conjunctival edema. 78 eyes exhibited the same response as Fig. 3 shown.

かった (Table 1).

2. 経時的組織学的検討

経時的組織学的検討のため受身感作したモルモットは、花粉噴霧前・噴霧後5分のグループを除き、すべて花粉噴霧20分後に Fig. 3 に示すような結膜浮腫・充血を認めた78眼を用いた。

花粉噴霧後の結膜局所における好酸球・好中球・肥満細胞数の変化を Fig. 4 に示した。

好酸球は花粉噴霧前平均19個で、噴霧後よりわずかな浸潤を認めたが、6時間後急に多数(平均321個)出現し、1週間後もかなりの数(平均149個)を認めた。

好中球は花粉噴霧前平均9個であった。噴霧後より徐々に増加し、6時間(平均432個)から8時間(平均254個)で peak となり、48時間でもとの level にもどっ

た。

肥満細胞は、花粉噴霧前平均13.2個であった。噴霧後2時間で最低(平均6.2個)、12時間で最高(24.7個)となり、48時間後(平均17.2個)も増加を認めた。

花粉噴霧後の結膜浮腫・充血を除き、肉眼的には何の変化も認めなかったが、顕微鏡では花粉噴霧後6時間から12時間群で Fig. 5 に示すような好酸球・好中球の細胞浸潤を伴った結膜上皮の欠損を認めた。このような欠損の出現率を Fig. 6 に示した。結膜上皮欠損の範囲により(+), (++)とし、欠損が広範囲で反応の強いものを(+++)とした。結膜上皮欠損の出現率は花粉噴霧後8時間に peak があり、6眼中5眼に認めた。

3. 抗アレルギー薬の点眼

各薬剤とも、花粉噴霧による急性の反応を抑えることはできず、出現した結膜浮腫は対照とした左眼と差を認めなかった。各薬剤の花粉噴霧6時間後の成績を Fig. 7 に示した。

DSCG 点眼群, ketotifen 点眼群では、対照眼に比べ好酸球・好中球の出現数は少なく有意な差を認めた。

dexamethasone 点眼群は対照群に比べ出現数に差を認めなかった。

hydrocortisone 点眼群では、対照眼群に比べ好酸球の出現数に有意な差を認めたが、好中球数には差を認めなかった。

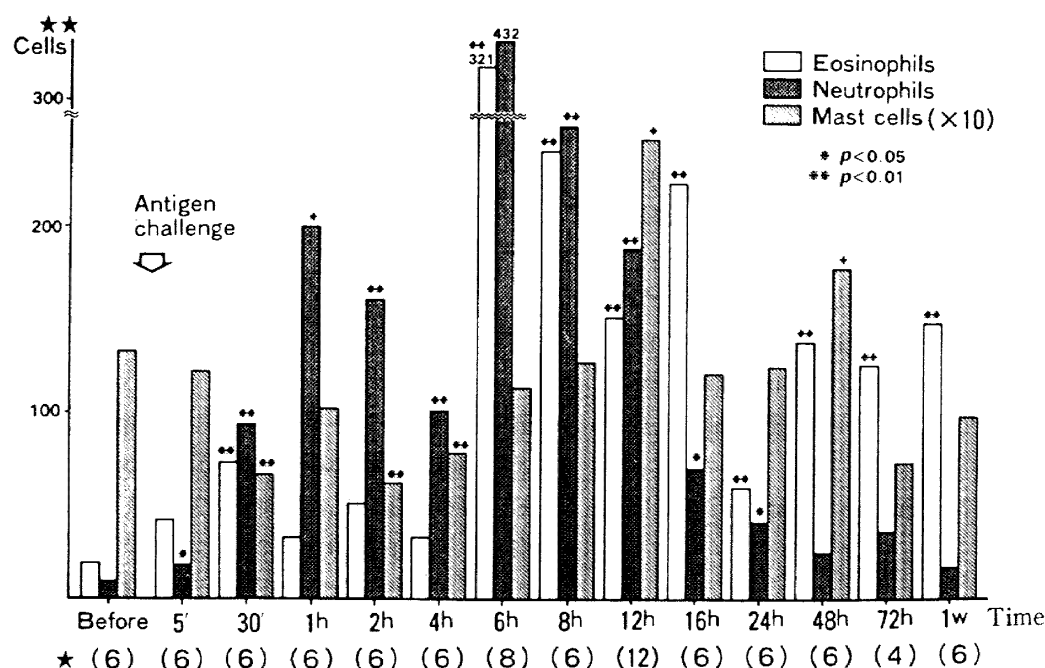


Fig. 4. The time course of the infiltration of eosinophils, neutrophils and mast cells in the conjunctiva.

★ Number of the eyes examined.

★★ Mean number of cells found on the each section of the conjunctiva.

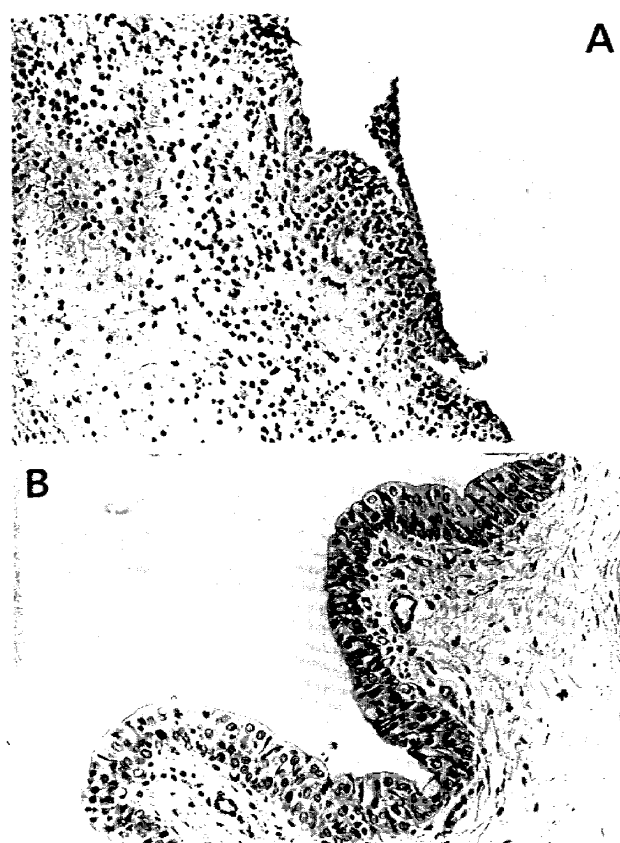


Fig. 5. (A): A defect of the conjunctival epithelium accompanied by cellular infiltration in guinea pig 8 hours after the challenge ($\times 100$).

(B): Normal appearance of guinea pig conjunctival epithelial tissue shown as a control ($\times 100$).

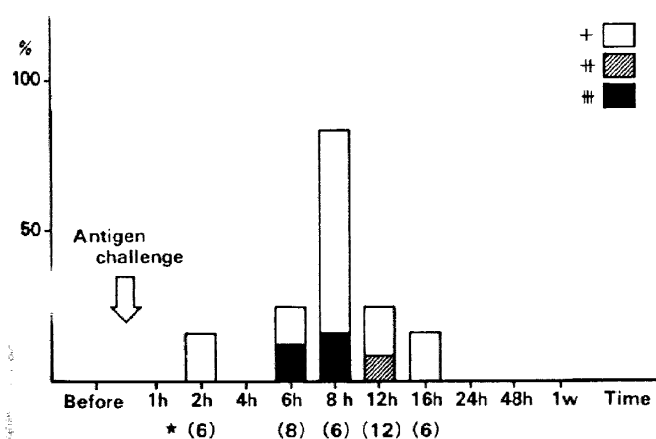


Fig. 6. Time course of the incidence of erosion in the conjunctival epithelium. The erosive condition were classified into (+) and (++) according to the extent of erosion. An extensive erosion with a strong response was rated as (+++).

★ Number of the eyes examined.

A

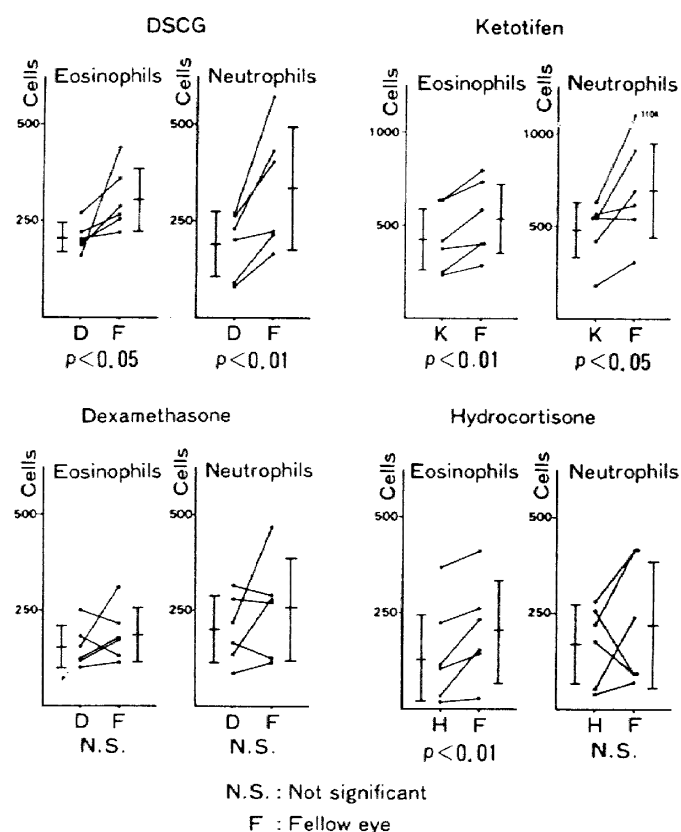


Fig. 7. Comparison of the number of the inflammatory cells 6 hours after antigen exposure between treated with antiallergic agent and non-treated groups.

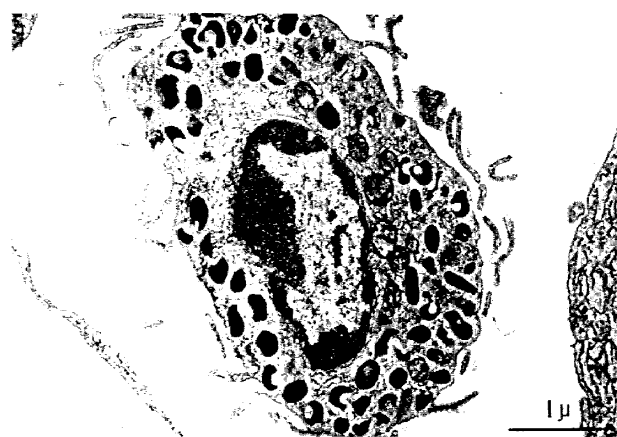


Fig. 8. A electromicrograph of mast cell in guinea pig conjunctiva at 12 hours after antigen exposure.

考案

本実験では、作成した均一スギ抗血清を用いてモルモットを感作し、最も intensive な反応を観察するため十分量の抗原を challenge した。感作モルモット群

では花粉噴霧後20分以内に1匹2眼を除き、他はすべて強い結膜充血・浮腫を認め、1時間半から3時間後に消退した。1匹2眼は軽度の結膜充血・浮腫を呈したが、モルモットの個体差によると考えられる¹⁰⁾。未感作群では花粉噴霧後軽度の充血はあるものの浮腫は認めず、充血も20分以内に消退しており、感作群における変化は特異的なものと考えられる。

経時的組織学的観察では全結膜内に出現した細胞実数を比較した。正常モルモットでは体重約300gと350gで最大割面の結膜上皮長はほぼ等しいことより、各群の本来の結膜面積はほぼ等しいと思われる。経過中、結膜浮腫・炎症により結膜割面の面積は変化するが、今回は細胞実測値で検討した。経時的組織学的観察の結果、抗原 challenge 6時間後に好酸球数、6-8時間後に好中球数は peak となり、好酸球は1週間後もかなりの数が認められ、好中球は48時間でもとの level にもどった。また、即時型反応と思われる変化以外、経過中肉眼的には変化を認めなかったが、光学顕微鏡での観察では challenge 6-12時間後に、好酸球・好中球の浸潤を伴った結膜上皮の欠損を認めた。Allan-smith ら¹¹⁾は、egg albumin でラットを能動感作し、抗原 challenge 後30分・1時間・6時間・24時間の眼の経時的組織学的検討を行い、肉眼的には変化がなかったが、抗原 challenge 6時間後に好酸球・好中球の浸潤を認め、24時間でもとの level にもどったと報告し、6時間後の浸潤は late phase response と思われると述べている。肉眼的には変化なく、抗原 challenge 6時間後に peak となる細胞浸潤が認められた点は、本実験と同様であったが、好酸球の消退時間に差があり、また結膜上皮欠損の出現については述べられていない。実験動物、感作抗原が異なっているが、この反応の差異は反応に関与した抗体による可能性がある。Allan-smith らはほとんど IgE 抗体のみ産生したラットを用いて実験を行ったのに対し、本実験で使用した抗血清は、IgE 抗体、IgG 抗体の両方が含まれており、III型アレルギーの関与¹²⁾も否定し得ないと考ええる。

肥満細胞数は抗原 challenge 2時間後最低であった。これはおそらく抗原 challenge により脱顆粒¹¹⁾¹³⁾を起こしたため染色されず、光顕×400での観察では count できなかったためと思われる。本実験では抗原 challenge 12時間後に肥満細胞の増加を認めた。光顕での形態は明らかに肥満細胞であり、電顕での観察 (Fig. 8) でも容易に多数の肥満細胞が観察された。肥満細胞は肉芽組織形成、発癌剤塗布などで局所的に増

加¹⁴⁾⁻¹⁶⁾することが証明されている。分裂能力¹⁷⁾¹⁸⁾もあらることが示されている。竹岡¹⁷⁾¹⁹⁾は発癌剤20-メチルコラントレンを塗布したマウスで、肥満細胞の増加と移動を証明した。この際、局所の結合組織には高度の浮腫が存在することに注目し、局所的に増加した肥満細胞は微細な、しかしかなり高度な循環障害が結合組織の微小環境に与えるひずみを回復して結合組織の恒常性を保つように働くのではないかと述べている。本実験でも intensive な反応により、結膜局所に循環障害が生じた可能性が高く、この増加の原因については今後検討を要する。

本実験では、challenge 6-12時間後に結膜上皮の欠損を認め、欠損部に一致して好酸球・好中球の浸潤を認めた。堀口・斉藤²⁰⁾はスギ花粉症患者の鼻粘膜で著明な好酸球の浸潤を伴う上皮細胞の剥離を観察している。竹内²¹⁾は egg albumin でモルモットを感作し、結膜局所の反応を観察し、炎症細胞浸潤と一部に粘膜上皮の剥離も認めたと述べている。Filley・Gleich ら²²⁾は、喘息死の剖検例で好酸球浸潤を伴った気管支上皮の欠損を観察し、その成因が好酸球の顆粒に含まれる major basic protein (MBP) にあることを報告している。また、好中球からは lysosomal enzyme, super oxide が遊離され組織を障害することが知られている²³⁾⁻²⁵⁾。好酸球の MBP、好中球の lysosomal enzyme, super oxide の遊離が、本実験でみられた上皮欠損の成因のひとつになっている可能性がある。

抗アレルギー薬の点眼では、DSCG 点眼群・ketotifen 点眼群で、抗原 challenge 後の結膜浮腫の程度は肉眼的に対照眼と差を認めなかったが、6時間後の細胞浸潤に有意な差を認めた。DSCG, ketotifen は抗原吸入誘発試験において、前投与により immediate asthmatic response (IAR), late asthmatic response (LAR) の両方を抑制することが報告されている²⁶⁾⁻²⁸⁾。DSCG の効果は肥満細胞の膜の安定化であるとされており²⁹⁾⁻³¹⁾、ketotifen は Ca-antagonist として抗ヒスタミン作用、SRS-A 遊離抑制作用があることが知られている³²⁾。Basran・Morley ら³³⁾³⁴⁾は LAR の発生の要因のひとつとして platelet-activating factor (PAF) をあげ、DSCG, ketotifen が PAF 誘発性反応を抑制することを示した。本実験では結膜浮腫を抑えることができなかったが、これは多量の抗原に暴露したためと思われる。また、6時間後の細胞浸潤抑制については、肥満細胞の膜の安定化のほか Morley らの示した結果も関与するものと考えられる。

ヒトでは、ステロイド剤を前処置しておくとも IAR は抑制されないが、LAR は明らかに抑制するとされている²⁶⁾³⁵⁾。本実験でも dexamethasone 点眼群、hydrocortisone 点眼群で、抗原 challenge による結膜浮腫の程度は対照眼と差を認めなかった。6 時間後の細胞浸潤においては、hydrocortisone 点眼で好酸球の浸潤に差を認めたのみであり、これはモルモットがステロイド剤に対して low responder である³⁵⁾ためと思われる。

以上より感作モルモット群では、抗原 challenge により即時型アレルギー反応が起こり、肥満細胞から種々の chemical mediator が放出され、結膜局所の浮腫・充血、細胞浸潤が起こったと推測される。このことはヒトのスギ花粉による I 型アレルギー性結膜炎と類似したものと思われる。この方法で作製した動物モデルは、今後スギアレルギー性結膜炎の診断、病理解明、抗アレルギー剤の効果判定などに有益であると考えられる。臨床的に I 型アレルギー性結膜炎後の late phase response の報告は見当たらないが、これは一部には眼科領域において late phase response の概念が広まっていないことも手伝っていると思われる。しかし、モルモットを用いた本実験では抗原 challenge 6 時間後に細胞浸潤を認め、8 時間後には結膜上皮欠損を観察しており、種の違いはあるもののヒトでも起こる可能性が示唆された。今後、この点に関して臨床における詳細な観察が必要と考えられる。

結 語

抗スギ花粉血清を用いてモルモットを受身感作し、スギ花粉を眼に噴霧して結膜局所の経時的变化を観察し、組織学的検討を行った。

- 1) 感作モルモット群では、抗原 challenge 20 分以内に結膜充血・浮腫を認めたが、未感作モルモット群では認められず、この変化は即時型アレルギー反応と思われた。即時型反応以外、経過中肉眼的には変化を認めなかった。
- 2) 結膜中の好酸球数は抗原 challenge 6 時間後、好中球数は 6-8 時間後に peak となった。
- 3) 肥満細胞数は抗原 challenge 2 時間後最低、12 時間後最高となった。肥満細胞数の変化とその意義については今後さらに検討を要する。
- 4) 抗原 challenge 6-12 時間後に細胞浸潤を伴った

結膜上皮の欠損を認め、出現率は 8 時間に peak を認めた。

- 5) 抗アレルギー薬を点眼し、抗原 challenge 6 時間後の反応を検討した。DSCG 点眼群、ketotifen 点眼群では、対照眼に比べ反応を減じ、好酸球・好中球数は共に有意に減少した。

稿を終るにあたり、御指導、御校閲を賜りました獨協医科大学眼科学関亮教授、同アレルギー内科学牧野莊平教授、同第 II 病理学飯高和成教授、同眼科学小暮文雄教授に深謝いたします。

また、感作モルモット作成の際に具体的に御指導いただきました獨協医科大学アレルギー内科学湯川龍雄博士に深謝いたします。

本研究の一部は、文部省科学研究費 No. 60771421 によるものである。なお、本論文の要旨は、第 34 回(京都, 1984)・第 35 回(前橋, 1985)アレルギー学会総会において発表した。

文 献

- 1) 堀口申作, 斉藤洋三: 栃木県日光地方におけるスギ花粉症 Japanese cedar pollinosis の発見. アレルギー 13, 16-18, 1964.
- 2) 山崎 太, 水野瑞夫, 信太隆夫, 清水章治: 花粉症起因花粉の研究(第 1 報)ースギ花粉飛散数の早期予測について. アレルギー 28, 732-737, 1979.
- 3) 安枝 浩, 油井泰雄, 清水章治, 遠藤久子, 信太隆夫: スギ花粉アレルゲンの分析. アレルギー 29, 763-772, 1980.
- 4) 石崎道治, 須田雄三, 小暮文雄: 1984 年栃木県におけるスギ花粉症の疫学調査(第 2 報). アレルギー 34, 778-778, 1985.
- 5) 石崎道治, 小暮文雄, 森沢 康: アレルギー性結膜炎患者の環境と背景調査. アレルギー 35, 342-348, 1986.
- 6) 小暮文雄: アレルギー性結膜炎. 日経メディカル 14, 122-124, 1985.
- 7) 斉藤洋三, 堀口申作, 荒田節男, 高山 哲, 長谷川誠: 花粉症の研究(その 6)ー実験花粉アレルギー. 日鼻副鼻腔誌 6, 67-68, 1967.
- 8) 湯川龍雄, 小泉一弘, 池森亨介, 牧野莊平: モルモットを用いての実験的スギ花粉症及び花粉喘息モデルの作成と homocytotropic antibody の解析. アレルギー 33, 895-902, 1984.
- 9) Ovary, Z.: Passive cutaneous anaphylaxis. In "Immunological Methods" 1st ed. (ed. by J.D. Ackroyd). Blackwell Scientific Publications, Oxford, pp.259-283, 1964.

- 10) Ovary, Z., Kaplan, B. and Kojima, S.: Characteristics of guinea pig IgE. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* 51, 416-428, 1976.
- 11) Allansmith, M.R., Baird, R.S., Greiner, J.V. and Bloch, K.J.: Late-phase reactions in ocular anaphylaxis in the rat. *J. Allergy Clin. Immunol.* 73, 49-55, 1984.
- 12) Askenase, P.S.: The role of basophils, mast cells and vasoactive amines in hypersensitivity reactions with a delayed time course. *Prog. Allergy* 23, 199-320, 1977.
- 13) Allansmith, M.R., Baird, R.S., Henriquez, A.S. and Bloch, K.J.: Sequence of mast-cell changes in ocular anaphylaxis. *Immunology* 49, 281-287, 1983.
- 14) Staemmler, M.: Untersuchung über Vorkommen und Bedeutung der histiogenen Mastzellen im menschlichen Körper unter normalen und pathologischen Verhältnissen. *Frankf. Ztschr. Pathol.* 25, 391-435, 1921.
- 15) Cramer, W. and Simpson, W.L.: Mast cell in experimental skin carcinogenesis. *Cancer Res.* 4, 601-616, 1944.
- 16) Takeoka, O., Ashihara, T. and Tada, N.: ³H-thymidine labeled mast cells in mice treated with 20-methyl-cholanthrene: Proliferation of precursor cells, their transformation into mast cells and migration of the latter. *Acta Pathol. Jpn.* 26, 693-702, 1976.
- 17) Kruger, P.G. and Lagunoff, D.: Mast cell restoration. A study of the rat peritoneal mast cell after depletion with polymyxin B. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* 65, 278-290, 1981.
- 18) 園田 隆, 北村幸彦, 原 宏: 形態的に分化した肥満細胞の著明な増殖力について. 第43回日本癌学会総会記事, pp.248-248, 1984.
- 19) 竹岡 成: 結合組織-肥満細胞の側面一. 総合臨床 33, 2733-2739, 1984.
- 20) 堀口申作, 斉藤洋三: スギ花粉症 Japanese cedar pollinosisに関する臨床的観察. 日耳鼻 68, 1224-1233, 1965.
- 21) 竹内良夫, 西村葉子, 横室公三, 木村義民, 雑賀寿和, 石崎正通, 新井孝司, 馬杉洋三: アレルギー性結膜炎の動物実験モデルの作製. アレルギー 34, 1021-1027, 1985.
- 22) Filley, W.V., Holley, K.E., Kephart, G.M. and Gleich, G.J.: Identification by immunofluorescence of eosinophil granule major basic protein in lung tissues of patients with bronchial asthma. *Lancet* 2, 11-16, 1982.
- 23) Serhan, C.N., Smolen, J.E., Korchak, H.M. and Weissmann, G.: Leukotriene B is a complete secretagogue in human neutrophils: Ca²⁺ translocation in liposomes and kinetics of neutrophil action. *Ad in PG. TX and LT Res.* 11, 53-63, 1983.
- 24) Goetzl, E.J.: Leukocyte recognition and metabolism of leukotrienes. *Fed. Proc.* 42, 3128-3131, 1983.
- 25) Sumimoto, H., Takeshige, K. and Minakami, S.: Superoxide production of human polymorphonuclear leukocytes stimulated by leukotriene B₄. *Biochem. Biophys. Acta* 803, 271-277, 1984.
- 26) Booi-Noord, H., Orie, N.G.M. and de Vries, K.: Immediate and late bronchial obstructive reactions to inhalation of house dust and protective effects of disodium cromoglycate and predonisolone. *J. Allergy Clin. Immunol.* 48, 344-354, 1971.
- 27) Pepys, J. and Hutchcroft, B.J.: Bronchial provocation tests in etiologic diagnosis and analysis of asthma. *Am. Rev. Resp. Dis.* 112, 829-859, 1975.
- 28) Craps, L.: The prophylaxis of bronchial asthma with Ketotifen. Five years of clinical investigations. *Acta Ther.* 6, 213-225, 1980.
- 29) Cox, J.S.G.: Disodium cromoglycate (FPL670) (Intal). Specific inhibitor of reaginic antibody-antigen mechanisms. *Nature* 216, 1328-1329, 1967.
- 30) Sheard, P., Killingback, P.G. and Blair, A.M.J. M.: Antigen induced release of histamine and SRS-A from human lung passively sensitized with reaginic serum. *Nature* 216, 283-284, 1967.
- 31) Allansmith, M.R. and Ross, R.N.: Ocular allergy and mast cell stabilizers. *Sur. Ophthalmol.* 30, 229-244, 1986.
- 32) Martin, U. and Baggiolini, M.: Dissociation between the anti-anaphylactic and the anti-histaminic actions of ketotifen. *Arch. Pharmacol.* 316, 186-189, 1981.
- 33) Basran, G.S., Page, C.P., Paul, W. and Morley, J. J.: Cromoglycate (DSCG) inhibits responses to platelet-activating factor (Paf-acether) in man: An alternative model of action for DSCG in asthma? *Eur. J. Pharmacol.* 86, 143-144, 1983.
- 34) Morley, J., Page, C.P., Massoni, L. and Sanjar, S.: Anti-allergic drugs in asthma. *Triangle* 24, 59-70, 1985.
- 35) 江田昭英: ステロイド薬の実験的喘息に対する作用. "気管支喘息のステロイド療法". 中外医学社, pp.1-24, 1982.

EXPERIMENTAL HISTOLOGICAL STUDY ON ALLERGIC CONJUNCTIVITIS DUE TO JAPANESE CEDAR POLLEN

Michiharu Ishizaki

Department of Ophthalmology, Dokkyo University School of Medicine

Allergic responses of on the conjunctiva on the experimental model using guinea pigs which were passively sensitized with antiserum of Japanese cedar pollen was studied.

Immediate response, i.e., hyperemia and edema in the conjunctiva of passively sensitized guinea pigs, was observed about 20 minutes after the challenge with cedar pollen. Observation of time-course changes in histological findings, showed that infiltration of eosinophils in the conjunctiva reached its peak 6 hours after the antigen challenge, and that of neutrophils at 6-8 hours. The mast cell count was lowest two hours after the challenge and highest at 12 hours. There was a defect in the conjunctival epithelium accompanied by cellular infiltration 8 hours after the challenge. Anti-allergic agents were instilled in the eyes, and responses 6 hours after the challenge were investigated. The eosinophil and neutrophil counts were significantly lower in eyes given DSCG or ketotifen than those of the controls.

The results of the present study, showed that this experimental model can be useful for allergic response on conjunctival study.
