

N-アセチルシステイン点眼によるアレルギー性結膜炎抑制効果

堀内 稔子, 山田 潤

明治国際医療大学眼科学教室

要 旨 アレルギー反応の成立には局所における2型ヘルパーT細胞(Th2)とマクロファージ(Mp)との相互作用が必須であり, Mpの細胞内還元型グルタチオン(icGSH)濃度を上昇させることでTh2応答を抑制できる. icGSH濃度を有効に上昇させるN-アセチルシステイン(NAC)点眼を用いたアレルギー性結膜炎治療効果を検討した. 季節性アレルギー性結膜炎患者30例に対し, 片眼にNAC(30mg/ml), もう片眼に2%クロモグリク酸ナトリウム(SCG)をそれぞれ1日4回, 14日点眼させた. 自覚症状(眼掻痒感・流涙・羞明・眼脂・眼痛・異物感)をアレルギー日記作製により7段階にスコア化し, 他覚所見とともに比較検討した. また, 点眼前後の結膜上皮を採取し, icGSH量変化を比較した. 結果, NAC点眼液によって有意なicGSH量増加が見られた. NAC治療眼ではSCG治療眼と同様に掻痒感, 流涙, 眼脂, 眼痛, 異物感が点眼前より有意に改善し, 掻痒感と流涙においては点眼14日後でSCG治療眼よりも有意な改善が見られた($p<0.05$). NAC点眼は抗アレルギー作用を有しており, icGSH上昇といった新たな機序を介する抗アレルギー薬の開発が期待できた.

Key words Nアセチルシステイン N-acetyl cysteine, アレルギー性結膜炎 allergic conjunctivitis, 細胞内チオールレドックス intracellular glutathione contents

Received January 20, 2015; Accepted March 4, 2015

1. はじめに

近年, アレルギー疾患の患者数は年々増加傾向を示しており, 環境の変化, 体質の変化, そしてアレルギーの増加などの外的要因が論じられている¹⁻³⁾. 日本人においても2割弱がアレルギー性結膜炎に罹患していると推定されている. アレルギー性結膜炎の治療には主に抗ヒスタミン作用やケミカルメディエーター遊離抑制作用を有する抗アレルギー点眼薬が第一選択として使用されており, また効果不十分例にはステロイドやシクロスポリンといった, 副作用を危惧せねばならない免疫抑制剤が使用されている. しかしこれらの薬剤の作用点はアレルギー成立機序の末梢部分での抑制であり, 対症療法と位置づけられる. そこで, アレルギー成立機序のさらに上流に位置する抗原提示細胞(antigen presenting cell;

APC)やT細胞を標的とした治療に目が向けられており, 体質改善を含めたアレルギーの根本的な治療が期待されている.

一般的な免疫感作は, 暴露された抗原をAPCが貪食することから始まり, APCから産生されるサイトカインによって未分化なCD4陽性T細胞(ナイーブT helper細胞; Th0)が, 1型ヘルパーT細胞(T helper type-1; Th1), 2型ヘルパーT細胞(T helper type-2; Th2), interleukin(IL-)17産生ヘルパーT細胞サブセット(Th17), 制御性T細胞(regulatory T cell; Treg)の異なったレパートリーへと分化することで免疫応答を生じる. Th1応答とTh2応答においては明らかな増幅回路とお互いを抑制し合う機構が存在する(図1). たとえば, アレルギー応答であるTh2応答の局所においては, APCであるmacrophage(Mp)からinterleukin(IL-)10等のTh2サイトカインが産生されTh2細胞に働き, Th2細胞から産生されたIL-4がMpの細胞内還元型グルタチオン(intracellular glutathione; icGSH)を低下させ

*連絡先: 〒629-0392 京都府南丹市日吉町野田ヒノ谷6-1
明治国際医療大学眼科学教室
E-mail: noriko-h@koto.kpu-m.ac.jp

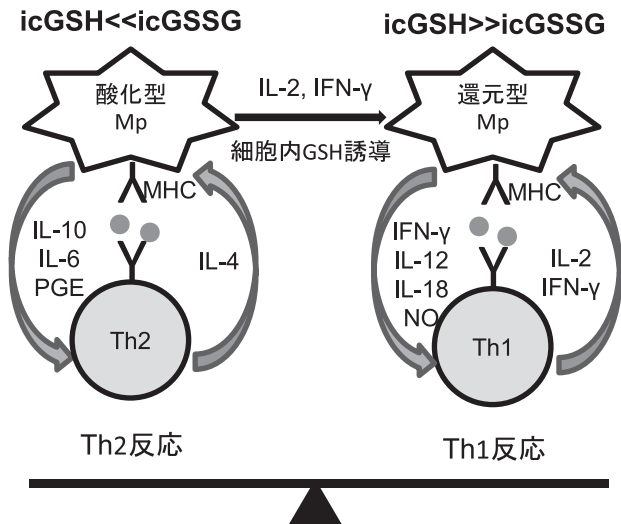


図1 免疫炎症局所における抗原提示細胞とT細胞との増幅回路と抑制機序

アレルギー局所においては細胞内還元型グルタチオン量の低下した酸化型マクロファージがTh2サイトカインを産生してTh2細胞を誘導活性化させる。Th2細胞から産生されたIL-4が可塑性のあるマクロファージをさらに酸化型に偏倚させ増幅回路を形成する。細胞内グルタチオン量を増加させて誘導した還元型マクロファージはTh1サイトカインを産生し、Th2応答を抑制できる。

て酸化型Mφを誘導し、さらなるTh2応答を増強している。また、icGSHを低下させることによって還元型Mφが抑制され、Th1応答が抑制されている。重要なことは、Mφには可塑性があることであり、人為的にicGSHを増加させて還元型Mφを誘導するとinterferon (IFN- γ)などのTh1サイトカインを産生してTh2応答を抑制できる^{4,5)}。この理論を用いることによってTh1/Th2免疫応答をin vivoでも調節可能である。実際、酸化型Mφ誘導剤によるTh1免疫応答の抑制では角膜移植拒絶反応を抑制できており⁶⁾、逆に、還元型Mφ誘導剤を全身投与することによるTh2免疫応答の抑制ではアレルギー性結膜炎抑制を抑制できている⁷⁾。アレルギー性結膜炎の治療分野においては、局所投与可能であり、かつ、簡便安価な薬剤の開発が囑望されている。

N-acetyl cysteine (NAC)は含硫アミノ酸の一種であり、アセトアミノフェン中毒解毒剤や去痰剤として上市されているだけでなく、アンチエイジングサプリメントにも用いられている強い抗酸化物質である。特に、細胞内のicGSHを増加させる作用を有しており、還元型Mφ誘導を経て強いTh1免疫応答誘導剤としても知られている⁴⁾。また、英国では糸状角膜炎に対する粘膜炎溶解剤として点眼薬が上市されている。

今回、点眼薬としても安全性が確立しており、且

つ、icGSH誘導剤であるNACを用いた抗アレルギー効果を検討した。結果、アレルギー性結膜炎に対しての有意な効果を認めたので報告する。

II. 方法

対象

本検討は明治鍼灸大学（現明治国際医療大学）の研究倫理委員会の承認を得て開始した（承認番号14-29, 14-30）。2003年2月から2003年5月の間に明治国際医療大学附属病院眼科を受診した季節性アレルギー性結膜炎患者のうち、スギ抗原に対するradioallergosorbent test (RAST)検査、もしくは、スクラッチテスト陽性の症例のみをエントリーした。十分な説明を行い、本試験への参加について患者本人より自由意志による同意を書面にて得られた30例（男性14名女性16名、平均年齢28.6 \pm 1.9歳[SEM]）60眼を対象とした。除外基準として、(1)肝・腎・心・呼吸器疾患、糖尿病、アトピー疾患、その他重篤な疾患を有する症例、(2)妊婦または妊娠している可能性のある症例、および授乳中の症例、(3)現在、抗アレルギー剤、ステロイド剤で治療中の症例、(4)担当医師が試験対象として不適当と判断した症例、を設けた。

方法

点眼試験プロトコール

NAC点眼液（30mg/ml）と2%クロモグリク酸ナトリウム（sodium cromoglicate; SCG）点眼液とを用いた。被験者は右眼にNAC点眼液、左眼にSCG点眼液を2週間、1日4回、1回1滴点眼した。検査項目および観察項目と時期は、(1)患者背景として性別、生年月日、合併症の有無、疾患眼、既往歴を聴取、(2)投与開始前から2週間までの自覚症状（眼掻痒感・流涙・羞明・眼脂・眼痛・異物感）については、スコアの目安（表1）を書き込んだアレルギー日記を毎日記入させて集計し、7段階のスコア化を行った。また他覚所見（眼瞼結膜：充血・腫脹・濾胞・乳頭、眼球結膜：充血・浮腫）においては点眼前、点眼1週後、点眼2週後の前眼部写真撮影を行い、スコアの目安（表1）をもとに、第三者による写真判定で4段階のスコア化を行った。(3)投与期間中に悪化した症状・所見を含む、副作用に関する評価を行った。

インプレッションサイトロジー法を用いた細胞内グルタチオン量変化解析

インプレッションサイトロジー法を用いて結膜上

表 1 自覚症状および他覚所見スコアの目安

自覚症状の目安		0	1	2	3
掻痒感		かゆくない	少しかゆいががまんできる	かゆい	かゆくてがまんできない
眼脂		ない	目やには出るが困らない	目やにが多くて困る	目やにが多くて、目が開けられない
異物感		ない	ときどきゴロゴロする	ゴロゴロするが努力すれば目が開く	たえずゴロゴロして目が開けられない
羞明感		まぶしくない	少しまぶしい	まぶしい	大変まぶしくて目を開けられない
流涙		気にならない	少し目が潤む	涙が出る	涙が溢れてとまらない
点眼刺激		しめない	少ししみる	しみるが我慢できる	大変しみて我慢できない
結膜所見の目安					
		0	1	2	3
眼瞼結膜	充血	所見なし	数本の血管拡張	多数の血管拡張	個々の血管の識別不能
	腫脹	所見なし	わずかな腫脹	びまん性の薄い腫脹	びまん性混濁を伴う腫脹
	濾胞	所見なし	1~9 個	10~19 個	20 個以上認める
	乳頭	所見なし	直径 0.1~0.2mm	直径 0.3~0.5mm	直径 0.6mm 以上
眼球結膜	充血	所見なし	数本の血管拡張	多数の血管拡張	全体の血管拡張
	浮腫	所見なし	部分的腫脹	びまん性の薄い腫脹	胞状腫脹

自覚症状においてはスコアの目安を書き込んだアレルギー日記を毎日記入させて集計した。他覚所見においては眼局所の写真撮影を行い、第三者によるスコア集計を行った。

皮細胞を採取した⁸⁾。すなわち、点眼による局所麻酔後、開瞼器を用いた開眼によって結膜から涙液を破綻させ、Whatman nitrocellulose filters を接着させることによって結膜上皮細胞を採取した。採取したサンプルはすみやかに乾燥させ、Anaero pouch system (BIONIX, Sugiyama-gen Co. Ltd.) を用いて無酸素状態、暗所、4°Cで保存した。保存サンプルは100mMの monochlorobimane (MCB, M-1381, Molecular Probes, Eugene, OR) で染色後 (常温, 暗所, 15 分間) HBSS にて2回洗浄を行い、VECTASHIELD Mounting Medium with propidium iodide (PI) (H-1300, VECTOR, CA) を用いて包埋と核染色とを行った。MCB 試薬は glutathione-S-transferase を介してチオール基(-SH 基) と特異的に結合し、蛍光発色する試薬であり (励起波長 405nm, 蛍光波長 410-480nm), 細胞内 GSH 量を評価するのに用いられている⁹⁾。共焦点顕微鏡 (TCS SP5, Leica, Germany) を用いて撮影し、256 階調で出力された細胞質の蛍光強度を比較した。それぞれのサンプルにおける蛍光強度は、ランダムに撮影した3箇所画像を用いて10個以上の細胞における細胞質の蛍光強度を平均化して算定した。なお、比較対象となるサンプルはすべて同時に染色を行い、撮影時には excitation laser power と gating of

emission wavelengths と detection hole size を同一にするとともに、健常眼結膜サンプルを常にコントロールとして撮影し標準化した。

統計解析

点眼前と点眼7日後との icGSH 量の比較、ならびに、点眼前と点眼後1-14日までの自覚症状と他覚所見の比較においては Wilcoxon の符号付順位和検定を用いて検討し、有意水準は5%とした。NAC 点眼と SCG 点眼とにおける群間比較については反復測定による二元配置の分散分析法を用いて検討し、有意水準は5%とした。統計ソフトは SPSS11.0J (SPSS.Inc) を使用した。

III. 結果

NAC 点眼による細胞内 GSH 上昇効果

点眼前の両眼の結膜と、NAC 点眼7日後の右眼結膜、SCG 点眼7日後の左眼結膜を比較検討した (N = 10)。典型例を擬似カラー表示させたものを図2に示す (黄, 赤, 青, 緑の順に蛍光強度が強い)。点眼前における左右眼の icGSG 量に有意差はなく (蛍光輝度はそれぞれ 75.5 ± 10.5 (SEM, 以下同様),

78.2±12.2, 各 N=10), SCG 点眼後にも icGSH 量に変化は認められなかった (73.9±9.5). 一方, NAC 点眼によって有意に icGSH の上昇がみられた (193.1±16.5, $p<0.001$) (図 2). よって, NAC による icGSH 量上昇作用は 1 日 4 回, 7 日間の点眼でも有効に作用することが明らかとなった.

NAC 点眼によるアレルギー自覚症状の改善

眼掻痒感は本検討によってエントリーされた 30 例すべてが有していた. しかし, その他の自覚症状検討項目においては 2 週間の検討期間を通じて自覚が全くなかった症例も多数いた (流涙 9 例, 羞明 24 例, 眼脂 6 例, 眼痛 11 例, 異物感 14 例). ただ,

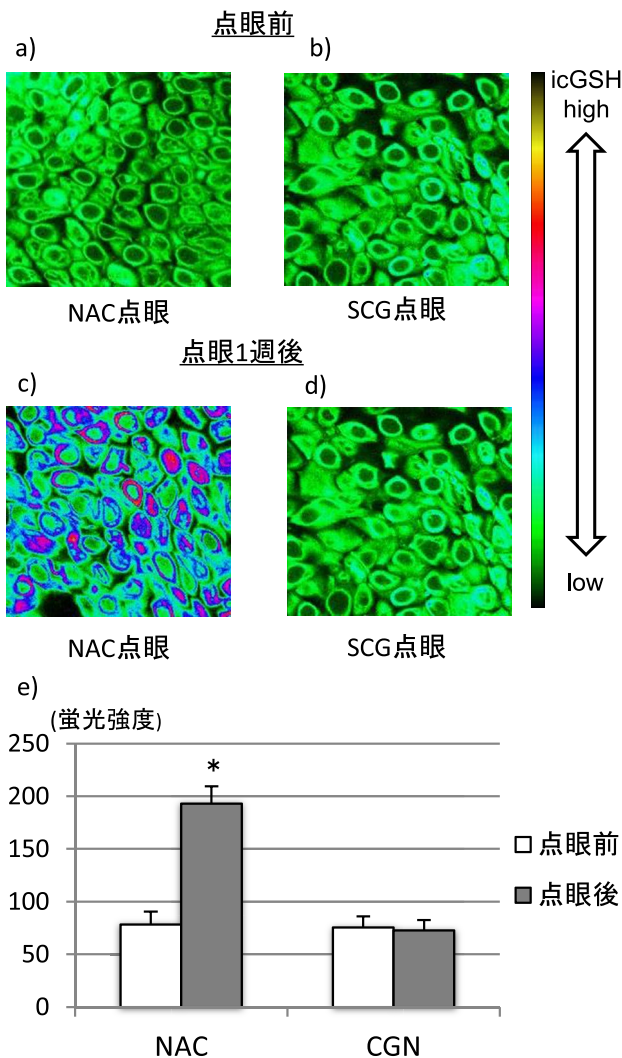


図 2 NAC 点眼および SCG 点眼によるヒト結膜上皮細胞の icGSH 変化
同一被験者の, 左眼に SCG 点眼を, 右眼に NAC 点眼をそれぞれ 1 日 4 回 1 週間点眼させ, 点眼前 (a, b) と点眼後 (c, d) の結膜上皮細胞における icGSH 量を比較した (icGSH 量が高い順に黄, 赤, 青, 緑で示す). 点眼前に両者に差はなく, NAC 点眼後に有意な icGSH 量の増加を認めた ($p<0.001$) (e).

症状の有無に関する左右差は無かったため, 眼掻痒感以外の項目においても 30 例すべての症例を用いて比較検討を行った.

NAC 点眼および CGN 点眼による自覚症状の変化を図 3 に示す. 掻痒感においては点眼前と比較して, NAC 点眼も SCG 点眼も同様に点眼 2 日目より有意な低下が見られた (2 日目 $p<0.01$, 3 日目以降 $p<0.001$). NAC 点眼と SCG 点眼との比較においては, 点眼 14 日目で NAC 点眼が SCG 点眼よりも有意な眼掻痒感低下効果を認めた ($p<0.042$). また, NAC 点眼群では全例で観察期間中に一旦眼掻痒感の改善が見られ, 点眼前と点眼 14 日目との比較では, 改善が 23 例, 不変が 3 例, 悪化が 4 例であった.

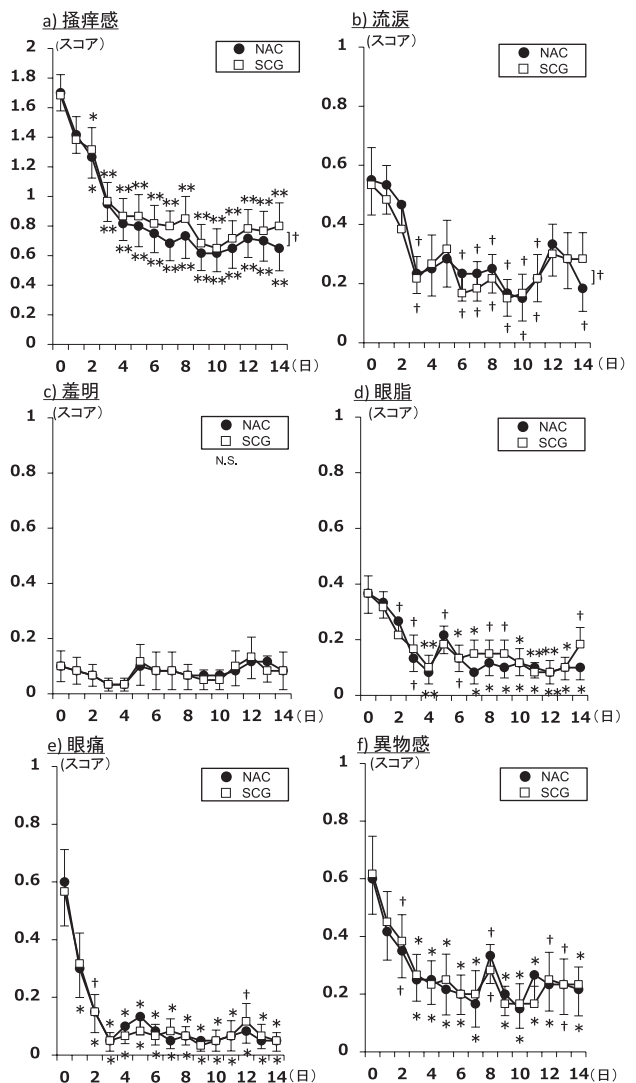


図 3 点眼後の自覚症状変化
NAC 点眼 (●) および SCG 点眼 (□) 後の a) 掻痒感, b) 流涙, c) 羞明, d) 眼脂, e) 眼痛, f) 異物感の推移を示す. NAC 点眼, SCG 点眼ともに有意な自覚症状の改善を認めた. 掻痒感と流涙において, 点眼 14 日目に SCG 点眼群より NAC 点眼群で有意な症状改善が認められた († $p<0.05$, * $p<0.01$, ** $p<0.001$).

SCG 点眼群では観察期間中に眼掻痒感の改善が見られなかった症例が1例あった。また点眼前と点眼14日目との比較では、改善が22例、不変が3例、悪化が5例であった。悪化症例だけの評価において、NAC 点眼群で悪化が見られた症例はすべて他眼のSCG 点眼においても同等の悪化を示していた。また掻痒感スコア2未満のものと2以上のものに重症度で分類し掻痒感改善効果を検討した。掻痒感スコア2未満の症例では両群ともに有意な改善効果はみられなかった (NAC : N=13, $p < 0.45$, SCG : N=13, $p < 0.5$)。しかし、掻痒感スコア2以上の症例ではNAC 点眼, SCG 点眼両群とも、点眼前と比較して有意な症状の改善効果がみられ (NAC : N=17, $p < 0.01$, SCG : N=17, $p < 0.01$)、眼掻痒感の強い症例に自覚症状改善効果が見られていた。

流涙, 眼脂, 眼痛, 異物感の症状においても同様に、NAC 点眼群と SCG 点眼とは類似した抗アレルギー効果を示し、点眼前より有意なアレルギー症状改善効果がみられた。特に、流涙症状の点眼14日目において、NAC 点眼群は SCG 点眼群より有意な流涙症状改善が認められた ($p < 0.05$)。

NAC 点眼によるアレルギー他覚所見の結果

他覚所見スコアの分析結果からは、NAC 点眼群と SCG 点眼群ともに、点眼前後における有意差は検出できず、群間比較においても有意差は見いだせなかった (data not shown)。ただ、それぞれの他覚所見が悪化した症例は1例もなく、また、自覚症状が軽減した症例に充血などの他覚所見が軽減した症例が存在していた。

また、NAC 点眼群と SCG 点眼群ともに副作用と見られる臨床所見は認められなかった。

IV. 考察

NAC には還元型マクロファージを誘導して Th1 免疫応答に偏倚させる効果が指摘されており、抗アレルギー効果が指摘されているが^{10,11)}、アレルギーに対する治療効果は立証されていない。今回、NAC 点眼によるアレルギー性結膜炎に対する抑制効果が明らかとなった。

現在の抗アレルギー治療には抗アレルギー薬や免疫抑制剤が主に用いられている。前者は肥満細胞の脱顆粒抑制と抗ヒスタミン効果によるアレルギー症状の抑制であるため、対症療法である。後者においては種々の免疫担当細胞の抑制を行うが、Th2 免疫応答を偏倚させる作用はない。さらに、ステロイドは icGSH を下げる働きを有しており、チオールレ

ドックス理論においては Th1 抑制に働く。すなわち、icGSH 量を増加させて抗原提示細胞を Th1 環境に偏倚させる抗アレルギー治療はアレルギー体質改善治療として期待できる。

icGSH 量を増加させる薬剤には NAC の他に、Glutathione monoethylester (GSH-OEt), Glutathione diethylester (GSH-(OEt)₂), γ グルタミルシステインジメチルエステル, ポリフェノール, チオレドキシニン, レンチナン (椎茸由来の β -1,3-D-glucan), α -リポ酸, L-メチオニン, アスコルビン, タウリン, L-2-oxothiazolidine-4-carboxylate などが知られている。レンチナンに関しては服用による抗アレルギー効果が二重盲検試験にて立証できていることから¹²⁾、NAC 服用による抗アレルギー効果が類推できる。ただ、NAC はシステインによる硫黄臭が強く、原液の服用や点鼻は臨床上不向きである。したがって、服用する際には種々の香料を含んだ基剤に NAC を溶解するなどの工夫が必要である。点眼薬においては局所への微量投与となるため、硫黄臭を自覚する症例はなかった。今後、他の icGSH 誘導剤における点眼薬への応用が期待できる。

NAC 局所点眼の効果機序として、Th1 免疫応答を誘導できたとは考えておらず、あくまで Th2 炎症の増悪サイクルを抑制できたと考えている。アレルギー性気道過敏症は Th1 免疫応答によって増悪する報告や¹³⁾、アトピー炎症に Th1 免疫応答の関与が指摘されていることから、Th1 誘導だけで Th2 疾患を完治させることはできない。また、NAC には抗炎症作用を有していることが知られており、抗炎症作用が抗アレルギー効果に影響を及ぼした可能性がある。実際、強い抗炎症作用を有する NSAID 点眼を用いた際にもアレルギー性結膜炎に有効であった¹⁴⁾。つまり、NAC が局所のマクロファージなどのアクセサリ細胞や肥満細胞などの nuclear factor-kappa B (NF- κ B) 阻害に直接作用した可能性もあるが、主たる作用機序の検討は今後の課題である。

NAC による抗アレルギー作用機序は既存の抗アレルギー剤の有する作用機序とは全く異なるため、安全・安価な点眼薬として、新たな治療方針を提案できる。また、抗アレルギー点眼剤との併用療法による相乗効果も期待できる。

文献

1. Schaub B, Lauener R, von Mutius E: The many faces of the hygiene hypothesis. *J Allergy Clin Immunol*, 117: 969-977, 2006.
2. Liu AH, Leung DY: Renaissance of the hygiene

- hypothesis. *J Allergy Clin Immunol*, 117: 1063-1066, 2006.
3. Holgate ST: The epidemic of allergy and asthma. *Nature*, 402: B2-4, 1999.
 4. Murata Y, Shimamura T, Hamuro J: The polarization of T(h)1/T(h)2 balance is dependent on the intracellular thiol redox status of macrophages due to the distinctive cytokine production. *Int Immunol*, 14: 201-212, 2002.
 5. Utsugi M, Dobashi K, Ishizuka T, et al.: c-Jun N-terminal kinase negatively regulates lipopolysaccharide-induced IL-12 production in human macrophages: role of mitogen-activated protein kinase in glutathione redox regulation of IL-12 production. *J Immunol*, 171: 628-635, 2003.
 6. Yamada J, Maruyama K, Sano Y, et al.: Promotion of corneal allograft survival by the induction of oxidative macrophages. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 45: 448-454, 2004.
 7. Yamada J, Hamuro J, Terai K, et al.: MHC semi-matching improves murine corneal allograft survival under oxidative macrophage dominance. *Transplantation*, 84: 899-907, 2007.
 8. Calonge M, Diebold Y, Saez V, et al.: Impression cytology of the ocular surface: a review. *Exp Eye Res*, 78: 457-472, 2004.
 9. Murata Y, Shimamura T, Tagami T, et al.: The skewing to Th1 induced by lentinan is directed through the distinctive cytokine production by macrophages with elevated intracellular glutathione content. *Int Immunopharmacol*, 2: 673-689, 2002.
 10. Giordani L, Quaranta MG, Malorni W, et al.: N-acetylcysteine inhibits the induction of an antigen-specific antibody response down-regulating CD40 and CD27 co-stimulatory molecules. *Clinical and Experimental Immunology*, 129: 254-264, 2002.
 11. Bengtsson A, Lundberg M, Avila-Carino J, et al.: Thiols decrease cytokine levels and down-regulate the expression of CD30 on human allergen-specific T helper (Th)0 and Th2 cells. *Clinical and Experimental Immunology*, 123: 350-360, 2001.
 12. Yamada J, Hamuro J, Hatanaka H, et al.: Alleviation of seasonal allergic symptoms with superfine beta-1,3-glucan: A randomized study. *J Allergy Clin Immunol*, 119:1119-1126, 2007.
 13. Hansen G, Berry G, DeKruyff RH, et al.: Allergen-specific Th1 cells fail to counterbalance Th2 cell-induced airway hyperreactivity but cause severe airway inflammation. *J Clin Invest*, 103: 175-83, 1999.
 14. Fujishima H, Fukagawa K, Takano Y, et al.: Comparison of efficacy of bromfenac sodium 0.1% ophthalmic solution and fluorometholone 0.02% ophthalmic suspension for the treatment of allergic conjunctivitis. *J Ocul Pharmacol Ther*, 25: 265-270, 2009.

The efficacy of N-acetyl cysteine for the treatment of allergic conjunctivitis

Noriko Horiuchi, Jun Yamada

Department of Ophthalmology, Meiji University of Integrative Medicine, Kyoto, Japan

Abstract

Purpose: The incidence of allergy symptoms has reached epidemic proportions in Japan. N-acetyl cysteine (NAC) is known to induce a T helper type-1 response through the increase of intracellular glutathione (icGSH) contents in macrophages. The purpose of this study was to examine whether topically applied NAC eye drops would alleviate seasonal allergy symptoms.

Patients and Methods: Thirty patients with seasonal allergic conjunctivitis were administered NAC (30mg/ml) eye drops into their right eye and 2% sodium cromoglicate (SCG) eye drops into their left eye 4 times daily for 2 weeks. Allergy symptoms and objective findings were then assessed clinically and scored. In some patients, conjunctival surface cells were collected by impression cytology.

Nitrocellulose filters were then directly stained with monochlorobimane and evaluated under a confocal laser scanning microscope.

Results: The 2-week application of the NAC eye drops significantly increased icGSH contents, yet SCG eye drops did not. NAC eye drops, as well as SCG eye drops, significantly alleviated ongoing allergy symptoms ($p < 0.05$). Of note, NAC eye drops, more than SCG eye drops, significantly improved seasonal allergy-induced itchy and watery eyes ($p < 0.042$).

Conclusions: The findings of this study suggest that NAC eye drops can possibly alleviate allergic conjunctivitis, through the increase of icGSH contents.