

Sequential Analysis of Cytokines in Human Tears after Keratoplasty

Aki FUCHIGAMI¹⁾, Jane HUANG¹⁾, Kyoko NAKAJIMA²⁾,
Masahiko KOZAWA¹⁾, Kazuhiko YOSHINAGA³⁾, Eiichi UCHIO¹⁾

¹⁾ Department of Ophthalmology, Fukuoka University School of Medicine, Japan

²⁾ Department of Frontier Medical Science,

³⁾ Department of Research Laboratory for School Medicine, Fukuoka University School of Medicine, Japan

Abstract

Corneal graft rejection is one of the most significant complications of corneal transplantation. Presently, there is no quantitative method for predicting the signs of rejection. The purpose of this prospective study was to investigate the kinetics of cytokines in tears and determine the correlation with rejection. The subjects comprised 30 patients, including 24 eyes with penetrating keratoplasty (PKP) and six eyes with lamellar keratoplasty (LKP). All subjects were followed for at least six months. Tear fluid was extracted according to the Schirmer method, and the concentrations of seven inflammatory cytokines (interleukin (IL)-2, IL-4, IL-6, IL-10, tumor necrosis factor (TNF), interferon (IFN)- γ and IL-17A) were measured. Rejection occurred in four eyes after PKP: one eye in the first month, two eyes in the third month and one eye in the sixth month. The IL-6 levels were higher postoperatively, although this increase did not correlate with the incidence of rejection. The preoperative concentrations of IL-2, IL-4, IL-10, TNF and IL-17A in the rejection group were significantly higher than those observed in the non-rejection group ($P < 0.01$, respectively), and the concentrations of IL-2, IL-4, IL-10, TNF, IFN- γ and IL-17A spiked prior to rejection. The levels of these cytokines may be used as markers for predicting corneal rejection after keratoplasty.

Key words: Cytokine, Human tears, Corneal graft rejection, PKP, LKP

角膜移植術後症例における涙液中サイトカイン濃度の経時的解析

淵上 あき¹⁾ ファンジェーン¹⁾ 中嶋 京子²⁾
小沢 昌彦¹⁾ 吉永 一彦³⁾ 内尾 英一¹⁾

¹⁾ 福岡大学医学部眼科学

²⁾ 福岡大学先端医療科学系総合研究室

³⁾ 福岡大学社会医学系総合研究室

要旨: 角膜移植手術において拒絶反応は予後に影響する最も大きな因子の一つであるが、現在のところ拒絶反応の出現を予測することは困難である。今回我々は、涙液中サイトカインの経時の変化を調べ、拒絶反応との関係を調査した。術後6か月間の経過観察が可能であった連続症例30人30眼とした。全層角膜移植手術 (penetrating keratoplasty: 以下 PKP) 24例、層状角膜移植手術 (lamellar keratoplasty: 以下 LKP) 6例および正常対象18例を対象とした。涙液採取および抽出方法は既報に従って行った。症例は、術前、術翌日、術後7日、術後1か月、術後3か月、術後6か月にシルマー法による濾過法で涙液を採取した。解析対象は、7項目のサイトカイン IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF, IFN- γ , IL-17A とした。正常群では、IL-2, IL-4, IL-10, TNF は 5 pg/ml 以下と低い値であった。この7つのサイトカインの中では IL-6 と IL-17A が比較的高

い値であり、それぞれ 26 pg/ml, 21 pg/ml であった。PKP と LKP のすべての症例で拒絶反応の有無にかかわらず、術翌日の IL-6 濃度が術前に比べ有意に上昇 ($p<0.01$, $p<0.01$) したが、他のサイトカインは IL-6 のような術前後の有意な変化はなかった。拒絶反応は PKP の術後 1 か月で 1 例、3 か月で 2 例、6 か月で 1 例みられた。涙液中のサイトカイン濃度は個人差が大きく濃度だけでの評価は困難であったが、経時的に変化をみていくと拒絶反応群では類似した傾向が見られた。術前に IL-2, IL-6, IL-10, TNF, IL-17A が正常群より高い症例は拒絶反応をおこしやすく注意を要する。術後、IL-2, IL-4, IL-10, TNF, IFN- γ , IL-17A と多種のサイトカインが上昇した場合には、数週間以内に拒絶反応が起こることが予測された。ステロイドや免疫抑制剤の早期の投与を開始することができれば、拒絶反応が予防できるのではないかと考えられた。今回の検討で涙液中のサイトカイン濃度の解析が拒絶反応の予測に有用であると思われた。今後、さらなる症例の解析と免疫学的解明が必要である。

キーワード：サイトカイン、涙液、拒絶反応、全層角膜移植、表層角膜移植

序 論

角膜移植手術において、拒絶反応は最も大きな予後に悪影響を及ぼす因子の 1 つである^{1)~5)}。角膜における免疫学的な研究がすすめられたにもかかわらず、同種間角膜移植における拒絶反応の発症は今でも予後不良因子の主要な原因である^{6,7)}。現在のところ、拒絶反応を引き起こしている精密なメカニズムは完全には解明されておらず、拒絶反応を予測する方法はない^{8,9)}。

IL-2, IFN- γ , TNF- α などの Th1 由来のサイトカインと、IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 などの Th2 由来のサイトカインの相互関係のバランスが同種間移植の拒絶反応の発症に関与している¹⁰⁾。角膜移植における前房水や涙液中のサイトカイン濃度が間接的に調べられ、Th1/Th2 について報告されている^{11,12)}。角膜移植後のサイトカインとケモカインの発現が調べられているが、動物モデルでは mRNA やたんぱく質での報告、ヒトにおいては前房水のたんぱく質での報告がある^{5,11~17)}。前房水を検体として採取するには、拒絶反応の誘因になる可能性や感染症を引き起こす可能性があり危険をとまなう。一方で、涙液を検体とすれば安全性は高い。多くの種類の炎症性疾患において、サイトカインの重要性や役割が報告されているが、拒絶反応におけるヒトの涙液中サイトカインの正確な濃度は明らかにされていない^{13,14)}。最近の報告で、PKP におけるヒトの涙液中サイトカインを調べたものがある⁸⁾。しかし、この報告では健常人のコントロールはなく、術前の基準値が不明であり、拒絶反応を引き起こすサイトカインは明確にはならなかった。

本研究の目的は、安全で簡易な濾紙による涙液採取法を用いて、拒絶反応と涙液中のサイトカインの関係があるのか調査することであった。我々は、過去の報告とは異なる 7 つのサイトカイン；IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF, IFN- γ , IL-17A について角膜移植における涙液中の濃度を

調査した。

対象と方法

福岡大学病院眼科で 2011 年 8 月から 2012 年 9 月に角膜移植手術を受け、術後 6 か月間経過観察が可能であった 30 症例を対象とした。コントロールは、点眼・内服・コンタクトレンズの使用がなく、感染症・アレルギー性結膜炎・免疫学的な疾患の既往がない健常人ならびに白内障術前、硝子体術前の患者を対象とした。全ての症例で、ヘルシンキ宣言に基づいたインフォームド・コンセントを得た後に同意書を取得した。本研究は、福岡大学病院臨床研究審査委員会による倫理委員会の承認を得て行った。

患者についての詳細な背景は、表 1 に要約した。LKP 6 例および PKP24 例、合計 30 例、男性 16 人、女性 14 人であった。患者は 33 歳から 85 歳で、平均年齢は 64.2 ± 11.2 (平均値 \pm 標準偏差) 歳であった。拒絶反応は PKP の術後 1 か月で 1 例、3 か月で 2 例、6 か月で 1 例みられた。18 人 18 眼の正常な症例の涙液をコントロールとして使用した。コントロールの平均年齢は 39.4 ± 10.3 歳であり、男性 8 人および女性 10 人であった。

すべての手術は同一の術者により実施された。すべてのドナー角膜は、手術前は Optisol-GS (Bausch&Lomb, NY) に保存されていた。術後は、6 か月間、ステロイド点眼と抗生剤点眼による眼局所投与が行われた。術後のステロイド点眼は、ベタメタゾン、デキサメタゾン、フルオロメソロンの順に 3 か月おきに漸減した。拒絶反応が起きた時のみ、ステロイド内服や免疫抑制剤の内服加療を行った。

診断には細隙灯顕微鏡を使用し、角膜内皮所見や浮腫、角膜中心厚の増加、臨床経過などを考慮し、同一の医師により拒絶反応を診断した。涙液採取を行う 15 分前には点眼は行わないようにした。涙液採取および抽出

表 1 患者背景

Eyes	LKP /PKP	Age	Sex	Cause of transplantation	Previous rejection	Months before rejection	Initial visual acuity (log MAR)	Final visual acuity (log MAR)
1	LKP	58	M	Dystrophy	(-)	(-)	0.4	0.16
2	LKP	62	M	"	(-)	(-)	0.4	0
3	LKP	77	M	"	(-)	(-)	0.4	0.7
4	LKP	43	M	<i>Acanthamoeba</i> keratitis	(-)	(-)	2.3	0.4
5	LKP	60	M	Fungal keratitis	(-)	(-)	0.7	-0.08
6	LKP	75	F	Bullous keratopathy	(-)	(-)	-0.08	0.52
7	PKP	71	M	"	(-)	(-)	1.85	0.52
8	PKP	71	F	"	(-)	(-)	0.4	0.52
9	PKP	77	F	"	(-)	(-)	2.3	0.08
10	PKP	80	F	"	(-)	(-)	1.3	0
11	PKP	82	F	"	(-)	(-)	1.9	0.52
12	PKP	33	M	Keratoconus	(-)	(-)	0.7	0
13	PKP	40	M	"	(-)	(-)	1.52	0.04
14	PKP	44	M	" , retinitis pigmentosa	(-)	(-)	1.85	0.52
15	PKP	45	F	"	(-)	(-)	1.3	-0.08
16	PKP	55	M	"	(-)	(-)	0.82	0
17	PKP	62	F	Corneal opacity, post vitrectomy for proliferative diabetic retinopathy	(-)	(-)	2.3	2.3
18	PKP	73	F	"	(-)	(-)	0.7	0.7
19	PKP	79	M	Corneal leukoma	(-)	(-)	1.3	1
20	PKP	81	F	Traumatic corneal opacity	(-)	(-)	2.3	1.3
21	PKP	52	F	Transplant rejection (second PKP), bullous keratopathy, Behcet's disease	(+)	(-)	0.52	0.1
22	PKP	78	F	" , "	(+)	(-)	1.22	0.3
23	PKP	79	F	" , "	(+)	(-)	2.3	1.85
24	PKP	41	M	" , traumatic corneal opacity	(+)	(-)	1.52	1.04
25	PKP	57	M	" , traumatic corneal perforation	(+)	(-)	2.3	1.52
26	PKP	69	F	" , dystrophy	(+)	(-)	1.52	0.08
27	PKP	75	F	Bullous keratopathy	(-)	1M	0.7	0.08
28	PKP	57	M	Transplant rejection (LKP, second PKP), Mooren's ulcer	(+)	3M	1.52	0.22
29	PKP	65	M	Bullous keratopathy, retinitis pigmentosa	(-)	3M	1.16	0.4
30	PKP	85	M	"	(-)	6M	1.9	0.52→1.52

方法は既報に従って行った¹⁸⁾。検体は、術前、術翌日、術後7日、術後1か月、術後3か月、術後6か月に、シルマー法による濾過法で採取した。すべての検体は、実験直前まで-80℃で凍結保存された。涙液抽出には、シルマー紙に0.01M リン酸緩衝液 pH7.2 (0.5mol NaCl, 0.5% Tween 20) 100μl を添加後、4℃にて一晚振盪し、検体を作製した。サイトカインの測定はベクトン・デッキンソン (BD) 社の BDTM Cytometric Beads Array システム (CBA) を用い、BDTM FACS Canto II にて蛍光抗体法による多項目同時解析を行った。データ解析は BD 社の FCAP Array 解析ソフトを使用した。解析対象は、7項目のサイトカイン IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF, IFN-γ, IL-17A とした。統計学的検討は、Wilcoxon の順位和検定もしくは Mann-Whitney の U 検定にて比較し、危険率 5% 未満を統計学的に有意差ありとした。

結 果

コントロール群の各サイトカイン濃度を図1に示した。コントロール群では、IL-2, IL-4, IL-10, および TNF 濃度が 5 pg/ml 以下と少なかった。IL-6 および IL-17A は、それぞれ 26 pg/ml, 21 pg/ml であり、他のサイトカイン

より 4～5 倍高値であった。

拒絶反応群の術前値とコントロール群の比較では、拒絶反応群は IL-2, IL-6, IL-10, TNF, IL-17A が有意に高く (p=0.0023, 0.0025, 0.0025, 0.0015, 0.0025), IL-4, IFN-γ は有意に低かった (p=0.0025, 0.0025)。拒絶反応群と拒絶反応のなかった群での手術前のサイトカイン濃度の比較検討では、拒絶反応群は IL-2, IL-4, IL-10, TNF, IL-17A が有意に高かった (p=0.0014, 0.0014, 0.0016, 0.0011,

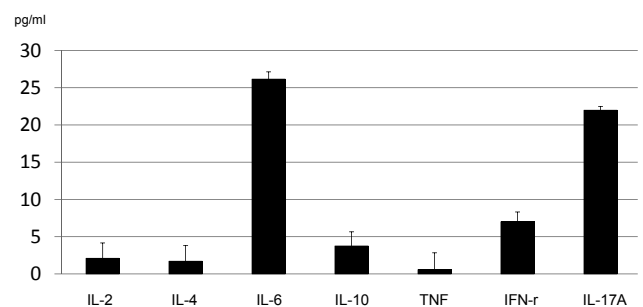


図 1 コントロール群の各サイトカイン濃度
コントロール群では、IL-2, IL-4, IL-10, TNF 濃度が 5 pg/ml 以下で少なかった。IL-6 および IL-17A は、それぞれ 26 pg/ml, 21 pg/ml であり、他のサイトカインより 4～5 倍高値であった。

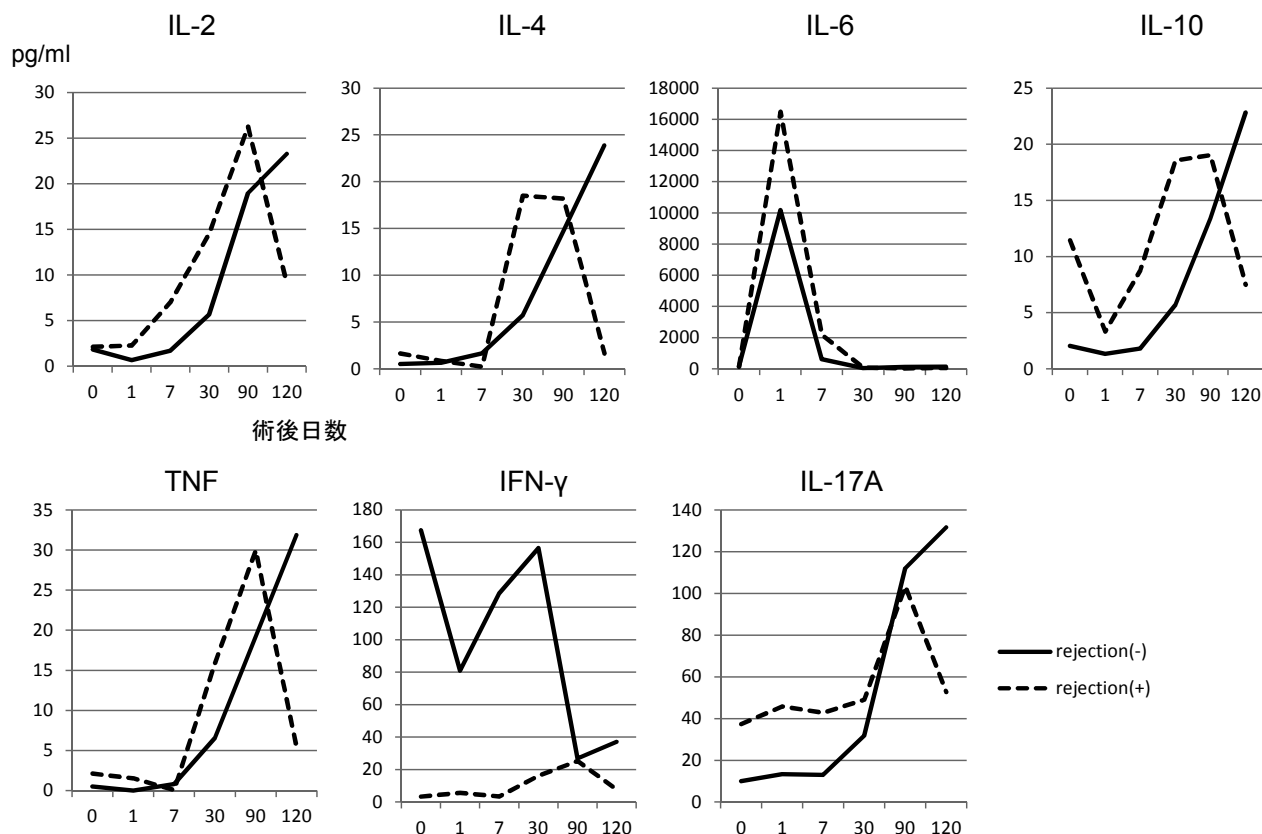


図2 拒絶反応群と拒絶反応のなかった群の経時的変化

手術前後でIL-6のみ拒絶反応の有無にかかわらず術後高値となっていた ($P < 0.01$)。IL-6は術後1か月で正常化していた。他のサイトカインでは手術前後での有意差はなかった。拒絶反応群となかった群で術後6か月間での有意差はなかった。

0.0015)。特にIL-10は拒絶反応のなかった群の5倍以上の濃度であった。一方で、拒絶反応群は拒絶反応のなかった群と比較して、術前のIL-6、IFN- γ の濃度が有意に低かった ($p=0.0016, 0.0016$)。

拒絶反応時の濃度をコントロール群と比較すると、IL-2、IL-6、TNF、IL-17Aは有意に高く ($p=0.0023, 0.0025, 0.0016, 0.0025$)、IL-4、IL-10、IFN- γ は有意に低かった ($p=0.0025, 0.0025, 0.0025$)。

拒絶反応群と拒絶反応のなかった群の6か月間における経時的変化を図2に示した。今回の我々の結果では、既報⁸⁾にあるような拒絶反応の有無での各サイトカインの有意差はなかった。手術前後でIL-6のみ、拒絶反応の有無にかかわらず、術後高値となっていた ($P < 0.01$)。術後1か月で、正常値にまで減少していた。拒絶反応群となかった群で、術後6か月間での有意差はなかった。

しかし、拒絶反応群では一定の傾向が出現していた。拒絶反応群の発症時期による経時的変化を図3に示した。拒絶反応群を拒絶反応が発症した時期により、1か月、3か月、6か月目の発症と3つの群に分けると、IL-2、IL-4、IL-10、TNF、IFN- γ 、IL-17Aでは、拒絶反応発症

前にスパイクがみられた。

拒絶反応群の拒絶反応前の変化を図4に示した。拒絶反応発症時点を0とし、拒絶反応発症時点の1つ前の測定点を-1、2つ前の測定点を-2とすると、IL-2、IL-4、IL-10、TNF、IFN- γ 、IL-17Aでは、拒絶反応が起こる前に有意に上昇し、拒絶反応が起きた時点で低下していた (各々、 $P=0.028$)。特に、IL-4とIL-10のサイトカイン濃度は拒絶反応が起こる前の1/10以下に著しく低下していた。IL-6のみスパイクがみられず、拒絶反応の出現前も出現時も濃度が低下していた。IL-6は拒絶反応後に拒絶反応がない群と比較すると濃度が上昇していた ($P=0.0016$)。

サイトカインのバランスを調べるために、各サイトカインとIL-10の比を調査した。拒絶反応が起きる1つ前の測定点のIL-4/IL-10、IFN- γ /IL-10は、拒絶反応群がない群より有意に低かった ($P < 0.01$)。しかし、他の時点での比較では有意差はなかった。

考 察

角膜組織において、IL-6は重要な役割を担っており、角膜内皮の透明性を保つ役割や創傷治癒に関与してい

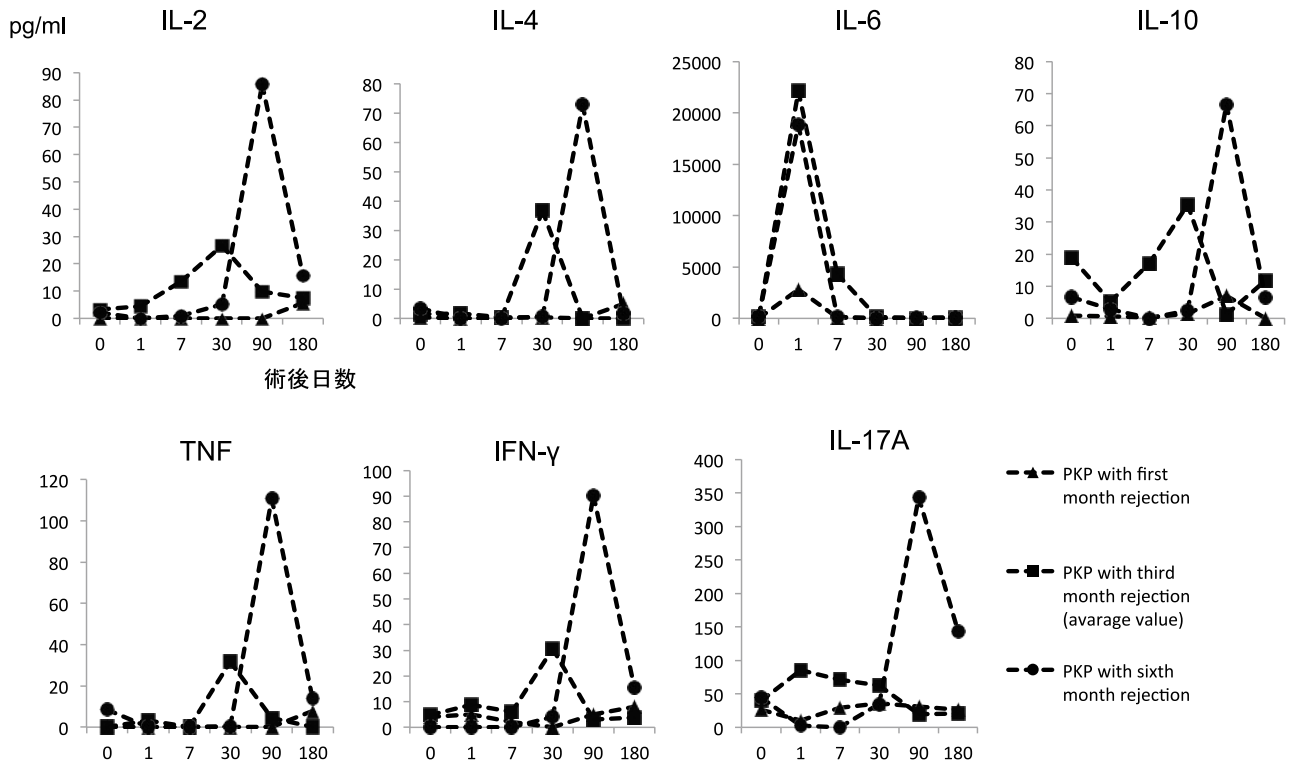


図3 拒絶反応の発症時期による経時的変化
拒絶反応群を拒絶反応が発症した時期により、1か月、3か月、6か月目の発症と3つの群に分けると、IL-2, IL-4, IL-10, TNF, IFN-γ, IL-17Aでは、拒絶反応発症前にスパイクがみられた。

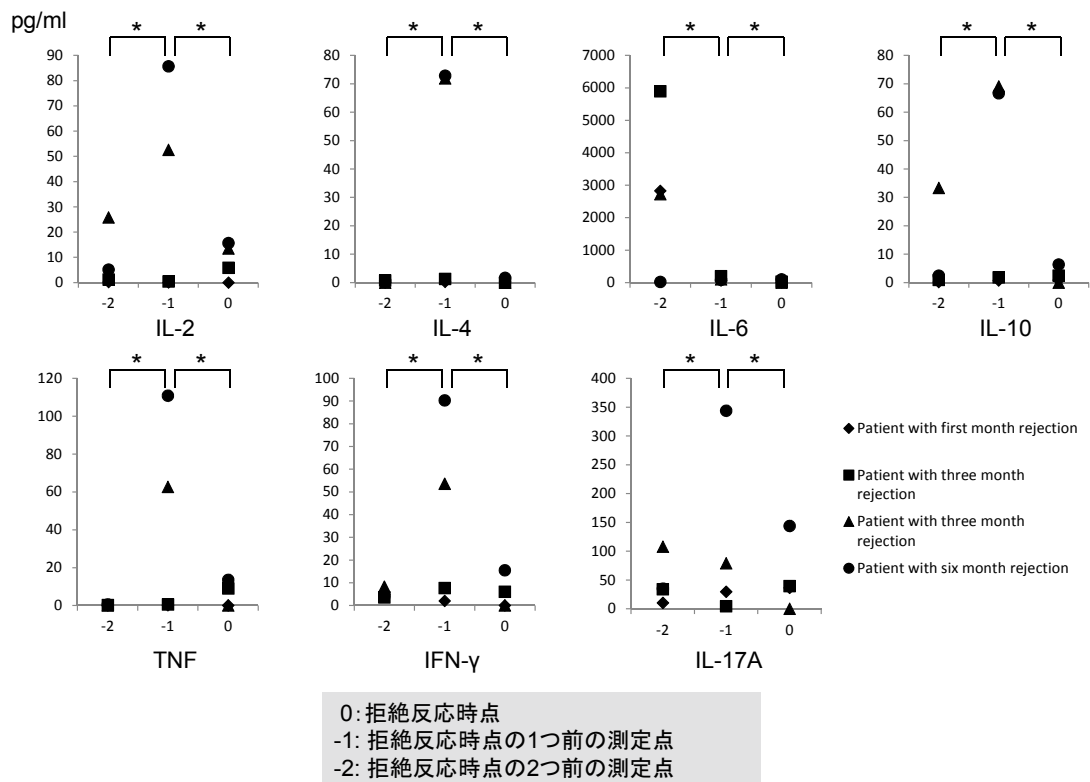


図4 拒絶反応前の変化
拒絶反応時点を0とし、発症時点の1つ前の測定点を-1、2つ前の測定点を-2とすると、IL-2, IL-4, IL-10, TNF, IFN-γ, IL-17Aでは、拒絶反応前に有意な増減、スパイクがみられた (* $P < 0.05$)。

る¹⁹⁾。これらの機能が働いている時は、IL-6が短期間で急激に増加するが、PKP後の角膜組織のIL-6だけでなく涙液中のIL-6も急激に増加したとの報告⁸⁾がある。今回の我々の結果でも同様に、術翌日の涙液中IL-6が有意に増加していた。IL-6による創傷治癒の機能は継続するので、今回の我々の結果では、正常化するのに術後1か月の時間がかかっていた。IL-6はその後5か月間減少を続け、拒絶反応群でも減少していた。一方で、角膜移植の拒絶反応時には、前房水中のIL-6が増加したとの報告がある^{5, 14)}。これらの結果から、IL-6は前房水中と涙液中では異なる役割があることが示唆された。

IL-1 β , IL-8, TNF- α などのサイトカインは、新生血管の過程に関与していると報告されている^{18, 20)}。TNF- α の発現が促進されると、角膜移植の拒絶反応ハイリスク症例では血管侵入がみられた²¹⁾。同種間角膜移植の拒絶反応時²²⁾には、前房水や血清中のmRNA¹³⁾とたんぱく質²¹⁾でTNF- α の発現がみられた。我々の研究でも同様に、角膜移植の拒絶反応の発症前に涙液中のTNF増加をみとめた。TNFは、角膜内皮細胞や上皮細胞のアポトーシスの感受性を増加させることが示唆された。

非炎症性サイトカインで最も特徴的な反応がみられた。IFNとIL-10は拒絶反応前のスパイクでは10倍以上に増加し、拒絶反応時に減少していた。涙液中のIL-10が減少していることが内皮型拒絶反応では重要である。動物モデルではIL-10が拒絶反応を遅らせたり減らしたりするとの報告がある^{23~25)}。IL-10は、単球/大食細胞のMHCクラスIIの発現を減少させ、それらの抗原提示機能を妨げる作用がある。IL-10は、TNF- α , IL-1 β , IL-8²⁶⁾などの炎症を誘発するサイトカインの生産を抑制し、単球も調整する。我々の研究において、IL-10は過去の報告と同様に角膜拒絶反応時には減少し、濃度は正常群の3pg/mlより低かった。このことは、拒絶反応時にIL-10が急激に減少した原因として、このサイトカインによる防御機能を失ったことが示唆された。IFN- γ は拒絶反応のなかった群ではコントロール群や正常群の10倍以上の濃度であった。IFN- γ を注射することでPKP後の拒絶反応を防げたとの報告もある²⁴⁾。それゆえ、術前の涙液の解析でIFN- γ が100 pg/ml以上の高値であることはPKPの術後経過を良好なものにすると言えるであろう。

IL-17Aは、最近いくつかの自己免疫性疾患の病因と言われている炎症誘発性サイトカインである。IL-17Aはまた、心臓および腎臓の同種移植拒絶反応に関与していると報告された^{27~30)}。これらの報告によると、IL-17Aが枯渇したほうが角膜移植における拒絶反応が起こりにくいと仮説が成り立った。しかし、Cunnusamyらは、IL-17Aが角膜の免疫反応を維持するためには必須であり、IL-17AとCD4+CD25+ Tregsの間の相互作用が角膜

の同種移植で拒絶反応を起こさないためには必要である³¹⁾と示した。我々の研究でも、IL-17Aは拒絶反応の前に増加し、拒絶反応時に減少しており、このサイトカインの防御機能が損なわれたことが示唆された。

今回の研究における欠点は2つあげられ、今後の課題となった。まず1点は、経過観察期間を6か月と短くしたことで、6か月以降で拒絶反応が起きた症例が拒絶反応のなかった群に入っていることである。長期的な比較検討でも今回と同じ結果が得られるのか再検討が必要と思われた。もう1点は、涙液採取時期が等しい間隔ではなかったため、スパイクの時期が正確に定義できなかったことである。術直後は1日、術後6か月では3か月の間隔であった。今回の結果を参考に、Th1, Th2由来の多種のサイトカインの増加をみとめたら今後拒絶反応がおけると予測し、短期間に次の涙液採取を行う必要があると思われた。

涙液中サイトカイン濃度は各症例で大きく異なっているが、今回の研究により、拒絶反応前に同様の傾向が観察された。角膜移植における拒絶反応を予測し、早期のステロイド内服や免疫抑制剤内服等の予防的治療ができれば、同種間角膜移植での生存率は改善しうるのであろう。

簡易で安全な方法で涙液中サイトカインを調べること、PKP術前のハイリスク症例を同定でき、涙液中サイトカインを経時的に追うことで、PKP後の拒絶反応を起こす可能性を早期に発見できると考えられた。

利益相反公表基準

該当無し。

参 考 文 献

1. King WJ, Comer RM, Huddle T, Larkin DFP, George AJT. Cytokine and chemokine expression kinetics after corneal transplantation. *Transplantation* 70: 1225-1233, 2000.
2. Pleyer U, Dannowski H, Volk H-D, Ritter T. Corneal allograft rejection: current understanding. *Ophthalmologica* 215: 254-262, 2001.
3. Claesson M, Armitage WJ, Fagerholm P, Stenevi U. Visual outcome in corneal grafts: a preliminary analysis of the Swedish Corneal Transplant Register. *Br J Ophthalmol* 86: 174-80, 2002.
4. Xie L, Shi W, Guo P. Roles of tumor necrosis factor-related apoptosis inducing ligand in corneal transplantation. *Transplantation* 76: 1556-1559, 2003.
5. Funding M, Vorum H, Nexø E, Moestrup SK, Ehlers N, Møller HJ. Soluble CD163 and interleukin-6 are

- increased in aqueous humour from patients with endothelial rejection of corneal grafts. *Acta Ophthalmol Scand* 83: 234-239, 2005.
6. Niederkorn JY, Mayhew E, Mellon J, Hedge S. Role of tumor necrosis factor receptor expression in anterior chamber-associated immune deviation (ACAID) and corneal allograft survival. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 45: 2674-2681, 2004.
7. Ritter T, Yang J, Dannowski H, Vogt K, Volk HD, Pleyer U. Effects of interleukin-12p40 gene transfer on rat corneal allograft survival. *Transplant Immunol* 18: 101-107, 2007.
8. Fodor M, Gogolak P, Rajnavolgyi E, Berta A, Kardos L, Modis L, Facsk A. Long-term kinetics of cytokine responses in human tears after penetrating keratoplasty. *Journal of Interferon & Cytokine Research* 29: 375-379, 2009.
9. Maier P, Heizmann U, Bohringer D, Kern Y, Reinhard T. Predicting the risk for corneal graft rejection by aqueous humor analysis. *Molecular Vision* 17: 1016-1023, 2011.
10. Niederkorn JY. Immunology and immunomodulation of corneal transplantation. *Int Rev Immunol* 21: 173-196, 2002.
11. Reinhard T, Bocking A, Pomjanski N, Sundmacher R. Immune cells in the anterior chamber of patients with immune reactions after penetrating keratoplasty. *Cornea* 21: 56-61, 2002.
12. Ventura ACS, Engelmann K, Dahinden C, Bohnke M. Endotoxins modulate the autocrine function of organ cultured donor corneas and increase the incidence of endothelial cell death. *Br J Ophthalmol* 81: 1093-1098, 1997.
13. Torres PE, De Vos AF, van der Gaag R, Martins B, Kijlstra A. Cytokine mRNA expression during experimental corneal allograft rejection. *Exp Eye Res* 63: 453-461, 1996.
14. van Gelderen BE, van der Lelij A, Peek R, Broersma L, Treffers WF, Ruijter JM, van der Gaag R. Cytokines in aqueous humor and serum before and after corneal transplantation and during rejection. *Ophthalmic Res* 32: 157-164, 2000.
15. Sano Y, Osawa H, Sotozono C, Kinoshita S. Cytokine expression during orthotopic corneal allograft rejection in mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 39: 1953-1957, 1998.
16. Yamagami S, Kawashima H, Endo H, Tsuru T, Shibuta H, Kagawa Y, Hori J, Yamagami H, Isobe M. Cytokine profiles of aqueous humor and graft in orthotopic mouse corneal transplantation. *Transplantation* 66: 1504-1510, 1998.
17. Zhu S, Dekaris I, Duncker G, Dana R. Early expression of proinflammatory cytokines interleukin-1 and tumor necrosis factor- γ after corneal transplantation. *J Interferon Cytokine Res* 19: 661-669, 1999.
18. Shoji J, Kitazawa M, Inada N, Sawa M, Ono T, Kawamura M, Kato H. Efficacy of tear eosinophil cationic protein level measurement using filter paper for diagnosing allergic conjunctival disorders. *Jpn J Ophthalmol* 47: 64-68, 2003.
19. Ventura ACS, Engelmann K, Dahinden C, Bohnke M. Endotoxins modulate the autocrine function of organ cultured donor corneas and increase the incidence of endothelial cell death. *Br J Ophthalmol* 81: 1093-1092, 1997.
20. Torres PF, Kijlstra A. The role of cytokines in corneal immunopathology. *Ocular Immunol Inflamm* 9: 9-24, 2001.
21. Yamagami S, Hamrah P, Zhang Q, Liu Y, Huq S, Dana MR. Early ocular chemokine gene expression and leukocyte infiltration after high-risk corneal transplantation. *Mol Vis* 11: 632-640, 2005.
22. Pleyer U, Milani JK, Ruckert D, Rieck P, Mondino BJ. Determinations of serum tumor necrosis factor alpha in corneal allografts. *Ocul Immunol Inflamm* 5: 149-155, 1997.
23. Klebe S, Sykes PJ, Coster DJ, Krishnan R, Williams KA. Prolongation of sheep corneal allograft survival by ex vivo transfer of the gene encoding interleukin-10. *Transplantation* 71: 1214-1220, 2001.
24. Gong N, Pleyer U, Volk HD, Ritter T. Effects of local and systemic viral interleukin-10 gene transfer on corneal allograft survival. *Gene Ther* 14: 484-490, 2007.
25. Chen B, Kapturczak MH, Joseph R, George JF, Campbell-Thompson M, Wasserfall CH, Atkinson MA, Tisher CC, Flotte TR, Agarwal A, Chen S. Adeno-associated viral vector-mediated interleukin-10 prolongs allograft survival in a rat kidney transplantation model. *Am J Transplant* 7: 1112-1120, 2007.
26. Dallman MJ. Cytokines as mediators of organ graft rejection and tolerance. *Curr Opin Immunol* 5: 788-793, 1993.
27. Li L, Huang L, Vergis AL, Ye H, Bajwa A, Narayan V, Strieter RM, Rosin DL, Okusa MD. IL-17 produced by neutrophils regulates IFN-gamma-mediated neutrophil migration in mouse kidney ischemia-reperfusion injury. *J Clin Invest* 120: 331-342, 2010.

28. Liao YH, Xia N, Zhou SF, Tang TT, Yan XX, Lv BJ, Nie SF, Wang J, Iwakura Y, Xiao H, Yuan J, Jevallée H, Wei F, Shi GP, Cheng X. Interleukin-17A contributes to myocardial ischemia/reperfusion injury by regulating cardiomyocyte apoptosis and neutrophil infiltration. *J Am Coll Cardiol* 59: 420-429, 2012.
29. Loong CC, Hsieh HG, Lui WY, Chen A, Lin CY. Evidence for the early involvement of interleukin 17 in human and experimental renal allograft rejection. *J Pathol* 197: 322-332, 2002.
30. Yuan X, Paez-Cortez J, Schmitt-Knosalla I, D'Addio F, Mfarrej B, Donnarumma M, Habicht A, Clarkson MR, Iacomini J, Glimcher LH, Sayegh MH, Ansari MJ. A novel role of CD4 Th17 cells in mediating cardiac allograft rejection and vasculopathy. *J Exp Med* 205: 3133-3144, 2008.
31. Cunnusamy K, Chen PW, Niederkorn JY. IL-17A-dependent CD4+CD25+ regulatory T cells promote immune privilege of corneal allografts. *J Immunol* 186: 6737-6745, 2011.

(平成 26. 10. 9 受付, 平成 27. 1. 5 受理)