

ドライアイにおける結膜上皮障害の検討

鈴木 智, 横井 則彦, 武久 葉子, 小室 青, 木下 茂

京都府立医科大学眼科学教室

要 約

結膜上皮の障害部位の検出に極めて鋭敏と考えられているスルフォローダミン B 染色を用いて, ドライアイ患者 50 例 99 眼 (Sjögren 症候群 (SS) 21 例 41 眼, Sjögren 症候群以外の乾性角結膜炎 (non-SS) 29 例 58 眼) の結膜上皮障害をスコア化し評価した。また, 角膜上皮障害については, フルオレセインを用いてその範囲と密度についてスコア化し, 両者の染色スコアの違いを検討した。さらに, SS と non-SS の結膜上皮障害の重症度の違いについても併せて検討した。その結果, ドライアイでは, 角膜

上皮障害の範囲および密度が高度になるに従って結膜上皮障害も高度になることが明らかとなった。また, 角膜上皮障害の程度が同じでも, SS は non-SS に比べて結膜上皮障害が強い傾向があることが明らかとなった。(日眼会誌 101: 52-56, 1997)

キーワード: スルフォローダミン B 染色, 結膜上皮障害, フルオレセイン染色, 角膜上皮障害, Sjögren 症候群

Evaluation of Conjunctival Epithelial Damage in Dry Eye

Tomo Suzuki, Norihiko Yokoi, Yoko Takehisa,
Aoi Komuro and Shigeru Kinoshita

Department of Ophthalmology, Kyoto Prefectural University of Medicine

Abstract

Using sulphorhodamine B, which is highly sensitive in detecting damaged ocular surface epithelium, we evaluated conjunctival epithelial damage in dry eye patients. The subjects were 99 eyes of 50 dry eye patients (41 eyes of 21 patients with Sjögren's syndrome and 58 eyes of 29 keratoconjunctivitis sicca patients without Sjögren's syndrome). We also investigated the relation between sulphorhodamine B and fluorescein staining in ocular surface epithelium. The conjunctival epithelial damage stained with sulphorhodamine B showed a high correlation

with corneal epithelial damage stained with fluorescein. In addition, conjunctival damage in Sjögren's syndrome tended to be more severe than in patients without Sjögren's syndrome. (J Jpn Ophthalmol Soc 101: 52-56, 1997)

Key words: Sulphorhodamine B, Damaged conjunctival epithelium, Fluorescein, Damaged corneal epithelium, Sjögren's syndrome

I 緒 言

ドライアイとは, 一般に, 涙液の量または質の異常により角結膜上皮が障害された状態と定義される¹⁾。したがって, ドライアイの診断のためには涙液および角結膜上皮の評価が不可欠である。臨床的には, 涙液の異常の検出には Schirmer 試験や breakup time of tear film (BUT) の測定が一般に行われており, 角結膜上皮障害の評価にはフルオレセイン染色やローズベンガル染色が用いられている。

フルオレセインは, 角結膜上皮の障害部を透過し細胞間隙に拡散するため²⁾, 角膜に比べてバリア機能が低い³⁾結膜ではコントラストが低下し, さらに, 結膜および強膜そのものの自然蛍光がノイズとなるため⁴⁾, 結膜上皮障害の検出には限界がある。一方, ローズベンガルは角結膜上皮の変性細胞を染色すると考えられてきた⁵⁾が, ムチンに被覆されていない部位では健全な角結膜上皮をも染色し得ることが近年明らかになり, 上皮障害そのものを検出していない可能性が示唆されている⁶⁾。したがって, 眼表面上皮の障害を評価する場合, フルオレセ

別刷請求先: 602 京都府京都市上京区河原町通広小路上ル梶井町 465 京都府立医科大学眼科学教室 鈴木 智
(平成 8 年 2 月 20 日受付, 平成 8 年 7 月 5 日改訂受理)

Reprint requests to: Tomo Suzuki, M.D. Department of Ophthalmology, Kyoto Prefectural University of Medicine,
465 Kajicho, Hirokoji-agaru, Kawaramachi-dori, Kamigyo-ku, Kyoto-shi, Kyoto-fu 602, Japan

(Received February 20, 1996 and accepted in revised form July 5, 1996)

ンで検出された角膜上皮障害とローズベンガルで検出された結膜上皮障害とは、上皮障害について質的に異なる評価を行っている可能性がある。

そこで、今回我々は、結膜上皮障害の観察に有用とされるスルフォローダミンB染色⁴⁾を用いて、Sjögren症候群(SS)およびSjögren症候群以外の乾性角結膜炎(non-SS)の結膜上皮障害をスコア化して評価した。また、角膜上皮障害についてもフルオレセイン染色を用いてスコア化し、両染色スコアの結果を用いてドライアイの結膜上皮障害と角膜上皮障害の関連を検討し、さらに、SSとnon-SSの結膜上皮障害の重症度の違いについても検討した。

II 対象および方法

1. 対象

健常者(ドライアイの症状がなく、細隙灯顕微鏡による観察において角膜上皮障害を認めない者)10例20眼(男性2例4眼、女性8例16眼)、およびドライアイ患者50例99眼(男性2例4眼、女性48例95眼)を対象とした。ドライアイ患者の内訳は、SS21例41眼(女性のみ)、non-SS29例58眼(男性2例4眼、女性27例54例)である。年齢は、健常者16~69歳(40.1±17.8歳、平均値±標準偏差)、ドライアイ患者21~82歳(53.7±13.3歳)(SS37~69歳(53.5±9.4歳)、non-SS21~82歳(53.8±15.6歳))であった。ドライアイの診断には、①涙液検査として、Schirmer I法(自由瞬目下、点眼麻酔なしで5分間の涙液量を測定)およびI法変法(点眼麻酔5分後に閉眼して5分間の涙液量を測定)(異常値: ≤5mm)、綿糸法⁵⁾(≤10mm)、BUT(≤5秒)、②角結膜生体染色検査として、ローズベンガルスコア⁶⁾(≥3点)、フルオレセインスコア(≥A1D1(宮田ら⁹⁾の分類))を行った。ドライアイは、これら①の中から1つ以上、②の中から1つ以上の両方で異常値を示すものとした。また、Sjögren症候群の診断は、Foxら¹⁰⁾による基準に従って行った。

2. 方法

1) スルフォローダミンB(SRB)染色による結膜上皮の観察

0.5% SRB溶液(SRB(分子量559; Sigma)をBSS PLUS®(Alcon)に溶解⁷⁾)を被験者の下眼瞼結膜嚢にマイクロピペット(Eppendorf 4810)で10μl滴下し、ゆっくりと数回瞬目させた後に、エキサイターフィルター(BPB-53, 富士フィルター)とバリアーフィルター(SC-58, 富士フィルター)を設置したフォトリットランプ(SC1200, 興和)で結膜上皮を観察した⁷⁾。

2) フルオレセイン(FL)染色による角膜上皮の観察

フローレス®試験紙(昭和薬品化工)にBSS PLUS®(Alcon)を1滴滴下し、被験者の下眼瞼結膜嚢に接触させ、ゆっくりと数回瞬目させた後に、細隙灯顕微鏡のブルーフィルターを用いて角膜上皮を観察した。

3) SRB染色とFL染色の評価

SRBによる結膜の障害評価は、van Bijsterveldの方法¹¹⁾に準じ、鼻側および耳側球結膜おのおのについて、点状染色がない状態を0点、散在している状態を1点、中等度に散在している状態を2点、点状染色が隣接し密に存在している状態を3点でスコア化し、計6点を満点とし、かつ、3人の眼科医が判定し、2人以上が一致するスコアを採用した。次いで、FLによる角膜の点状染色の程度は、宮田ら⁹⁾の方法に従ってarea(範囲)とdensity(密度)に分け、おのおのについて0~3点でスコア化して評価した。検定は、SRBスコアとFLスコアの相関についてはSpearman順位相関係数を用い、右眼と左眼に分けて検討した。また、各FLスコアにおけるSSとnon-SSのSRBスコアの検討にはWilcoxon検定を用いた。なお、スコア評価は、SRBについてはフォトリットランプでの観察時、FLについては細隙灯顕微鏡での観察時に行った。

III 結果

1. 健常者における検討

FLのareaスコア、densityスコアおよびSRBスコアは、すべて0であった。

2. ドライアイにおける検討

1) SSにおける角膜上皮障害と結膜上皮障害の関連

右眼、左眼とも、FLのareaスコアとSRBスコアは正の相関を示し、areaスコアが増加するに従ってSRBスコアは有意に増加した(Spearmanの順位相関係数; 右眼: $r=0.785$, $p<0.001$, 左眼: $r=0.588$, $p=0.006$)。すなわちSSでは、角膜上皮障害の範囲が広がるに従って、結膜上皮障害の程度は有意に強くなった。一方、FLのdensityスコアとSRBスコアは、左眼では正の相関を示した($r=0.621$, $p=0.004$)が、右眼には正の相関はみられなかった($r=0.210$, $p=0.361$)。

2) non-SSにおける角膜上皮障害と結膜上皮障害の関連

右眼、左眼ともFLのareaスコアとSRBスコアは正の相関を示し、areaスコアが増加するに従ってSRBスコアは有意に増加した(右眼: $r=0.644$, $p<0.001$, 左眼: $r=0.613$, $p<0.001$)。すなわち、non-SSでも角膜上皮障害の範囲が広がるに従って、結膜上皮障害の程度は有意に強くなった。また、FLのdensityスコアについては、右眼、左眼ともSRBスコアと正の相関を示し、densityスコアが増加するに従ってSRBスコアは有意に増加した(右眼: $r=0.496$, $p=0.006$, 左眼: $r=0.678$, $p<0.001$)。すなわち、non-SSでは角膜上皮障害の密度が高くなるに従って、結膜上皮障害の程度も有意に強くなった。

3) ドライアイ全体における角膜上皮障害と結膜上皮障害の関連

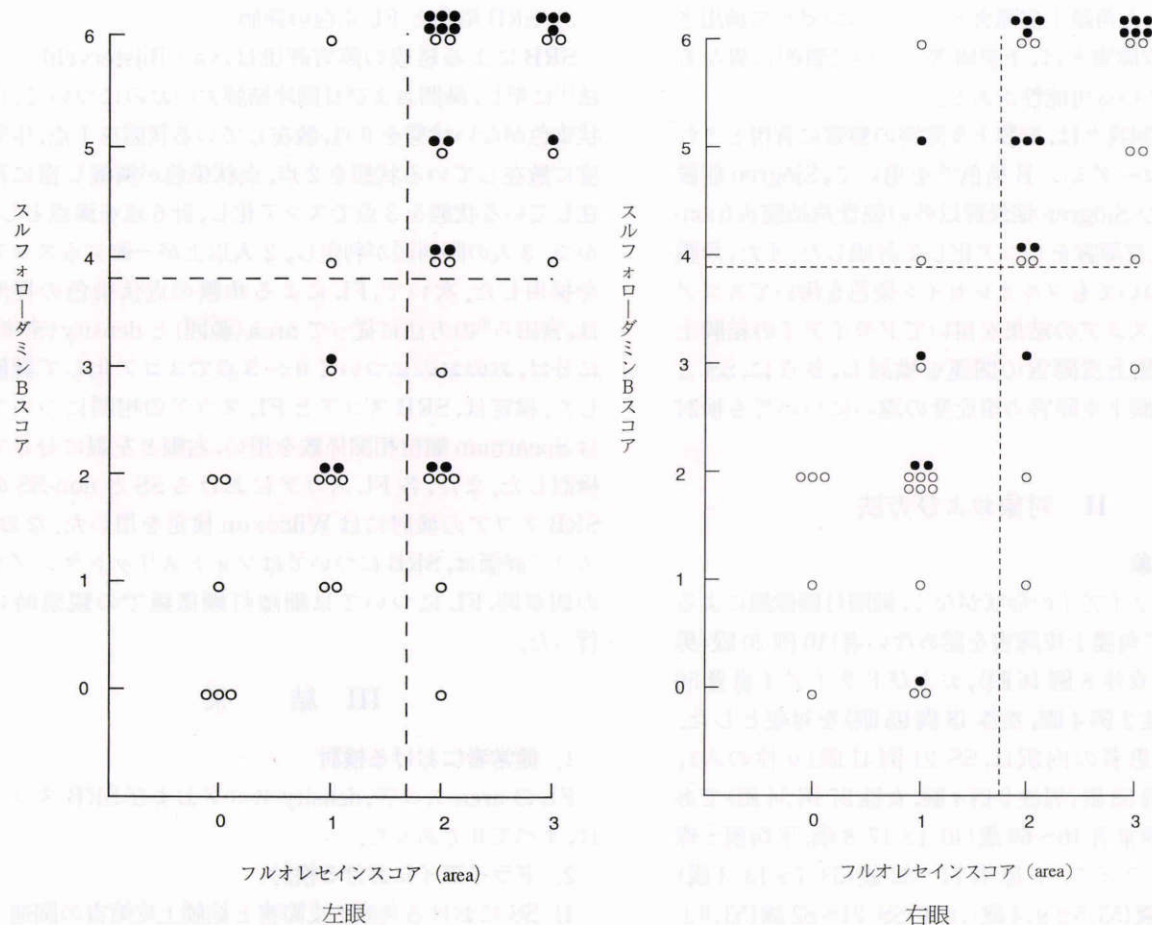


図1 FLのareaスコアとスルフォローダミン(SRB)スコアは正の相関を示し(Spearmanの順位相関係数；右眼： $r=0.723, p<0.001$,左眼： $r=0.660, p<0.001$),右眼においてareaスコア3のとき,SSのSRBスコアはNon-SSより有意に高値である($p=0.028$).

●：Sjögren症候群(SS),○：Sjögren症候群以外の乾性角結膜炎(non-SS)

ドライアイにおける角膜上皮障害と結膜上皮障害の関連(点線は順位変換後の50%点を示す).

SSとnon-SSを併せたドライアイ全体について評価した.

右眼,左眼ともFLのareaスコアとSRBスコアは正の相関を示し,areaスコアが増加するに従ってSRBスコアは有意に増加した(右眼： $r=0.723, p<0.001$,左眼： $r=0.660, p<0.001$) (図1).すなわち,ドライアイ全体では角膜上皮障害の範囲が広がるに従って結膜上皮障害の程度は有意に強くなった.また,右眼,左眼ともにFLのdensityスコアとSRBスコアも正の相関を示し,densityスコアが増加するに従ってSRBスコアは有意に増加した(右眼： $r=0.501, p<0.001$,左眼： $r=0.704, p<0.001$) (図2).すなわち,ドライアイ全体では,角膜上皮障害の密度が高くなるに従って結膜上皮障害の程度も有意に強くなった.

4) SSとnon-SSにおける結膜上皮障害の比較

右眼,左眼とも同様に角膜上皮障害と結膜上皮障害が有意に相関したことから,右眼を評価眼として採用した.

各FL areaスコアを同一水準と考え,SSとnon-SSのSRBスコア全体を比較するとSSのSRBスコアはnon-SSより有意に高かった(Wilcoxon順位和検定：

$p=0.003$).同様に,各FL densityスコアを同一水準と考え,SSとnon-SSのSRBスコア全体を比較すると,SSのSRBスコアがnon-SSより有意に高かった($p=0.002$).

さらに,FLスコアが一致するSSとnon-SSにおけるSRBスコアを比較した.FLスコアが0のときは,area,densityともにnon-SSと比較すべきSSがないために検定は不可能であった.FLのareaスコアが1および2の場合には,SSとnon-SSのSRBスコアに有意差は認められなかったが,areaスコアが3の場合にはSSのSRBスコアはnon-SSより有意に高値を示した($p=0.028$) (図1).また,densityスコアが2の場合,SSのSRBスコアはnon-SSより高値を示す傾向が認められた($p=0.070$)が,他のスコアでは,有意差は認められなかった(図2).すなわち,角膜上皮障害の範囲や密度が中等度~高度(スコア2~3)の場合,SSではnon-SSに比べ結膜上皮障害が有意に強いことが明らかとなった.

IV 考 按

ドライアイにおける眼表面上皮の評価においては,角

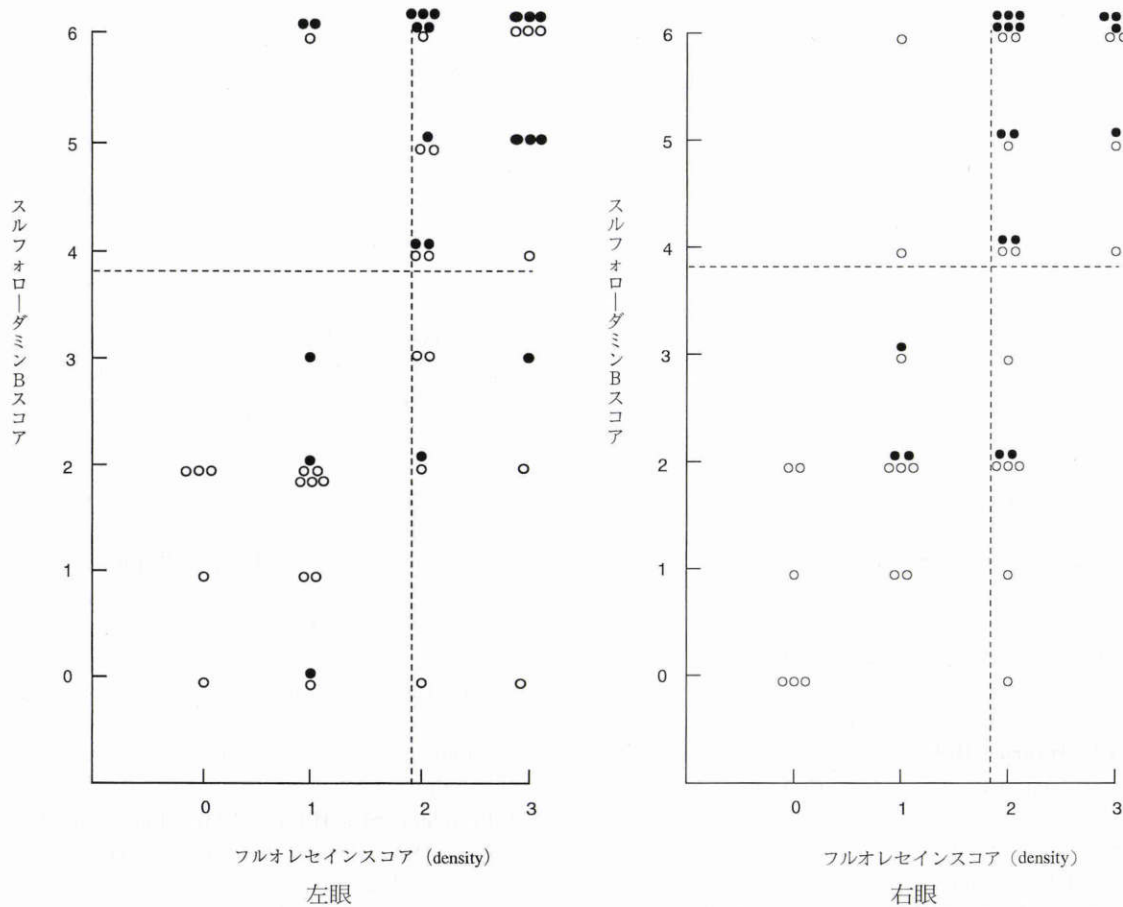


図2 FLのdensityスコアとSRBスコアは正の相関を示し(Spearmanの順位相関係数;右眼: $r=0.501, p<0.001$,左眼: $r=0.704, p<0.001$),右眼においてdensityスコア2のとき,SSのSRBスコアはNon-SSより高値を示す傾向がある($p=0.070$).

膜上皮のみならず結膜上皮の障害を評価することが重要である。臨床的な上皮障害の評価は、角膜はFL染色、結膜はローズベンガル染色を用いて行うのが一般的であるが、最近、両色素の染色性が異なるという報告²⁾がなされている。すなわち、ローズベンガルは、眼表面を被覆するムチンの状態に依存して眼表面上皮の障害を検出するため、上皮の障害部がムチンに被覆されている場合には、障害を検出できない可能性が指摘されている⁶⁾。一方、今回用いたスルフォロダミンB⁴⁷⁾(SRB)は、ローズベンガルとは異なり健常細胞を染色することはなく¹²⁾、角結膜上皮の障害部を検出すると考えられている。また、ローズベンガルで見られるような点眼時の刺激や、細胞毒性、光毒性もなく¹³⁾¹⁴⁾、油水分配係数が非常に小さい(0.0033)⁴⁾ため、細胞膜への浸透性が少ないと考えられることも、上皮障害を検出する上での利点である。さらに、涙液の交換により容易に洗い流されることも、被検者の負担が少ない点としてあげられる。

SRBのオレンジの蛍光は、角膜のように暗いバックグラウンドのもとでは観察しがたいため、今回は、角膜上皮障害の観察に有利なFL染色とSRB染色を組み合わせることにより、ドライアイにおける上皮障害の違いを角膜上皮と結膜上皮に分けて検討した。ドライアイの角結

膜上皮障害の評価においては、SRBスコアは、FLで染色される角膜上皮障害のarea(範囲)およびdensity(密度)のおおのこのスコアと有意に相関していた。つまり、ドライアイにおいては、角膜上皮障害が強くなるとそれに応じて結膜上皮の障害も増加することが明らかになった。

今回の我々の検討により、SSではnon-SSに比べて結膜上皮障害の程度が有意に高いことが明らかになった。さらに、角膜上皮障害が同程度(特に角膜上皮障害が中等度(スコア2)から高度(スコア3))の場合、SSではnon-SSに比べて結膜上皮障害の程度が高い傾向があった。Pflugfelderら¹⁵⁾は、SSとSS以外の涙液分泌減少症、眼瞼炎などの患者についてインプレッションサイトロジーを行い、SSの結膜上皮に扁平上皮化生や杯細胞の減少などが有意に観察されることを報告している。また、坪田ら¹⁶⁾は、ドライアイをSS, autoimmune positive dry eye (ADE), simple dry eye (SDE)の3つのタイプに分類し、鼻刺激 Schirmer 試験およびインプレッションサイトロジーにおいて、SSではnon-SS(ADE+SDE)に比べ、反射性涙液分泌の減少と結膜上皮の扁平上皮化生が有意に強いと報告している。これらの報告は、SSとnon-SSにおける結膜上皮障害の差異を上皮化生の面からとらえた

ものであると考えられる。今回の我々の検討によって、ドライアイにおける角膜上皮の障害と同様に、細胞の脱落に基づく結膜上皮の障害においても、SS と non-SS に差異がみられることは興味深い。

したがって、ドライアイの場合、FL で角膜上皮障害を評価するとともに、SRB を用いて結膜上皮障害の重症度を評価することが、その診断や SS と non-SS の鑑別に役立つと考えられた。

本研究の一部は、京都府医学振興会の助成金を用いて行われた。

文 献

- 1) **Lamberts DW**: Clinical Diseases of the Tear Film. The Cornea. In: Smolin G, et al (Eds): Little, Brown and Company, Boston, 457-483, 1994.
- 2) **Feenstra RPG, Tseng SCG**: Comparison of fluorescein and rose bengal staining. *Ophthalmology* 99: 605-617, 1992.
- 3) 横井桂子, 横井則彦, 小室 青, 西田幸二, 木下 茂: フルオロフォトメトリー法による結膜上皮のバリアー機能評価. *臨眼* 48: 1660-1661, 1994.
- 4) **Eliason JA, Maurice DM**: Staining of the conjunctiva and conjunctival tear film. *Br J Ophthalmol* 74: 519-552, 1990.
- 5) **Norn MS**: Vital staining of cornea and conjunctiva. *Acta Ophthalmol (Copenh)* 40: 21-23, 1962.
- 6) **Feenstra RPG, Tseng SCG**: What is actually stained by rose bengal? *Arch Ophthalmol* 110: 980-993, 1992.
- 7) 鈴木 智, 横井則彦, 木下 茂: 結膜上皮障害の評価におけるスルフォローダミンB染色とローズベンガル染色の比較. *あたらしい眼科* 12: 1905-1908, 1995.
- 8) 戸田郁子, 坪田一男: ドライアイの診断. *あたらしい眼科* 8: 1021-1027, 1991.
- 9) 宮田和典, 澤 充, 西田輝夫, 三島 弘, 宮本裕子, 大鳥利文: びまん性表層角膜炎の重症度の分類. *臨眼* 48: 183-188, 1994.
- 10) **Fox RI, Robinson CA, Curd JG, Kozin F, Howell FV**: Sjögren's syndrome proposed criteria for classification. *Arthritis Rheum* 29: 577-583, 1986.
- 11) **van Bijsterveld OP**: Diagnostic tests in sicca syndrome. *Arch Ophthalmol* 82: 10-14, 1969.
- 12) **Chodosh J, Dix RD, Howell RC, Stroop WG, Tseng SCG**: Staining characteristics and antiviral activity of sulforhodamine B and lissamine green B. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 35: 1046-1058, 1994.
- 13) **Roat MR, Romanowski E, Araullo-Cruz T, Gordon YJ**: The antiviral effects of rose bengal and fluorescein. *Arch Ophthalmol* 105: 1415-1417, 1987.
- 14) **Chodosh J, Banks M, Stroop W**: Rose bengal inhibits herpes simplex virus replication *in vivo* and human corneal epithelial cells *in vitro*. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 33: 2520-2527, 1992.
- 15) **Pflugfelder SC, Huang AJW, Feuer W, Chuchovski PT, Pereira IC, Tseng SCG**: Conjunctival cytologic features of primary Sjögren's syndrome. *Ophthalmology* 97: 985-993, 1990.
- 16) **Tsubota K, Toda I, Yagi Y, Ogawa Y, Matsumoto O, Yoshino K**: Three different types of dry eye syndrome. *Cornea* 13: 202-209, 1994.