

涙点閉鎖術後の角膜および結膜におけるローズベンガル染色についての検討

広谷 有美, 横井 則彦, 都築 祐勝, 木下 茂

京都府立医科大学眼科学教室

要 約

目的：涙点閉鎖術を施行されている重症の涙液減少型ドライアイに対してローズベンガル(RB)染色のスコア化を行い、角膜と結膜を分けて術前との比較を行った。

対象と方法：確実に涙点閉鎖術が行われている(術後角膜フルオレセイン染色スコアが AD 分類で A 0 D 0 に改善しているもの)重症ドライアイ患者 13 例 17 眼を対象とした。角膜と結膜の耳側および鼻側における RB 染色のスコア化(0, 1, 2, 3 の 4 段階)を行い、術前のスコアと比較検討した。ただし、術後の RB 染色については、眼表面の RB 濃度を術前と同程度にするために、下眼瞼涙液メニスカスの涙液をビデオメニスコメータでモニターしながら、シルマ試験紙で術前と同程度に

まで吸引し、その後 RB 染色を行った。

結果：術前後の比較において、角膜の RB 染色スコアは有意($p=0.0025$)に改善したが、鼻側および耳側球結膜では有意な改善はなかった(それぞれ $p=0.058$, $p=0.7$)。

結論：RB 染色の意味から考えると、重症涙液減少型ドライアイにおける結膜表面のムチンの被覆障害には、水分減少以外の別の要因が関与していると考えられた。(日眼会誌 107 : 719-723, 2003)

キーワード：ドライアイ, 涙点閉鎖, ローズベンガル染色, 結膜上皮障害

Comparison of Corneal and Conjunctival Rose Bengal Staining before and after Punctal Occlusion

Yumi Hirotsani, Norihiko Yokoi, Hirokatsu Tsuzuki and Shigeru Kinoshita

Department of Ophthalmology, Kyoto Prefectural University of Medicine

Abstract

Purpose : In severely tear-deficient dry eye patients whose puncta had been occluded, corneal and conjunctival rose bengal(RB) staining were graded and compared to before occlusion.

Subjects and Methods : Subjects were 17 eyes of 13 severely tear-deficient dry eye patients whose puncta had been successfully occluded (corneal fluorescein staining showed A 0 D 0 after occlusion). Corneal and conjunctival RB staining were graded 0, 1, 2 or 3, according to severity [B 1] at the cornea and at the temporal and nasal bulbar conjunctiva. The scores were then compared to those before punctal occlusion. To enable comparison of pre- and post-occlusion ocular surface concentrations of RB [B 2], post-occlusion concentration was adjusted by absorbing tears from the conjunctival sac with Schirmer's test paper until the lower meniscus height was equal to that before occlusion,

as monitored by video-meniscometer. RB dye was then instilled into the patients conjunctival sac.

Results : RB staining score at the cornea decreased significantly ; in contrast, no significant improvement was found at the nasal and temporal conjunctiva ($p=0.0025$, $p=0.05$, $p=0.7$, respectively, Wilcoxon test).

Conclusion : In accordance with the basic interpretation of RB staining, these results imply that RB positive staining [B 3] on the conjunctival surface is caused by a factor other than aqueous deficiency.

Nippon Ganka Gakkai Zasshi (J Jpn Ophthalmol Soc 107 : 719-723, 2003)

Key words : Dry eye, Punctal occlusion, Rose bengal, Conjunctival epithelial damage

別刷請求先：602-0841 京都市上京区河原町広小路上ル梶井町 465 京都府立医科大学眼科学教室 横井 則彦
(平成 14 年 8 月 31 日受付, 平成 15 年 4 月 17 日改訂受理)

Reprint requests to : Norihiko Yokoi, M. D., Ph. D. Department of Ophthalmology, Kyoto Prefectural University of Medicine, 465 Kajicho, Hirokoji-agaru, Kawaramachi-dori, Kamigyoku, Kyoto 602-0841, Japan
(Received August 31, 2002 and accepted in revised form April 17, 2003)

I 緒 言

Sjögren 症候群をはじめとする涙液減少型重症ドライアイの角結膜は、フルオレセイン染色やローズベンガル (RB) 染色により高度に染色される。最近の報告では、RB 染色は上皮の障害部位そのものを検出するのではなく、ムチンに被覆されていない部位を検出している^{1)~3)}可能性が示されており、ドライアイのスクリーニングに有用な方法として広く用いられている。涙点閉鎖術前後の RB 染色の改善については、これまで多くの報告^{4)~10)}がみられ、いずれも RB 染色スコア (van Bijsterveld 分類¹¹⁾における角膜および結膜の合計スコア) は著明に改善するとしている。しかし、これまでの報告における術後 RB 染色スコアの評価には問題点がある。すなわち、RB 染色には染色性が濃度に依存する¹²⁾可能性があることである。特に、涙点閉鎖術後には人工涙液が貯留しているため、RB 濃度が低下しやすく、スコアは過小評価されやすい。つまり、術前・術後における眼表面の RB 濃度が異なると、その染色スコアの改善度の評価に誤りが生じる可能性がある。そこで今回、我々は涙点閉鎖術を施行されている重症の涙液減少型ドライアイに対して、眼表面の RB 濃度を術前と同程度になるよう調整して RB 染色を行い、角膜と結膜を分けて術前との比較を行い、興味深い知見を得たので報告する。

II 対象および方法

1. 対 象

上下の涙点閉鎖術 (外科的涙点閉鎖術または涙点プラグ挿入術) を施行されているドライアイ外来患者 13 例 17 眼で、性別はすべて女性であった。涙点閉鎖術施行前のドライアイの診断は、本邦のドライアイ研究会による診断基準¹³⁾に基づいて行い、涙点閉鎖術の適応は既報のごとく¹⁴⁾¹⁵⁾、ドライアイ観察装置 DR-1[®] (興和社製) による涙液油層観察像の Grade 分類¹⁶⁾で Grade 5 (角膜中央の直径 2 mm 径の観察領域において角膜上皮の少なくとも一部が涙液に覆われていない)、および点状表層角膜症の程度がフルオレセイン染色による AD 分類¹⁶⁾¹⁷⁾ (A: 範囲 area, D: 密度 density, それぞれ 0, 1, 2, 3 の 4 段階で評価) で A 2 D 2 以上の 2 つとした。背景疾患としては、Sjögren 症候群 11 例 15 眼 (一次性 5 例 9 眼, 二次性 6 例 6 眼)、Sjögren 症候群以外の涙液減少型ドライアイ 2 例 2 眼であった。ただし、Sjögren 症候群の診断は、Fox の診断基準¹⁸⁾に基づいて行った。年齢は 63.8 ± 6.2 (平均値 \pm 標準偏差) 歳、涙点閉鎖術後の平均観察期間は 16.1 ± 17.4 (平均値 \pm 標準偏差) か月であった。ただし、対象は、角膜染色スコアの AD 分類で、術後、A 0 D 0 に改善しており、涙点閉鎖の効果が十分に得られているものに限った。

2. 方 法

1) 涙点閉鎖術後の RB 染色の調整

我々は涙点閉鎖術後の下眼瞼涙液メニスカスの曲率半径 (眼表面全体の涙液量と相関する) が術前と同程度になるように、ビデオメニスコメータ¹⁹⁾²⁰⁾を用いて調整した。まず、対象に 0.4% 塩酸オキシブプロカイン (ペノキシール[®], 参天製薬) を点眼後、シルマ試験紙 (昭和薬品化工) を用いて、結膜に触れないように結膜嚢内の涙液を吸引した。この際、ビデオメニスコメータのモニター画像を見ながら、涙液メニスカスにおける格子像が術前と同程度 (すなわち、格子の幅がほぼ確認できなくなるまで) 涙液の吸引を続けた (図 1)。ただし、点眼麻酔時と吸引時に結膜に触れないようにすることで反射性涙液分泌を抑えたが、それでもなお、反射性分泌が生じるものに関しては、今回の対象から除外した。つまり、同程度の高さの涙液メニスカスが得られた例に限り、1% RB 染色液を結膜嚢内に 2 μ l 滴下し、数回瞬目させた後、細隙灯顕微鏡下で RB 染色スコアを評価した。なお、術前の RB 染色についても同様に 0.4% 塩酸オキシブプロカインを点眼後、十分に (10 分以上) 時間が経過してから染色を行った。

2) RB 染色のスコア化と涙点閉鎖術前・後の比較検討

RB 染色のスコア化に関しては、角膜、鼻側結膜、耳側結膜の 3 領域において、van Bijsterveld¹¹⁾の方法に準じ、0~3 点のスコア化 (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) を行って、それぞれの領域において、術前・後のスコアを比較検討した (Wilcoxon 符号順位検定)。なお、術前の RB 染色も 1%, 2 μ l の RB 染色液を滴下し、同様のスコア化を行った。

III 結 果

1. 角膜における涙点閉鎖術前・後の RB 染色スコアの比較 (図 2)

術後の RB 染色スコアは 1 点以下のものが 17 眼中 14 眼 (82%) であり、術後角膜の RB 染色スコアは低かった。また、RB 染色スコアの術後の改善が 17 眼中 12 眼 (71%) にみられ、術後の RB 染色スコアは術前に比べて有意に改善していた ($p=0.0025$)。

2. 鼻側結膜における涙点閉鎖術前・後の RB 染色スコアの比較 (図 3)

術後の RB 染色スコアが 2 点以上のものが 17 眼中 12 眼 (71%) あった。また、術前に比べ術後 RB 染色スコアが悪化したものが 2 例、不変のものが 8 例、改善したものが 7 例あり、術後 RB 染色スコアには改善傾向はあったものの、5% の有意水準で統計学的に有意な改善はみられなかった ($p=0.058$)。

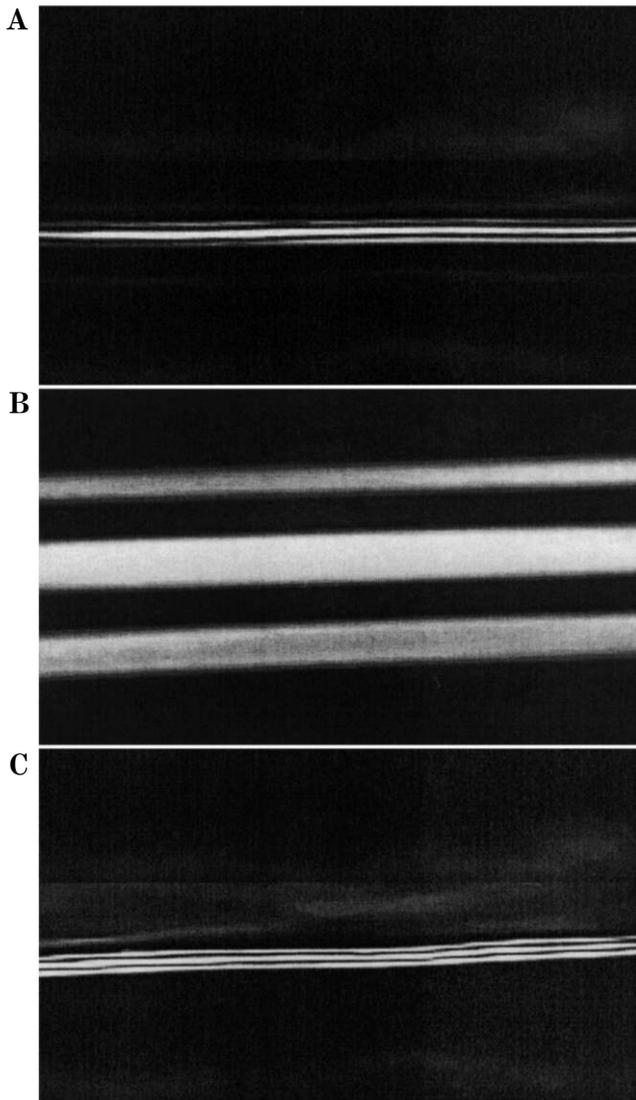


図 1 ビデオメンスコメータを用いた下眼瞼涙液メニスカスにおける涙液貯留量(格子像)の調整.

- A: 涙点閉鎖術前の涙液メニスカスの格子像
- B: 涙点閉鎖術後の涙液メニスカスの格子像
- C: シルマ試験紙を用いて涙液吸引後の涙液メニスカスの格子像

涙点閉鎖後は格子像の線幅が大きくなっており、涙点閉鎖前と比べて涙液貯留量が多くなっていることがわかる(A, B). シルマ試験紙を用いて涙液を吸引することにより、格子像の線幅を術前と同程度(涙液貯留量を同程度)にすることができる(A, C).

3. 耳側結膜における涙点閉鎖術前・後の RB 染色スコア(図 4)

術後の RB 染色スコアが 2 点以上のものが 17 眼中 11 眼(65%)であった。また、術前に比べ術後に RB 染色スコアが悪化したものが 5 例、不変のものが 8 例、改善したものが 4 例あり、術後 RB 染色スコアに有意な改善はみられなかった(p=0.7)。

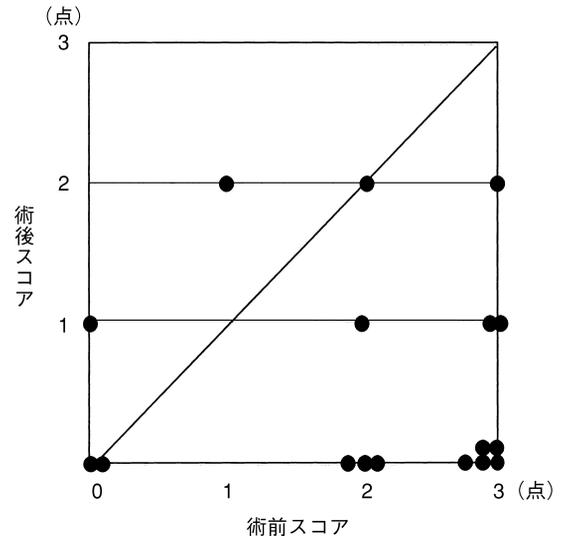


図 2 角膜における涙点閉鎖術前・後のローズベンガル(RB)染色スコアの比較.

17 眼中 12 眼において RB 染色スコアは改善し、術後 RB 染色スコアは有意に改善した(p=0.0025)。

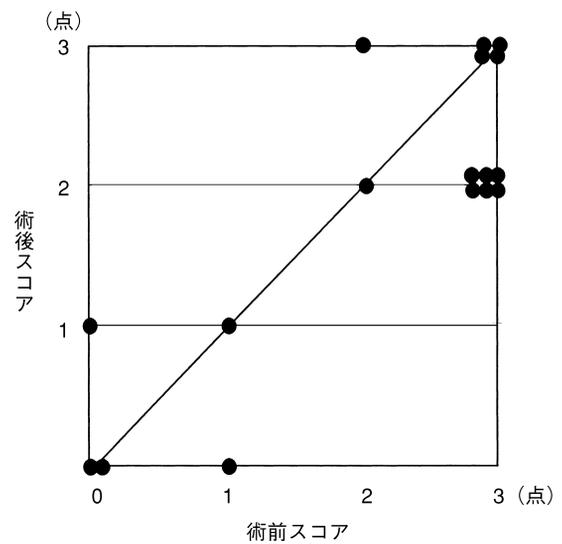


図 3 鼻側結膜における涙点閉鎖術前・後の RB 染色スコアの比較.

術後 RB 染色スコアが悪化したもの 2 例、不変のものが 8 例あり、術後の RB 染色スコアに有意な改善はなかった(p=0.058)。

IV 考 按

Sjögren 症候群などの重症の涙液減少型ドライアイでは、点眼治療のみでは症状や角膜上皮障害に改善が得られず、涙点プラグを含む涙点閉鎖術が施行される場合が多い。そして、確実に涙点閉鎖術が施行されれば、早期に角膜上皮障害(角膜フルオレセイン染色)は改善し、患者の自覚症状も大幅に改善する。今回は、ドライアイの眼表面の検査として非常によく用いられている RB 染色を用い、その染色スコアを指標として、涙点閉鎖術後の

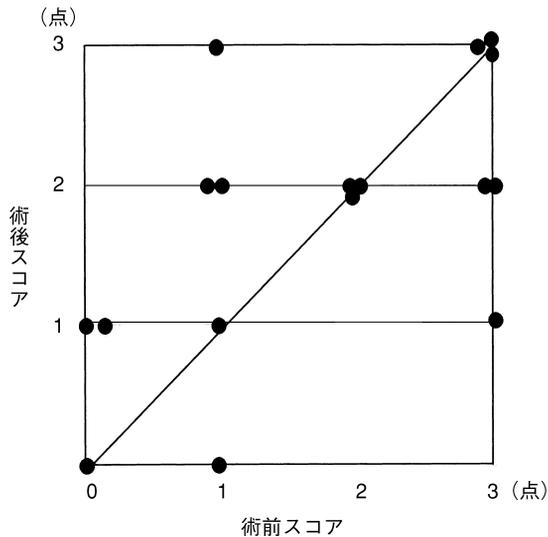


図4 耳側結膜における涙点閉鎖術前・後のRB染色スコアの比較。

術後RB染色スコアが悪化したものが5例，不変のものが8例あり，術後のRB染色スコアに有意な改善はなかった($p=0.7$)。

結膜上皮における障害の評価を行った。RB染色は，古くは角結膜上皮の変性細胞を染色する²¹⁾と考えられた時期もあったが，最近では，結膜上皮障害部位そのものを検出しているのではなく，ムチンの被覆障害部位を検出していると考えられている^{1)~3)}。すなわち，RBは眼表面上皮がムチンの被覆を失っていれば，正常細胞をも染色し，健常眼において，RB染色がみられないのは上皮細胞表面がムチン層で被覆されているためである^{1)~3)}と考えられている。

これまで，涙点閉鎖術後のRB染色スコア(角膜および結膜のスコアの合計)の改善を述べた報告はあるが，いずれも術後RB染色スコアは有意に改善したと報告^{4)~10)}されている。しかし，ここで問題になるのは，涙点閉鎖術後のRB染色の方法である。Norn¹²⁾はRB染色では，RBの濃度に依存して高濃度では染色性が増強することを指摘している。また，RBは光によって増強される細胞毒性¹⁾を有することが知られており，このことは，RBの濃度が増加すれば，細胞毒性が増強して上皮の染色性が増す可能性があることを意味していると考えられる。さらに，涙液中の一部の蛋白とRBが結合すれば，その染色性は失われるとされており²³⁾，このこともまた，涙液のRB濃度によってその染色性が影響を受ける可能性を推定していると考えられる。このように，涙液中のRB濃度によって，角結膜におけるRBの染色性が変化する可能性が考えられるため，涙点閉鎖術前・後においてRB染色の比較検討を行う場合には，術前・後の涙液中RB濃度をできる限り同程度にする必要があると考えられる。そこで今回，我々は涙点閉鎖術前・後

において，涙液中のRB濃度をほぼ同程度になるようにメニスコメトリー法を用いて調査し，比較検討を行った。

今回，我々は対象として，涙点閉鎖の効果十分に得られている，つまり，術後，涙液，あるいは人工涙液が十分に眼表面に貯留しているものに限って検討を行い，角膜はこれまでの報告と同様，涙点閉鎖術後，RB染色スコアは著明に改善していたが，結膜においては鼻側，耳側ともに，統計学的に有意な改善が術後にみられないことを見出した。ここで，眼表面のRBの染色性をムチンに置き換えて考えてみると，ムチンには2つのタイプが存在すると考えられており，角結膜上皮の表層細胞表面に表現されている膜貫通型ムチンと杯細胞から産生され，涙液中でゲルを形成する分泌型ムチンの存在が知られている^{22)~25)}。そして，膜貫通型ムチンと分泌型ムチンの陰性荷電同士が反発し合いながら，全体として眼表面をコートしている構造をとるモデルが想定されている。したがって，眼表面の表層細胞が障害されている場合は，その部位で膜貫通型ムチンが欠如し，分泌型ムチンがうまくその上を被覆できずに，眼表面がRBで染色されるのではないかと考えられる。つまり，今回のRB染色の染色結果から考えると，涙点閉鎖後，涙液あるいは人工涙液が眼表面に十分に貯留し，水分が十分に得られるようになると，角膜上皮においては膜貫通型ムチンの正常化が得られ，その上を分泌型ムチンが被覆する結果，RB染色の著明な改善が得られたのではないかと考えられる。しかし，結膜上皮においては涙点閉鎖後，水分減少が解消しても膜貫通型ムチンが発現されなかったため，分泌型ムチンによる被覆が得られず，RB染色に有意な改善が得られなかったのではないかと考えられた。つまり，結膜上皮においては水分以外の別の因子が結膜における膜貫通型ムチンの発現に関与していると考えられる。

また，non Sjögren症候群の症例が2例と少なかったため，Sjögren症候群の症例と比較できなかったが，今回得られた結果が，Sjögren症候群に限られているかは重要な検討課題であると考えている。

今回，我々は結膜障害部位を検出するために，ドライアイの最も一般的な染色液であるRB染色を用いたが，今回の検討から，涙点閉鎖によって角膜上皮障害が完璧に治癒しても重症の涙液減少型ドライアイとしての特徴—結膜上皮障害が角膜上皮障害よりも優位に検出される²⁶⁾—がみられたことは注目すべき点である。このことは，近年注目されているドライアイにおける結膜の炎症の関与を含め，今後の検討課題であると考えられる。さらに今後，スルフォローダミンB染色²⁷⁾²⁸⁾を用いて結膜上皮障害そのものを評価し，その涙点閉鎖後の改善についても検討していきたいと考えている。

文 献

- 1) **Feensta RPG, Tseng SCG** : What is actually stained by rose bengal? *Arch Ophthalmol* 110 : 980—993, 1992.
- 2) **Thang SH, Tseng SCG** : Interactions between rose bengal(RB) and tear components. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 35(Suppl) : 1286, 1992.
- 3) **Tseng SCG, Zhang SH** : Interaction between rose bengal and different protein components. *Cornea* 14 : 427—435, 1995.
- 4) 佐藤寛子, 高田葉子, 小室 青, 横井則彦, 木下 茂 : 重症ドライアイに対する涙点プラグ挿入術の検討. *あたらしい眼科* 16 : 843—846, 1999.
- 5) 楊 浩勇, 五十嵐翔, 後藤英樹, 小野眞史, 篠崎和美, 高村悦子, 他 : 新型シリコン涙点プラグによるドライアイの治療. *あたらしい眼科* 14 : 1825—1830, 1997.
- 6) 若林俊子, 小西美奈子, 野田 徹, 小川葉子, 山田昌和, 真島行彦 : 重症ドライアイにおける涙点プラグの有用性. *眼紀* 52 : 257—260, 2001.
- 7) **Fayet B, Bernard JA, Ammar J, Karpouzas I, Taylor Y, Abenhaim A** : Treatment of dry eye by temporary punctum plug. Comparison with a control group. *J Fr Ophthalmol* 13 : 123—133, 1990.
- 8) **Willis RM, Folberg R, Krachmer JH, Holland EJ** : The treatment of aqueous deficient dry eye with removable punctal plugs. *Ophthalmology* 94 : 514—518, 1987.
- 9) **Guzey M, Ozardali I, Kilic A, Basar E, Dogan Z, Satici A, et al** : The treatment of severe trachomatous dry eye with canalicular silicone plugs. *Eye* 15 : 297—303, 2001.
- 10) **Gilbard JP, Rossi SR, Azar DT, Heyda KG** : Effect of punctal occlusion by Freeman silicone plug insertion on tear osmolarity in dry eye disorders. *CLAO J* 15 : 216—218, 1989.
- 11) **van Bijsterveld OP** : Diagnostic tests in sicca syndrome. *Arch Ophthalmol* 82 : 10—14, 1969.
- 12) **Norn MS** : Rose bengal vital staining. Staining of cornea and conjunctiva by 10% rose bengal, compared with 1% . *Acta Ophthalmol Scand* 48 : 546—559, 1970.
- 13) 島崎 潤, 大橋裕一, 木下 茂 : ドライアイの定義と診断基準. *眼科* 37 : 765—770, 1995.
- 14) 小嶋健太郎, 横井則彦, 中村 葉, 高田葉子, 佐藤寛子, 小室 青, 他 : 重症ドライアイに対する涙点プラグの治療成績. *日眼会誌* 106 : 360—364, 2002.
- 15) 西井正和, 横井則彦, 小室 青, 木下 茂 : 涙点プラグの違いによる脱落率の検討. *日眼会誌* 107 : 322—325, 2003.
- 16) **Yokoi N, Takehisa Y, Kinoshita S** : Correlation of tear lipid layer interference patterns with the diagnosis and severity of dry eye. *Am J Ophthalmol* 122 : 818—824, 1996.
- 17) 宮田和典, 澤 充, 西田輝夫, 三島 弘, 宮本祐子, 大島利文 : びまん性表層角膜炎の重症度の分類. *臨眼* 48 : 183—188, 1994.
- 18) **Fon RI, Robinson CA, Curs JG, Kozin F, Howell FV** : Sjögren's syndrome ; Proposed criteria for classification. *Arthritis Rheum* 29 : 577—585, 1986.
- 19) **Yokoi N, Bron A, Tiffany J, Brown N, Hsuan J, Fowler C** : Reflective meniscometry : A non-invasive method to measure tear meniscus curvature. *Br J Ophthalmol* 83 : 92—97, 1999.
- 20) **Oguz H, Yokoi N, Kinoshita S** : The height and radius of the tear meniscus and methods for examining these parameters. *Cornea* 19 : 497—500, 2000.
- 21) **Norn MS** : Vital staining of cornea and conjunctiva. *Acta Ophthalmol(Copenh)* 40 : 21—23, 1962.
- 22) **Watanabe H, Fabricant M, Tisdale AS, Spurr-Michaud SJ, Lindberg K, Gipson IK** : Human corneal and conjunctival epithelia produce a mucin-like glycoprotein for the apical surface. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 36 : 337—344, 1995.
- 23) **Watanabe H, Maeda N, Kiritoshi A, Hamano T, Tano Y** : Expression of a mucin-like glycoprotein produced by ocular surface epithelium in normal and keratinized cells. *Am J Ophthalmol* 124 : 751—757, 1997.
- 24) **Inatomi T, Spurr-MS, Tisdale AS, Zhan Q, Feldman ST, Gipson IK** : Human corneal and conjunctival epithelia express MUC1 mucin. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 36 : 1816—1827, 1995.
- 25) **Inatomi T, Spurr-MS, Tisdale AS, Gipson IK** : Expression of secretory mucin genes by human conjunctival epithelia. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 36 : 1684—1692, 1996.
- 26) **Yokoi N, Kinoshita S** : Importance of conjunctival epithelial evaluation in the diagnostic differentiation of dry eye from drug-induced epithelial keratopathy. In : Sullivan DA(Ed) : *Lacrimal gland, tear film, dry eye syndromes 2*. Plenum Press, New York, 827—830, 1998.
- 27) 鈴木 智, 横井則彦, 武久葉子, 小室 青, 木下 茂 : ドライアイにおける結膜上皮障害の検討. *日眼会誌* 101 : 52—56, 1997.
- 28) 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.