

2008/20/0A
2008/20/0B

厚生労働科学研究費補助金
医療機器開発推進研究事業

ナノメディシン分野における
難治性眼表面疾患による涙液障害に対する
超微細画像技術（ナノレベルイメージング）
を応用した涙液再生治療法の開発

平成 20 年度 総括・分担研究報告書

平成 18～20 年度 総合研究報告書

研究代表者 後藤 英樹

平成 21 (2009) 年 3 月

厚生労働科学研究費補助金
医療機器開発推進研究事業

ナノメディシン分野における
難治性眼表面疾患による涙液障害に対する
超微細画像技術（ナノレベルイメージング）
を応用した涙液再生治療法の開発

平成18年度～20年度 総合研究報告書

研究代表者 後藤 英樹

平成21（2009）年 3月

目 次

I. 総合研究報告書

ナノメディシン分野における難治性眼表面疾患による涙液障害に対する超微細画像技術（
ナノレベルイメージング）を応用した涙液再生治療法の開発

-----1

後藤英樹

II. 研究成果の刊行に関する一覧表-----13

III. 研究成果の刊行物・別刷-----14

厚生労働科学研究費補助金（医療機器開発推進研究事業）
（総合）研究報告書

ナノメディシン分野における難治性眼表面疾患による涙液障害に対する超微細
画像技術（ナノレベルイメージング）を応用した涙液再生治療法の開発

研究代表者 後藤英樹 鶴見大学歯学部准教授

研究要旨

現在日本のドライアイ患者数は全国で約2200万人といわれ、なかでもシェーグレン症候群・慢性スチーブンスジョンソン症候群に伴うドライアイは視覚障害を伴う難治性眼表面疾患であり、早急な治療法の確立が必要とされている。健常な涙液は油層・水層・ムチン層の三層構造により眼表面を湿潤しているが、その解剖生理、または病理を臨床的に評価する方法は確立していない。本研究ではこれら既存の治療で治癒しない患者の治療の為、涙液油層薄膜・水層薄膜の評価及びその欠乏に対しての治療、すなわち健常な涙液構造の再生による難治性眼表面疾患の治療を目指した。具体的には下記の研究項目を検討した。

1. 眼表面湿潤度定量システムの開発

1-1) 非侵襲的涙液貯留量測定法interference meniscometryの開発

1-2) 涙液水層厚み定量測定システムの構築

1-3) 涙液油層と涙液蒸発率の同時測定、関連調査

1-4) ナノメーターレベル生体薄膜の定量評価:L*a*b*3次元表色系を応用した白色光涙液油層薄膜干渉像からの薄膜厚みtopographyの作成

2. 涙液水層再建治療の研究

2-1) 涙液水層治療としての成功率のより高い涙点閉鎖術の開発

2-2) 涙液水層再建治療合併症の克服及び涙道内視鏡を用いた涙道再建法の研究

3. 涙液油層再生治療の研究

3-1) 涙液油層再生治療による涙液蒸発率抑制の研究

3-2) 安全で効果的な油性点眼投与法の開発（重症ドライアイ患者への油層治療の臨床応用）

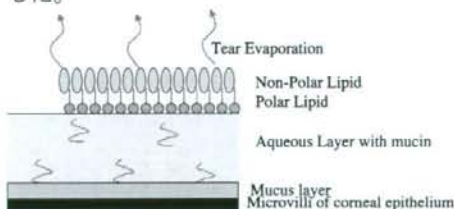
結論としては、上記の1. 眼表面湿潤度定量システムの開発、2. 涙液水層再建治療の研究、3. 涙液油層再生治療の研究、を行いよい結果を得た。当該研究では現在臨床的に用いられていないが、重症ドライアイに伴う難治性眼表面疾患の病態評価の為に重要であると考えた涙液水層および涙液油層の評価装置を開発した。これらの知見をもとに涙液水層再建治療を進展させ、また涙液油層の再生治療を開発した。これらの方法は疾患メカニズムの明らかでなかった難治性眼表面疾患の病態を評価し、欠乏する涙液要素を適正に補うことによって、今後重症ドライアイ患者の治療、すなわち眼表面湿潤に貢献することが期待される。

研究分担者

坪田一男 慶應義塾大学医学部教授
村戸ドール 慶應義塾大学医学部准教授

A. 研究目的

現代は視覚情報化社会といわれており、テレビやコンピューターなどの普及により、眼を酷使する機会が増えており視覚障害があると生活、経済活動に多大な支障をきたす。ドライアイ患者数は年々増大しており、その総数は全国で約2200万人と報告されている。そのなかでもシェーグレン症候群、スチーブンスジョンソン症候群に伴うドライアイは難治性眼疾患であり、早急な治療法の確立が必要とされている。健全な涙液は油層・水層・ムチン層の三層構造により眼表面を湿潤しているが、その解剖生理、または病理を臨床的に評価する方法は確立していない。本研究では、既存の治療で治癒しないこれらの患者治療の為、涙液油層薄膜・水層薄膜の評価及びその欠乏に対する治療、すなわち健全な涙液構造の再生による難治性眼表面疾患の治療を目指す。申請者は以前よりnanometer-level薄膜である涙液油層厚み定量に取り組んできており、一定の成果をあげてきている(Goto et al, IOVS, 2003)。また油層再生治療としても、極性をもった硬化ひまし油を用いた油性点眼の開発を行っており(Goto et al, Ophthalmology, 2002)、これらをさらに発展させて、難治性眼表面疾患の診療に貢献できるよう、本研究を行った。分担する研究項目としては後藤が実験計画の立案、臨床研究、坪田および村戸が臨床研究を担当した。



(流れ図、現在考えられている涙液微細構造涙液三層構造モデル(表面から油層、水層、ムチン層)と涙液油層の二層構造モデル(表面から疎水性脂質層、親水性脂質層)この構造で涙液蒸発を制御している。眼科

臨床でこのような解剖生理、または病理を評価できるようにし、また欠乏している成分があれば生理的な条件に近いように補充し眼湿潤を保ち視機能に貢献するのが本研究の目的である。)

B. 研究方法

今研究の内容を下記の如く3つに大別し(1. 眼表面湿潤度定量システムの開発、2. 涙液水層再建治療の研究、3. 涙液油層再生治療の研究)、研究方法につき記す。

1. 眼表面湿潤度定量システムの開発

1-1) 非侵襲的涙液貯留量測定法interference meniscometryの開発

(1) 涙液干渉デバイスを用いた非侵襲的涙液メニスカス高測定: 涙液メニスカスを非侵襲的に可視化する為に涙液干渉デバイス(Tearscope plus®, Keeler, UK)が使用された。この涙液干渉デバイスを眼科用細隙灯顕微鏡に設置し写真取り込みを行った。非侵襲的涙液メニスカスイメージはデジタル取り込みされ、Image J画像解析ソフト(the National Institutes of Health, USA, Bethesda, MD)にてその高さが定量された。まず、今回の新しい方法であるNI-TMHと既存の方法であるf-TMHとの関連が調べられた(16例31眼)。NI-TMHは 0.20 ± 0.09 mm、f-TMHは 0.26 ± 0.11 mmであり、有意な相関が見られた ($r = 0.79, P < 0.0001$)。

(2) 対象: 正常対象群(n1群)17例28眼およびシェーグレン症候群にともなうドライアイ患者(SS群)27例46眼。シェーグレン症候群の診断基準はFoxらの報告を用い、ドライアイの診断基準(および涙液分泌量低下:ATDの判断基準)は1995年我国のドライアイ研究会のものを用いた。

(3) NI-TMH測定および眼表面所見評価: NI-TMH測定およびフルオレセイン角膜染色スコア計測、ローズベンガル角結膜染色スコア計測、涙液層破壊時間測定、シルマーテストを施行した。

(4) 統計解析: 2群間でMann-Whitney U-testを施行。 $P < 0.05$ をもって統計学的に有意と判断された。Graphpad Instat 3.0(Graphpad Software, Inc., San Diego, CA)を統計解析ソフトとして使用した。

1-2) 涙液水層厚み定量測定システムの構築

(1) 対象：健常人(n1群)14例28眼および涙液分泌低下型ドライアイ(DE群)27例49眼とした。また、DE群9例13眼においてドライアイ治療のため涙点閉鎖術を施行し前後を比較した。ドライアイの診断基準(および涙液分泌量低下:ATDの判断基準)は1995年我国のドライアイ研究会のものを用いた。

(2) 涙液層厚み測定：工業用薄膜厚み測定装置(Quore 1100および1000, マミヤOP, さいたま)をカスタマイズして使用。白色光源の強度が人体への侵襲となるが、眼底鏡など他の承認済み眼科用医療機器と比較し同程度以下のパワーであることを確認した。測定は3回の瞬目後、5秒開眼したタイミングで行われた。

(3) 眼表面所見評価：フルオレセイン角膜染色スコア、ローズベンガル角結膜染色スコア、涙液層破壊時間測定、シルマーテストを施行した。

(4) 涙液層厚みとほかのパラメーターの間での相関関係を調べた。

(5) 統計解析：2群間の比較ではMann-Whitney U -testを施行し、また従来の検査法との相関関係は、Spearmanの順位相関係数の検定を用いた。 $P < 0.05$ をもって統計学的に有意であると判断された。Graphpad Instat 3.0 (Graphpad Software, Inc., San Diego, CA)を統計解析ソフトとして使用した。

1-3) 涙液油層と涙液蒸発率の同時測定、関連調査

(1) 対象：SS ATD群 21例24眼、non-SS ATD群 12例21眼。シェーグレン症候群の診断基準はFoxらの報告を用い、ドライアイの診断基準(および涙液分泌量低下:ATDの判断基準)は1995年我国のドライアイ研究会のものを用いた。

(2) 涙液蒸発量測定：我々が花王株式会社と共同開発し2003年に報告した涙液蒸発量計を使用した。

(3) 涙液油層評価：興和社製ドライアイ観察装置DR-1を使用。当初のデータはデジタルプリンターにプリントアウトしたものを横井の重症度グレーディングシステムにて評価。最近のデータは我々の報告した画像非圧縮取り込みシステムにより取得し、

涙液油層薄膜厚み解析を行った。

(4) 眼表面所見評価：フルオレセイン角膜染色スコア、ローズベンガル角結膜染色スコア、涙液層破壊時間測定、シルマーテスト、マイボーム腺脂質圧出度判定を施行した。

(5) 統計解析：2群間でMann-Whitney U -testを施行。 $P < 0.05$ をもって統計学的に有意と判断された。Graphpad Instat 3.0 (Graphpad Software, Inc., San Diego, CA)を統計解析ソフトとして使用した。

1-4) ナノメーターレベル生体薄膜の定量評価:L*a*b*3次元表色系を応用した白色光涙液油層薄膜干渉像からの薄膜厚みtopographyの作成

DR-1涙液油層干渉像観察装置を使用し、ヒト涙液を観察した。干渉像はパーソナルコンピューターに取り込まれ、色解析を行った。色解析の手順を以下に示す。

(1) 画像色分解より各ピクセルの色成分抽出、

(2) sRGBよりRGBへの変換、

(3) RGBよりXYZ表色系への座標変換、

(4) XYZ表色系よりL*a*b*色度空間座標変換。一方、基準厚みから色度空間への変換を行い、両者を校正し薄膜厚みを算出した。この計算を涙液干渉像全ピクセルにおいて行い、直径約8mm、640 x 480 pixelの涙液画像の評価を行った。

2. 涙液水層再建治療の研究

2-1) 涙液水層治療としての成功率のより高い涙点閉鎖術の開発

(1) 対象は、難治性眼表面疾患による涙液障害に伴う重症ドライアイ患者28名44眼70涙点(年齢68.2±8.76歳, 男性 2例, 女性 26例、シェーグレン症候群患者16例26眼、眼類天疱瘡6例8眼)である。シェーグレン症候群の診断基準はFoxらの報告を用い、ドライアイの診断基準(および涙液分泌量低下:ATDの判断基準)は1995年我国のドライアイ研究会のものを用いた。

(2) 涙点閉鎖術には、新型コーテリ(OPT II V)を用いた。本器具先端の表面温度を赤外線温度計で測定したところ、従来型(54℃)に比べ高温(105℃)であった。

(3) 閉鎖術前後の評価項目は、矯正視力(LogMAR値)、フルオレセイン角膜染色、ローズベンガル角結膜染色、涙液層破壊時間測定(BUT)、シルマーテスト値とした。

(4) 統計解析は、閉鎖術前後の2群間でWilcoxon signed rank testを施行した。 $P < 0.05$ をもって統計学的に有意と判断された。Graphpad Instat 3.0 (Graphpad Software, Inc., San Diego, CA)を、統計解析ソフトとして使用した。

2-2) 涙液水層再建治療合併症の克服及び涙道内視鏡を用いた涙道再建法の研究

(1) 迷入涙点プラグの探索：涙点プラグ挿入術を施行された後に正常に挿入されていた涙点プラグが経過中に行方不明となり涙小管炎を発症し、プラグの涙小管への迷入が疑われたドライアイ患者6例7眼10涙点に対して涙点プラグの所在の探索を行った。方法としては画像診断が考えられるが撮像されない素材であるため手術的な直接探索を行った。創部が極小であるため創部拡大の為に中村氏式釣り針鉤を使用した。

(2) 上記の方法は良い方法であるが患者侵襲がやや大きいという欠点があった。そのため更なる低侵襲治療法を模索し涙道内視鏡を使用する迷入涙点プラグ探索法を考案した。涙道内視鏡はファイバーテック社製直径0.9mmのベントタイプを使用した。まず既知の下記の方法を施行した。

(2-1) 涙道内視鏡直接穿破法(Direct endoscopic probing, DEP)

(2-2) シース誘導内視鏡下穿破法(Sheath-guided endoscopic probing, SEP)

(2-3) 涙囊鼻腔吻合術下鼻道法(DCR下鼻道法)

(2-4) シース誘導チューブ挿入法(Sheath-guided intubation, SGI)

(2-5) これらの術式で満足いく結果を得たが一般眼科医には垣根の高い方法であるとの印象を得たため、内視鏡操作、鼻腔内操作の更なる低減をはかる為にシースを涙点より抜去する方法を開発した(SGI涙点法)。

3. 涙液油層再生治療の研究

3-1) 涙液油層再生治療による涙液蒸発率抑制の研究

(1) 対象は、正常対象群(NL群)17例32眼およびソフトコンタクトレンズ装着群(SCL群)4例7眼、ドライアイ患者群(DE群)7例13眼である。ドライアイの診断基準(および涙液分泌量低下:ATDの判断基準)は1995年我国のドライアイ研究会のものをを用いた。

(2) 涙液蒸発率測定は我々の開発したデバイスを使用した(Goto, IOVS, 2003, Goto, AJO, 2007)。

(3) 極少量眼軟膏眼瞼縁投与(Goto, AJO, 2006)を対象に施行。オフロキサシン眼軟膏が使用された。

(4) 統計解析は、塗布前後の2群間でWilcoxon signed rank testを施行した。 $P < 0.05$ をもって統計学的に有意と判断された。Graphpad Instat 3.0 (Graphpad Software, Inc., San Diego, CA)を、統計解析ソフトとして使用した。

3-2) 安全で効果的な油性点眼投与方法の開発(重症ドライアイ患者への油層治療の臨床応用)

(1) 対象は22歳男性EEC症候群患者である。10年来我々のクリニックで経過をみているがドライアイの有効な対策がなかった患者である。

(2) 涙液油層評価;DR-1白色光薄膜干渉像観察装置を適応し涙液油層評価を行った。

(3) 涙液蒸発率評価;我々の開発した涙液蒸発率測定装置を使用し涙液蒸発率を測定した。

(4) 上記評価の結果、涙液油層欠乏であることが確認されたため油層再生を目的とした補充療法を行った。涙液油成分の補充は現在それを目的としたドライアイ治療が一般的でないため、今回我々は様々な油性基材を考慮し、極少量オフロキサシン眼軟膏眼瞼縁塗布を施行した。涙液油成分補充の方法として現在安全に施行可能であるのは市販薬剤(眼軟膏)の流用か、日本薬局方に掲載されている6種類の点眼実績のある油性分からの調剤という方法がある。我々は様々な油性剤の調剤を試みているが安全性の面からヒトに投与できる段階に至っていないと考え、今回の治療では市販薬剤の流用を行った。今回使用した薬剤の油性基材は白色ワセリン・流動パラフィン・ラ

ノリンの混合物である。投与方法としては眼表面での薄膜形成を期待して極少量眼軟膏眼縁縁投与を行った。

(倫理面への配慮)

本研究は、被験者に十分なインフォームドコンセントを行った上で、ヘルシンキ宣言にのっとり、学内の倫理委員会の承認を経て実施された。

C. 研究結果

本研究の内容を下記の如く3つに大別し(1. 眼表面湿度定量システムの開発、2. 涙液水層再建治療の研究、3. 涙液油層再建治療の研究)、結果につき記す。

1. 眼表面湿度定量システムの開発およびそれらデバイス群を用いたドライアイ患者における涙液層の評価

1-1) 非侵襲的涙液貯留量測定法 interference meniscometryの開発

NI-TMHはnl群において 0.22 ± 0.065 mm、SS群において 0.13 ± 0.042 mmであり、SS群で有意に低値を示した($P < 0.0001$)。同様に、角膜フルオレセイン染色スコア(nl群 0.46 ± 0.64 、SS群 4.0 ± 2.1 、 $P < 0.0001$)、ローズベンガル染色スコア(nl群 0.18 ± 0.48 、SS群 4.6 ± 1.8 、 $P < 0.0001$)、涙液層破壊時間(nl群 5.9 ± 3.0 秒、SS群 2.3 ± 1.4 秒、 $P < 0.0001$)、シルマーテスト値(nl群 13.9 ± 9.4 mm、SS群 1.7 ± 1.5 mm、 $P < 0.0001$)においてもSS群において有意に悪化していた。

1-2) 涙液水層厚み定量測定システムの構築

涙液層厚みはDE群(2.31 ± 1.58 μ m)においてNL群(5.88 ± 2.38 μ m)に比べて有意に減少していた($P < 0.0001$)。フルオレセイン角膜染色スコアおよびローズベンガル角結膜染色スコアもDE群においてNL群に比較して悪化していた(それぞれ $P < 0.0001$)。同様に、涙液層破壊時間およびシルマーテスト値もDE群においてNL群よりも低値を示した(それぞれ $P < 0.0001$)。涙液層厚みは、涙液メニスカス($r = 0.39$ 、 $P = 0.0005$)、DR-1グレーディング($r = -$

0.32 、 $P = 0.0040$)、フルオレセイン染色スコア($r = -0.61$ 、 $P < 0.0001$)、ローズベンガル染色スコア($r = -0.58$ 、 $P < 0.0001$)、BUT($r = 0.59$ 、 $P < 0.0001$)、シルマー値($r = 0.52$ 、 $P = 0.0001$)それぞれにおいて有意な相関関係を認めた。また、ドライアイ患者において涙点閉鎖術施行後(4.91 ± 2.83 μ m)は、施行前(1.66 ± 1.45 μ m)と比べて涙液層厚みが増加していた($P < 0.0001$)。

1-3) 涙液油層と涙液蒸発率の同時測定、関連調査

(1) 涙液蒸発量と涙液油層干渉像解析
涙液蒸発量はSS ATDにおいて 5.9 ± 3.5 (10^{-7} g/cm²sec)とnon-SS ATD(2.9 ± 1.8 (10^{-7} g/cm²sec))に比べて有意に高値を示した($P = 0.0009$)。横井のDR-1重症度グレーディングはSS ATDにおいて 3.9 ± 1.2 でありnon-SS ATD(2.9 ± 1.1)に比べて、同様に優位に高値を示した($P = 0.03$)。

(2) 眼表面所見

フルオレセイン角膜染色スコアはSS ATD群においては 3.0 ± 2.4 であり、non-SS ATD群(0.9 ± 1.6)に比較して有意に悪化していた($P = 0.002$)。同様にローズベンガル角結膜染色スコアもSS ATD群においては 3.7 ± 2.6 であり、non-SS ATD群(1.9 ± 2.5)に比較して有意に悪化していた($P = 0.01$)。一方、涙液層破壊時間はSS ATD群においては 2.6 ± 1.7 秒、non-SS ATD群においては 3.1 ± 2.6 秒と有意差がなかった。同様にシルマーテスト値もSS ATD群においては 2.5 ± 2.0 mm、non-SS ATD群においては 2.0 ± 2.0 mmと有意差がなかった。マイボーム腺脂質圧出度判定に関してはSS ATD群において 2.2 ± 0.4 とnon-SS ATD群(1.0 ± 1.3)に比べて有意に悪化していた($P = 0.04$)。

1-4) ナノメーターレベル生体薄膜の定量評価:L*a*b*3次元表色系を応用した白色光涙液油層薄膜干渉像からの薄膜厚みtopographyの作成

ヒト涙液油層の白色光薄膜干渉像から涙液油層薄膜topographyを得た。正常者(図1)における涙液油層薄膜厚みは約100 nm

(図2)、重症ドライアイに伴う難治性眼表面疾患における涙液油層薄膜厚みは0~20nmであった。

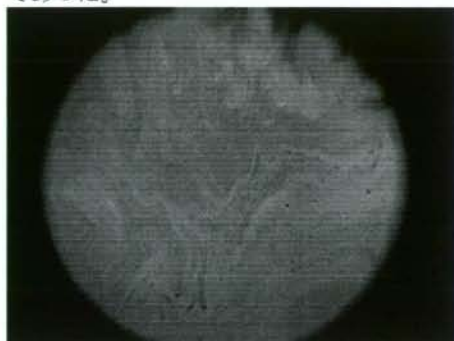


図1、涙液油層干渉像（正常者）

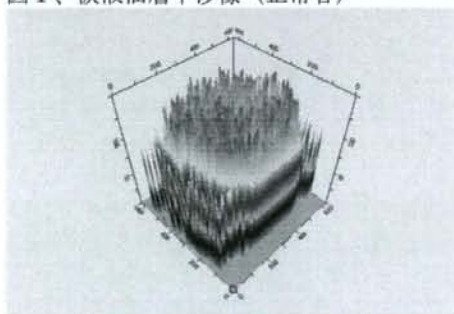


図2、図1の涙液油層干渉像から算出された涙液油層薄膜厚みtopography. 干渉像をつくる薄膜の厚みは約100nmと定量された。

2. 涙液水層再建治療の研究

2-1) 涙液水層治療としての成功率のより高い涙点閉鎖術の開発

平均観察期間は、324.8±299.9日であった。

(1) 矯正視力：涙点閉鎖後の矯正視力(0.03±0.24:小数視力0.94)は、閉鎖前(0.11±0.30:小数視力0.77)に比べて有意に改善した($P = 0.004$)。

(2) フルオレセイン染色スコア：涙点閉鎖後のフルオレセイン染色スコア(1.07±1.85)は、閉鎖前(4.45±2.87)に比べて有意に低値を示した($P < 0.0001$)。

(3) BUT：涙点閉鎖後のBUT(4.63±2.22秒)は、閉鎖前(1.33±1.14秒)に比べて有意に高値を示した($P < 0.0001$)。

(4) シルマー試験値：涙点閉鎖後のシルマー試験値(4.63±2.22 mm)は、閉鎖

前(2.67±4.01 mm)に比べて有意に高値を示した($P < 0.0001$)。

(5) ローゼンベガル角結膜染色スコア：ローゼンベガル角結膜染色スコアは、閉鎖前後で有意な変化を認めなかった($P > 0.05$)。

(6) 閉鎖率：初回手術における涙点閉鎖率は95.7%、再手術を含めた場合、97.1%であった。

2-2) 涙液水層再建治療合併症の克服及び涙道内視鏡を用いた涙道再建法の研究

(1) 涙点から涙丘への大きな涙点切開を行い、中村氏式釣り針鉤で創部を拡大した。涙小管側壁にそって搔爬を行ったところ全対象において涙点プラグが発見、除去された。経過上疑われた涙点プラグの迷入が証明された。1例では涙点プラグは涙小管側壁から小窩を形成して潜り込んでおり発見が非常に困難であったが、中村氏式釣り針鉤にての創部拡大が有効であった。

(2) このような場合、涙点プラグが涙小管内にあれば涙道内視鏡での探索が可能であった。涙道内視鏡手術標準術式であるDEP、SEP、DCR下鼻道法、SGIを用いたがさらに当研究ではより低侵襲の手術法としてシースを涙点より抜去する方法を完成した。当初シースに全長の割線をいれたところ涙点、涙道に挿入不能であったが、シース先端3mmを残す割線としたところ涙点からの抜去が可能であった。

3. 涙液油層再生治療の研究

3-1) 涙液油層再生治療による涙液蒸発率抑制の研究

(1) NL群における極少量オフロキサシン投与後の涙液蒸発量(3.12±2.01 x10⁻⁷ g/cm²·sec)は、投与前(4.76±1.83 x10⁻⁷ g/cm²·sec)に比べて有意に減少した($P = 0.001$)。

(2) SCL群における極少量オフロキサシン投与後の涙液蒸発量(4.06 ± 2.80 x10⁻⁷ g/cm²·sec)は、投与前(10.87 ± 5.56 x10⁻⁷ g/cm²·sec)に比べて有意に減少した($P = 0.04$)。

(3) DE群における極少量オフロキサシン投与後の涙液蒸発量(5.26 ± 3.37 x1

0-7g/cm²·sec) は、投与前 (7.7 ± 3.5 × 10⁻⁷g/cm²·sec) に比べて有意に減少した (P = 0.02)。

3-2) 安全で効果的な油性点眼投与法の開発 (重症ドライアイ患者への油層治療の臨床応用)

EEC患者の涙液油層干渉像は涙液油層欠乏を示した。また涙液蒸発率は右眼8.2 × 10⁻⁷g/cm²sec、左眼7.6 × 10⁻⁷g/cm²secと増加していた。極少量オフロキサシン眼軟膏眼瞼縁塗布により涙液油層干渉像は改善し、涙液蒸発率は右眼4.2 × 10⁻⁷g/cm²sec、左眼5.4 × 10⁻⁷g/cm²secへと低下した。これら他覚所見の改善とともに眼乾燥症状も大幅に改善した。

D. 考察

今研究の内容を下記の如く3つに大別し (1. 眼表面湿潤度定量システムの開発、2. 涙液水層再建治療の研究、3. 涙液油層再生治療の研究)、考察する。

1. 眼表面湿潤度定量システムの開発

1-1) 非侵襲的涙液貯留量測定法interference meniscometryの開発

本研究では涙液干渉デバイスを用い、非侵襲的に涙液メニスカスを可視化することに成功した。NI-TMHはf-TMHとよい相関を示し、若干の低値を呈した。これはf-TMHが水分を添加して測定しているのに対し、NI-TMHが非侵襲的に計測を行っているためであると考えられ、NI-TMHの臨床的有用性および正確さを示すものと考えられた。nl群に比べて、NI-TMHは、SS群において、フルオレセイン角膜染色スコア、ローズベンガル角結膜染色スコア、涙液層破壊時間、シルマーテスト値の悪化と同時に低値を示した。このため、NI-TMHはドライアイ患者における眼表面の涙液欠乏状態をよく反映していると考えられた。今後この方法が確立されれば古典的シルマーテストと同様にスタンダードな眼表面涙液貯留量判定に使用できると考えている。

1-2) 涙液水層厚み定量測定システムの構築

干渉計を用いて、涙液 (水) 層厚みの測定が可能であった。涙液層の厚みは、涙液分泌低下型ドライアイでは健常眼に比して低下しており、また涙点閉鎖術後には回復していた。また涙液層厚みは涙

液層破壊時間およびシルマー値と正の相関を認めた。涙液層の厚み測定は、角膜前面の涙液量の低下を非侵襲すなわち正確に評価できる手段であると思われた。

1-3) 涙液油層と涙液蒸発率の同時測定、関連調査

本研究ではSS ATDとnon-SS ATDの涙液蒸発量測定が涙液油層評価と共になされた。涙液蒸発量はSS ATD群においてnon-SS ATD群よりも高値を示し、同時に涙液油層グレーディング、角結膜生体染色スコア、マイボーム腺脂質圧出度の悪化を伴っていた。このような涙液蒸発量の違いは涙液量と涙液油層評価から説明される。涙液量に関してはその分泌量は若干侵襲的なシルマーテストで判断され、その貯留量は一般的な評価法がない。今回はシルマーテスト値 (涙液分泌量) が同様な二群間の比較となった。一方、涙液油層評価はDR-1涙液油層干渉カメラによる評価が発展してきている。同程度のDR-1グレーディング、角結膜生体染色スコア、涙液層破壊時間、シルマーテスト値を示す代表例においてもSS ATDの涙液油層厚みは40 ~ 240 nmと不均一であり、とくに角膜上方部に著名な涙液油層欠乏を示していた。一方、non-SS ATDにおいても涙液油層厚みは120 ~ 220 nmと不均一ではあるが、SS-ATDに比べるとより均一で、全体的に厚みがあり、涙液蒸発量が低下している原因となっていると考えられた。本研究では、涙液油層評価に、当初横井のDR-1グレーディングシステム、そして最近ではCIE XYZ表色系を用いた二次元定量システムを用いた。可能であればDR-1涙液油層干渉画像をindex化し比較することが臨床上有用であると考えられるため、平成19、20年度を費やし、いままで報告されていない三次元表色系を導入した涙液油層干渉像からのナノメーターレベル油層薄膜厚み定量システムを開発した (次項参照)。

1-4) ナノメーターレベル生体薄膜の定量評価:L*a*b*3次元表色系を応用した白色光涙液油層薄膜干渉像からの薄膜厚みtopographyの作成

白色光薄膜干渉像の解析から薄膜厚みの定量が可能であった。従来重症ドライアイ疾患においては水分量のみが眼表面湿潤度の評価に用いられていたが、涙液最表層において涙液蒸発を制御している涙液油層の

評価が可能となった。この涙液油層は重症ドライアイ患者で著明に減少しており眼表面乾燥の大きな要因になっていることが考えられた。

2. 涙液水層再建治療の研究

2-1) 涙液水層治療としての成功率のより高い涙点閉鎖術の開発

本研究で用いたコーテリーによる涙点閉鎖術式は、Miami大学Tseng元教授が提唱している方法である。今回我々は、高温型の新型コーテリーを用いて、難治性眼表面疾患による涙液障害に伴う重症ドライアイ患者の治療を試みた。

その結果、涙点閉鎖術前後で、矯正視力、フルオレセイン染色スコア、BUT、シルマー試験の検診項目において有意な改善が認められた。術後の再開通は4.3%（再手術により2.9%）であり、従来方法（約30%）に比べて低かった。最終的に再開通している2涙点においてもドライアイの改善が見られ、経過観察としている。

従来方法では縫合糸による二重涙点形成など合併症が時に認められたが、Tsengの方法ではその発生の心配がない。また、過剰凝固による痙攣収縮などの合併症は現在まで観察されていない。不可逆的变化を起こす手術であるため、適応の選択は慎重に行うべきであるが、涙点プラグ以上の効果があり、脱落を繰り返すような症例には積極的に検討すべき手術であると考えられた。以上のことから本研究で行った新型コーテリーを用いた涙点閉鎖術は、難治性眼表面疾患による涙液障害に伴う重症ドライアイ患者の眼表面湿潤度を改善させていると考えられ、有効な涙液水層治療であると結論づけられた。

2-2) 涙液水層再建治療合併症の克服及び涙道内視鏡を用いた涙道再建法の研究

ドライアイ、特に重症ドライアイ患者にとって涙点プラグは大きな効果がある治療法であるが今回新しい合併症およびその対処が報告された。涙点プラグの合併症としては体外への脱落が問題となっていたが、プラグが行方不明となりその後涙小管を発症している症例では今後涙小管内への迷入を考慮し探索する必要があると思われた。

迷入してしまった涙点プラグが涙小管炎を起せば除去が必要である。その為に中村氏式釣り針鉤が有用であった。またより低侵襲な涙点プラグ探索法として涙道内視鏡を用いた方法も開発し、手術に使用するシースを涙点から抜去する方法も開発し、低侵襲化、成功率に貢献したと考えられた。またこのような対処はドライアイの専門医の知識だけでなく涙道手術の専門医の知識が必要であった。

3. 涙液油層再生治療の研究

3-1) 涙液油層再生治療による涙液蒸発率抑制の研究

本研究では涙液蒸発率測定装置を用い、非侵襲的に涙液蒸発率を測定した。NL群、SCL群、DE群においてそれぞれオフロキサシン投与により蒸発率は、有意に抑制された。さらに、NL群に比べて、SCL群およびDE群の蒸発率は多く、かつ極少量眼軟膏眼縁投与による涙液蒸発率抑制効果は、より大きかった。このような投与では企図されていたごとく投与された油性分、すなわち眼軟膏基剤が薄膜を形成し涙液蒸発を抑制したと考えられた。この基剤が白色ワセリン・流動パラフィン・ラノリンの混合物であるところから、この混合物がドライアイに対して効果のある油層治療薬となる可能性が示唆された。

3-2) 安全で効果的な油性点眼投与方法の開発（重症ドライアイ患者への油層治療の臨床応用）

先天性マイボーム腺欠損に伴うEEC症候群は涙液油性分（のみ）が欠乏したドライアイを呈し、涙液蒸発亢進型ドライアイとして重症であった。この油成分の評価には白色光薄膜干渉像観察装置と涙液蒸発率測定装置が有効であった。このドライアイに対しては従来の水成分補充では疾患の解決が得られず油成分の補充が有効であった。この極少量オフロキサシン眼軟膏眼縁塗布投与方法では企図されていたごとく投与された油性分、すなわち眼軟膏基剤が眼表面で薄膜を形成し涙液蒸発を抑制したと考えられた。この基剤が白色ワセリン・流動パラフィン・ラノリンの混合物であるところから、この混合物がドライアイに対して効果のある油層治療薬となる可能性が示唆された。難治性ドライアイにおいては今までの水成分の評価のみでなく、今研究の如く油層

の評価を行う必要があると示唆された。その欠乏による眼表面乾燥が明らかとなれば適切な油成分補充を行い涙液油層の再生をおこなうことで眼湿潤を回復できることも示唆された。

E. 結論

今研究の内容を下記の如く3つに大別し(1. 眼表面湿潤度定量システムの開発、2. 涙液水層再建治療の研究、3. 涙液油層再建治療の研究)、結論する。

まとめると、当該研究では現在臨床的に用いられていないが、重症ドライアイに伴う難治性眼表面疾患の病態評価の為に重要であると考えた涙液水層および涙液油層の評価装置を開発した。これらの知見をもとに涙液水層再建治療を進展させ、また涙液油層の再生治療を開発した。これらの方法は疾患メカニズムの明らかでなかった難治性眼表面疾患の病態を評価し、欠乏する涙液要素を適正に補うことによって今後治療すなわち眼表面湿潤に貢献することが期待される。

1-1) 涙液干渉デバイスを用いた非侵襲的涙液メニスカス観察においては、従来困難とされていた重症なドライアイ患者の涙液メニスカスにおいてもその可視化が可能であった。NI-TMH測定は既存のI-TMH測定と同等以上の臨床的有用性があることが示された。nl群とSS群間のNI-TMHの差は眼表面湿潤に重要な涙液貯留量を反映しているものと考えられた。

1-2) 薄膜厚み測定装置を使用した涙液層厚みの測定が可能であり、角膜前面の涙液量の低下を非侵襲すなわち正確に評価できる手段であると思われた。ドライアイにおける涙液水層厚みは世界で始めて報告された。薄膜厚み測定装置にて計測した涙液層厚みは涙液分泌低下型ドライアイ患者において健常人と比べて有意に低値を呈し、涙点閉鎖手術により回復していた。

1-3) 涙液蒸発量はSS ATD群においてnon-SS ATD群と比べて有意に亢進しており、同程度の涙液分泌量を呈するドライアイ患者の中でもSS ATD患者の重症度が高いことを示しているものと考えられた。この涙液蒸発量亢進は涙液油層の不均一な分布による部分的な欠乏およびマイボーム腺からの涙液脂質供給低下に伴っていると考えられた。

涙液油層評価と同時に施行された涙液蒸発量測定は眼表面湿潤度の評価に有用であると考えられた。

1-4) 白色光薄膜干渉像の解析から薄膜厚みの定量が可能であった。ヒト涙液においては再表層の油層薄膜の厚みが定量可能であり、涙液蒸発、眼表面湿潤への影響を評価可能な重要な指標になると考えられた。正常者において一定の厚み(約100nm)を呈した涙液油層は重症ドライアイに伴う難治性眼表面疾患においては著明に減少または欠乏していた(0~20nm)。この重症ドライアイにおいて観察された涙液油層の減少・欠乏は疾患による眼乾燥の大きな要因になっていると思われた。またこの方法は今後涙液油層の再建治療の評価にも有効であると考えられた。

2-1) 重症ドライ患者に対するTsengの方法を用いた涙点閉鎖術は、従来の術式に比べ再開通率も低く、視機能、および眼表面の改善が得られる術式である。

2-2) 涙点プラグの新しい合併症である迷入後涙小管炎につき報告し、その探索、摘出方法をしめした。そのような涙道閉塞に対してのより低侵襲な対処として涙道内視鏡を用いた涙道再建法を開発した。

3-1) 極少量眼軟膏眼瞼縁投与による涙液油層再生治療の施行により眼表面薄膜が形成された結果、実際に眼表面の湿潤度も制御され、涙液蒸発率が抑制されることが示された。極少量眼軟膏眼瞼縁投与による涙液油層再生治療は今後、現在難治とされているドライアイに対しての一つの治療方法として有望であると思われた。本研究で用いた涙液蒸発率測定法は、ドライアイ診断・治療効果判定に貢献すると考えられた。

3-2) EEC症候群は涙液蒸発亢進型ドライアイを呈した。EEC症候群に対しての極少量オフロキサシン眼軟膏眼瞼縁塗布療法は涙液油層を改善し、涙液蒸発率を低減させ、眼表面湿潤に有効であった。重症ドライアイによる難治性眼表面疾患に対しては水分補充のみでなく、適度な油成分の補充も症例により有効であることが示された。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Eiki Goto, Yukihiko Matsumoto, Mizuka Kamoi, Koji Endo, Reiko Ishida, Murat Dogru, Minako Kaido, Takashi Kojima, Kazuo Tsubota. Tear Evaporation Rates in Sjogren Syndrome and non-Sjogren Dry Eye Patients. American Journal of Ophthalmology, 2007; 144, 81-85.

2. Atsuro Uchida, Miki Uchino, Eiki Goto, Eri Hosaka, Yuko Kasuya, Kazumi Fukagawa, Murat Dogru, Yoko Ogawa, Kazuo Tsubota. Non-invasive interference tear meniscometry in dry eye patients with Sjogren syndrome. American Journal of Ophthalmology, 2007; 144, 232-237.

3. Yu Ota, Yukihiko Matsumoto, Murat Dogru, Eiki Goto, Yuichi Uchino, Koji Endo, Kazuo Tsubota. Evaporative Dry Eye and Management of The Ocular Surface Disease in a Patient with Ectrodactyly-Ectodermal Dysplasia-Clefting (EEC) Syndrome. Optom Vis Sci, 2008; 85, 795-801.

2. 学会発表

(1) 涙液分泌低下型ドライアイ患者における涙液層厚み測定. 保坂絵里、糟谷優子、村戸ドール、坪田一男、後藤英樹. 第31回角膜カンファレンス, 2007, 2, 10. 宮崎

(2) BUT短縮型ドライアイにおける涙液層厚み測定. 糟谷優子、保坂絵里、村戸ドール、坪田一男、後藤英樹. 第31回角膜カンファレンス, 2007, 2, 10. 宮崎

(3) ドライアイ患者における涙液層厚みの測定. 後藤英樹、保坂絵里、糟谷優子、村戸ドール、坪田一男. シェーグレン症候群セミナー, 2007, 5, 26. 東京

(4) 涙液層厚みからみたShort BUTドライアイ. 後藤英樹. 日本臨床眼科学会, 2007, 10, 10. 京都

(5) 太田優, 後藤英樹, 松本幸裕, 内野裕一, 村戸ドール, 坪田, 一男. EEC症候群におけ

る極少量オフロキサシン眼軟膏眼瞼縁投与前後の眼表面. 第31回角膜カンファレンス. 2007. 2. 10. 宮崎

(6) 後藤英樹, 保坂絵里, 糟谷優子, 深川和己, 太田優, 松本幸裕, 村戸ドール, 坪田一男. 眼軟膏、ごま粒大でもこの効果—スチープンス・ジョンソン症候群への挑戦. 第31回角膜カンファレンス, 2007. 2. 9. 宮崎

(7) 後藤英樹, 保坂絵里, 糟谷優子, 大場恵美. こだわりの極少量オフロキサシン眼軟膏眼瞼縁投与—lid wiper epitheliopathyへの挑戦. 第32回角膜カンファレンス. 2008. 2. 28. 東京

(8) 大場恵美, 保坂絵里, 糟谷優子, 中川洋一, 齊藤一郎, 後藤英樹. Tsengの方法を用いた涙点閉鎖術による重症ドライアイ患者眼表面の改善. 第10回神奈川シェーグレン研究会. 2008. 3. 13. 横浜

(9) 番裕美子, 出田真二, 村戸ドール, 小川葉子, 小川旬子, 野田実香, 小島隆司, 山本祐介, 小川由佳子, 宗像里奈, 後藤英樹, 坪田一男. 涙点プラグ迷入により涙小管炎を呈し、プラグ摘出術を施行した2例. 第30回角膜カンファレンス・第22回日本角膜移植学会. 2006. 2. 9~11. 東京

(10) 後藤英樹、宮久保純子. シース誘導涙管チューブ挿入術においてシースを涙点から抜去する方法の試み, 第11回涙道内視鏡研究会、2009. 3. 28. 大阪.

H. 知的所有権の出願・取得状況（予定を含む。）

特許取得

なし

実用新案登録

なし

3) その他

なし

別紙4

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

| 著者氏名 | 論文タイトル名 | 書籍全体の編集者名 | 書 籍 名 | 出版社名 | 出版地 | 出版年 | ページ |
|-----------------------|--|------------|--|--|-----------|------|-------|
| Goto, E, Dogru, M. | Tear Lipid Layer, Tear Evaporation and Tear Interferometry | Pandey, S. | Dry Eye and Ocular Surface Disorders | Jaypee Brothers Medical Publishers Ltd | New Delhi | 2006 | 55-71 |

雑誌

| 発表者氏名 | 論文タイトル名 | 発表誌名 | 巻号 | ページ | 出版年 |
|--|--|---|-----|---------|------|
| Goto, E, Matsumoto, Y, Kamoi, M, Endo, K, Ishida, R, Dogru, M, Kaido, M Kojima, T, Tsubota, K. | Tear Evaporation Rates in Sjogren Syndrome and non- Sjogren Dry Eye Patients | American Journal of Ophthalmolog y | 144 | 81-85 | 2007 |
| Uchida, A, Uchino, M, Goto, E, Hosaka, E, Kasuya, Y, Fukagawa, K, Dogru, M, Ogawa, Y, Tsubota, K. | Non-invasive interference tear meniscometry in dry eye patients with Sjögren syndrome | American Journal of Ophthalmolog y | 144 | 232-237 | 2007 |
| Ota, Y, Matsumoto, Y, Dogru, M, Goto, E, Uchino, Y, Endo, K, Tsubota, K. | Evaporative Dry Eye a nd Management of The Ocular Surface Diseas e in a Patient with E ctrodactyly-Ectoderma l Dysplasia-Clefting (EEC) Syndrome | Optometry and Vision Science | 85 | 795-801 | 2008 |

Tear Evaporation Rates in Sjögren Syndrome and non-Sjögren Dry Eye Patients

EIKI GOTO, YUKIHIRO MATSUMOTO, MIZUKA KAMOI, KOJI ENDO, REIKO ISHIDA, MURAT DOGRU, MINAKO KAIIDO, TAKASHI KOJIMA, AND KAZUO TSUBOTA

- **PURPOSE:** To reinvestigate tear evaporation rates in Sjögren syndrome (SS) and non-Sjögren (non-SS) dry eye patients with a recently reported ventilated chamber evaporimeter system.
- **DESIGN:** Prospective case-control study.
- **METHODS:** A ventilated chamber evaporimeter system was used to measure tear evaporation rates. A DR-1 camera (Kowa, Nagoya, Japan) was used for tear lipid layer interference image acquisition. The Yokoi severity grading system was used for DR-1 image evaluation. Twenty-four aqueous tear deficiency (ATD) eyes of 21 consecutive patients with SS were studied (SS ATD group). Twenty-one ATD eyes of 12 non-SS patients (non-SS ATD group) were examined as control subjects.
- **RESULTS:** Tear evaporation rates of the SS ATD group ($5.9 \pm 3.5 [10^{-7} \text{ g/cm}^2 \text{ per second}]$) were significantly higher than those of the non-SS ATD group ($2.9 \pm 1.8 [10^{-7} \text{ g/cm}^2 \text{ per second}]$; $P = .0009$). The severity grading of DR-1 tear interference images of the SS ATD group was significantly higher ($P = .03$), along with significantly worse meibomian gland expressibility and vital staining scores, compared with those of the non-SS ATD group.
- **CONCLUSIONS:** Tear evaporation rates were higher in eyes of the SS ATD group compared with the non-SS ATD group. Tear evaporation assessed in conjunction with tear lipid layer findings and meibomian gland expressibility provides an increased understanding in the differential diagnosis of dry eye states. (*Am J Ophthalmol* 2007;144:81–85. © 2007 by Elsevier Inc. All rights reserved.)

AFTER THE NATIONAL EYE INSTITUTE REPORT BY Lemp, tear evaporimetry to describe evaporative water loss from the ocular surface has been considered as an important examination to differentiate the

Accepted for publication Mar 30, 2007.

From the Department of Ophthalmology, School of Dental Medicine, Tsurumi University, Yokohama, Japan (E.G.); the Department of Ophthalmology, School of Medicine, Keio University, Tokyo, Japan (E.G., Y.M., M.K., R.I., M.D., M.K., T.K., K.T.); the Department of Ophthalmology, Ichikawa General Hospital, Tokyo Dental College, Ichikawa, Japan (Y.M., R.I., M.D., M.K., T.K., K.T.); the Analytical Research Center, KAO Corporation, Tochigi, Japan (K.E.); and the Department of Ophthalmology, Social Insurance Chukyo Hospital, Nagoya, Japan (T.K.).

Inquiries to Eiki Goto, Department of Ophthalmology, School of Dental Medicine, Tsurumi University, 2-1-3 Tsurumi, Tsurumi-ku, Yokohama City, Kanagawa, Japan 230-8501; e-mail: goto-e@tsurumi-u.ac.jp

types of dry eye in addition to the basic Schirmer I test.^{1,2} The ocular surface tear film consists of lipid, aqueous, and mucin layers. The tear film spreads across the ocular surface by blinking and drains mainly into the nasolacrimal duct, with the remainder evaporating into the air. The mucin layer is secreted by the goblet cells and the ocular surface epithelium, aqueous components are secreted from the lacrimal gland, and the lipid layer is formed by secreted meibomian lipids that act to suppress excessive tear evaporation by covering the aqueous tear layer.³⁻⁴

In dry eye, tear evaporation has been considered to be important because the ratio of tear evaporation in total tear flow is increased compared with that of normal subjects.⁵ Previous tear evaporation reports in aqueous tear deficiency (ATD) dry eyes have revealed inconsistent results by several groups, sometimes higher^{6,7} or sometimes lower⁸⁻¹⁰ than the normal values.

We recently reinvestigated the tear evaporation rates in normal subjects and meibomian gland dysfunction (MGD) patients using the new ventilated chamber evaporimeter system.¹¹ As the meibomian gland lipid expressibility worsened, tear evaporation rates showed an increase under normal aqueous tear secretion. Thus, we thought that the comparison of tear evaporation rates of ATD dry eyes in patients with and without Sjögren syndrome (SS) were intriguing and warranted further investigation. Herein, we report tear evaporation rates of ATD dry eyes in patients with SS and ATD dry eyes in patients without SS using our new evaporimeter system which uses a ventilated chamber.¹¹ Tear interferometry to evaluate the precorneal tear lipid layer condition was performed simultaneously using the Yokoi semiquantitative grading system^{12,13} and lipid layer thickness quantification system.¹⁴ The significance of this method and findings are discussed.

METHODS

- **SUBJECTS:** In the subspecialty clinic of Tokyo Dental College, Ichikawa General Hospital, 24 ATD eyes of 21 consecutive patients with SS were studied (SS ATD group: one male and 20 females; mean age, 55.8 ± 13.1 years). Twenty-one ATD eyes of 12 non-SS patients (non-SS ATD group: three males and nine females; mean age, 51.9 ± 17.2 years) were examined as control subjects. SS patients were diagnosed using the criteria of Fox and Saito.¹⁵ The

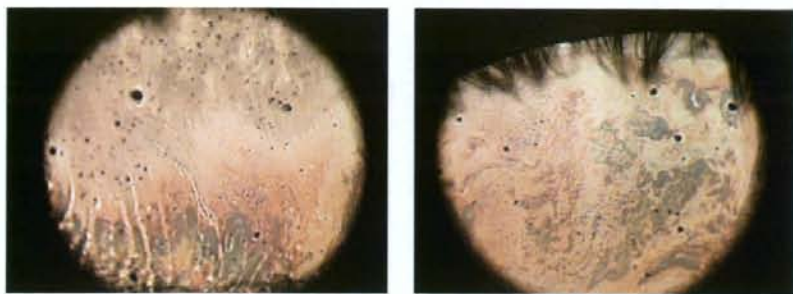


FIGURE. Representative DR-1 tear interference images from the Sjögren syndrome (SS) aqueous tear deficiency (ATD) and the non-SS ATD groups. (Left) Representative DR-1 image from a 65-year-old Asian woman in the SS ATD group. Tear evaporation rates were $5.7 (10^{-7} \text{ g/cm}^2 \text{ per second})$, the Yokoi DR-1 grading was 4, and the range of lipid layer thickness estimated from the DR-1 tear interference image was 40 to 240 nm. Fluorescein and rose bengal scores were 6 and 5, respectively. The tear break-up time (BUT) was one second, the Schirmer I test value was 3 mm, and meibomian gland expressibility grading was 3. (Right) Representative DR-1 image from a 73-year-old Asian woman in the non-SS ATD group. Tear evaporation rates were $1.1 (10^{-7} \text{ g/cm}^2 \text{ per second})$, the Yokoi DR-1 grading was 4, and the range of lipid layer thickness estimated from the DR-1 tear interference image was 120 to 220 nm. Fluorescein and rose bengal scores were 5 and 4, respectively. The tear BUT was four seconds, the Schirmer I test value was 2 mm, and meibomian gland expressibility grading was 2.

Japanese diagnostic criteria of dry eye was used for the diagnosis of dry eye, and Schirmer I test results of 5 mm or less were regarded as ATD.¹⁶ Both eyes of all subjects underwent measurement. Only those eyes with Schirmer I test results of 5 mm or less were included as ATD eyes in this study. None of the subjects had any evidence of ocular infection, none wore contact lenses, none had undergone punctal occlusion, and none had blepharospasm, conjunctivochalasis, or abnormal blinking. Severe dry eye states, such as Stevens-Johnson syndrome or ocular pemphigoid, and cases with allergic conjunctivitis were excluded from the study.

• **TEAR EVAPORIMETER SET UP:** Tear evaporation rates from the ocular surface were measured noninvasively using our recently reported device.¹¹ Briefly, the evaporimeter consisted of an eye cup in the form of a ventilated chamber having a volume of 20 cm^3 that tightly covered the eye; air, which was supplied into the cup as a tear evaporation carrier by an air compressor at a constant flow rate (150 ml/minute), and a quartz crystal sensor (9 MHz A-T cut quartz crystal 8 mm in diameter and 0.2 mm in thickness), known as the microbalance, which is highly sensitive to humidity. The frequency of the sensor shifts in response to changes in humidity. Evaporation rates were measured by calculating the difference between the water content of the air entering and exiting the cup. The data sampling rate was four times per second. Real-time changes in the frequency data appeared on the display of a personal computer, synchronous with this sampling rate. For the measurement, the same eye cup was used as in the previous study to fix the condition.¹¹

• **EXAMINATIONS OF TEARS, THE OCULAR SURFACE, AND MEIBOMIAN GLANDS:** Tear lipid layer interferometry was performed noninvasively after tear evaporimetry using the DR-1 camera system¹² (Kowa, Nagoya, Japan) before any invasive examination. DR-1 tear interference images were recorded using a digital photo printer, and the evaluation of tear interference images was carried out using the Yokoi semiquantitative dry eye severity grading system as reported previously: grade 1, somewhat gray color, uniform distribution; grade 2, somewhat gray color, non-uniform distribution; grade 3, a few colors, nonuniform distribution; grade 4, many colors, nonuniform distribution; grade 5, corneal surface partially exposed. In their report, normal control eyes were classified into grades 1 and 2 and dry eyes were classified into grades 2, 3, 4, and 5.^{12,13} For the most recent data from 16 eyes of eight patients (six eyes of three SS patients, and 10 eyes of five non-SS patients), DR-1 images were acquired using the uncompressed high-quality image capturing system,^{17,18} and tear lipid layer thickness was quantified using a computer-synthesized interference color chart system in the representative cases.¹⁴

Examination of the ocular surface was performed identically as in a previous report using the new tear evaporimetry.¹¹ Briefly, the ocular surface was examined by the double-staining method with $2 \mu\text{l}$ preservative-free solution consisting of 1% fluorescein and 1% rose Bengal dye. Fluorescein and rose bengal staining scores (minimum, zero; maximum, nine) and tear break-up times (BUT) were recorded.^{19,20} The Schirmer I test also was performed. To assess meibomian gland expressibility, the Shimazaki grading system was used.⁹ Digital pressure was applied on the lower tarsus, and the degree of ease of expression of

TABLE. Comparison of Tear Evaporimetry, Tear Interferometry, and Ocular Signs between the Sjögren Syndrome Aqueous Tear Deficiency and non-Sjögren Syndrome Aqueous Tear Deficiency Groups

| | Tear Evaporation Rates (10^{-7} g/cm ² per second) | DR-1 Grading (1-3) | Fluorescein Staining Score (0-9) | Rose Bengal Staining Score (0-9) | Tear BUT (sec) | Schirmer I Test Value (mm) | Meibomian Gland Expressibility (0-3) |
|---------------------|---|-----------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|-------------------|-------------------------------|---|
| SS ATD (n = 24) | 5.9 ± 3.5 | 3.9 ± 1.2 | 3.0 ± 2.4 | 3.7 ± 2.6 | 2.6 ± 1.7 | 2.5 ± 2.0 | 2.2 ± 0.4 |
| Non-SS ATD (n = 21) | 2.9 ± 1.8 | 2.9 ± 1.1 | 0.9 ± 1.6 | 1.9 ± 2.5 | 3.1 ± 2.6 | 2.0 ± 2.0 | 1.0 ± 1.3 |
| P value | .0009 | .03 | .002 | .01 | .95 | .3 | .04 |

ATD = aqueous tear deficiency; BUT = tear break-up time; SS = Sjögren syndrome.

meibomian secretions was evaluated semiquantitatively as follows: grade 0, clear fluid easily expressed; grade 1, cloudy fluid expressed with mild pressure; grade 2, cloudy fluid expressed with more than moderate pressure; and grade 3, fluid cannot be expressed even with strong pressure.

• **STATISTICAL ANALYSIS:** All data are shown as the mean ± standard deviation. The Mann-Whitney *U* test was applied to the comparison between SS ATD and non-SS ATD groups in the examinations. A level of *P* < .05 was accepted as statistically significant. Graphpad Instat software version 3.0 (Graphpad Software, Inc, San Diego, California, USA) was used for statistical analysis.

RESULTS

• **TEAR EVAPORATION RATES AND TEAR LIPID LAYER INTERFEROMETRY:** Tear evaporation rates were 5.9 ± 3.5 (10^{-7} g/cm² per second) in the SS ATD group, which was significantly higher than the non-SS ATD group, 2.9 ± 1.8 (10^{-7} g/cm² per second; Table; *P* = .0009). The SS ATD group revealed DR-1 severity grading of 3.9 ± 1.2 (Figure, Left), which was significantly higher than DR-1 grading of the non-SS ATD group, 2.9 ± 1.1 (Figure, Right; *P* = .03).

• **COMPARISON OF OCULAR SIGNS IN SS ATD AND NON-SS ATD GROUPS:** The corneal fluorescein mean score was 3.0 ± 2.4 in the SS ATD group, which was significantly higher than the non-SS ATD group, 0.9 ± 1.6 (Table; *P* = .002). Similarly, the mean rose bengal score was 3.7 ± 2.6 in the SS ATD group, which was also significantly higher than in the non-SS ATD group, 1.9 ± 2.5 (*P* = .01). However, tear BUT (2.6 ± 1.7 seconds in the SS ATD group and 3.1 ± 2.6 seconds in the non-SS ATD group; *P* = .95) and Schirmer I test values (2.5 ± 2.0 mm in the SS ATD group and 2.0 ± 2.0 mm in the non-SS ATD group; *P* = .3) were not significantly different. Meibomian gland expressibility grading was 2.2 ± 0.4 in the SS ATD group, which was significantly higher than the non-SS ATD group, 1.0 ± 1.3 (*P* = .04).

DISCUSSION

IN THIS ARTICLE, WE REPORT TEAR EVAPORATION RATES IN SS ATD and the non-SS ATD groups. Tear evaporation rates were significantly higher in the SS ATD group compared with the non-SS ATD group, along with worse DR-1 severity grading, vital staining scores of the ocular surface, and meibomian gland expressibility grading (Table).

In the current study, tear evaporation rates were 5.9 ± 3.5 (10^{-7} g/cm² per second) and 2.9 ± 1.8 (10^{-7} g/cm² per second) in the SS ATD and the non-SS ATD groups, respectively. These results could be compared with those from our previous report about MGD (5.8 ± 2.7 [10^{-7} g/cm² per second]) and normal subjects (4.1 ± 1.4 [10^{-7} g/cm² per second]) using exactly the same evaporimeter setup.¹¹ Tear evaporation rates in the SS ATD group were close to those of the MGD subjects and were significantly higher than the normal subjects. Tear evaporation rates in the non-SS ATD group were significantly lower than normal subjects. As mentioned, tear evaporation rates, which were measured by our new ventilated chamber system,¹¹ in dry eyes with SS ATD, in dry eyes without SS ATD (this study), and also in eyes with MGD¹¹ showed similar trends to those reported in previous studies by our group using the closed chamber tear evaporimeter system.^{9,10} However, as we pointed out in our previous report,¹¹ tear evaporation rates in ATD have been inconsistent in the literature. Rolando and associates and Mathers and associates, who used the modified closed chamber system, reported increased tear evaporation rates in ATD compared with normal subjects.^{6,7} On the contrary, decreased tear evaporation rates in ATD have been reported by our group using the closed chamber tear evaporimeter system¹⁰ and by Hamano and associates compared with normal subjects.⁸ Because of these inconsistencies, we decided to examine the lipid layer status simultaneously with tear evaporimetry.

The difference in tear evaporation rates in ATD dry eye states could be explained by the observation of surface lipid layer status, which has been known to affect tear evaporation.^{4,21} This lipid layer condition had been assumed by the observation of meibomian gland secretion at the lid margin.^{9,13,22,23} However in this report, we observed the

tear surface lipid layer directly by using the DR-1 tear interference camera.

DR-1 severity grading in the present study was significantly higher in the SS ATD group (3.9 ± 1.2) compared with the non-SS ATD group (2.9 ± 1.1). DR-1 data showed increased dry eye severity grading in the SS ATD and the non-SS ATD groups compared with the previously reported data from normal subjects (1.5 ± 0.5).¹²

The representative DR-1 images from the SS ATD and the non-SS ATD groups are shown in the Figure, which revealed similar DR-1 grading, vital staining scores, tear BUT, and Schirmer I test values. However, tear evaporation rates were higher in the SS ATD group compared with the non-SS ATD group. Meibomian gland expressibility was worse and distribution of precorneal tear lipid was more uneven (lipid layer thickness range, 40 to 240 nm) in the SS ATD group compared with the non-SS ATD group in these representative cases. Such an uneven distribution and deficient lipid level on the upper cornea (Figure, Left) may result in higher tear evaporation rates in the SS ATD group compared with the non-SS ATD group.

However, it is also evident from the lipid layer thickness data that patients with non-SS ATD with better meibomian gland expressibility have a relatively more even distribution of lipid layer thickness over the cornea with a smaller range of thickness variation (Figure, Right; 120 to 220 nm). The non-SS ATD group had lower tear evaporation rates compared with the SS ATD group. Therefore, tear evaporation measurement when carried out with DR-1 may explain the difference in clinical findings.

For the evaluation of DR-1 tear interference images, the Yokoi severity grading system was used.^{12,13} When we

began the present study, a lipid layer thickness quantification system was not yet available. If we could have applied this system to all DR-1 images, the correlation between tear lipid layer thickness and tear evaporation might have been obtained more clearly. However, as we reported recently, the Yokoi severity grading system may be interpreted roughly as lipid layer thickness information as follows: grades 1 and 2, lipid layer thickness approximately 10 to 92.5 nm in dark to bright brownish-gray interference color; grade 3, lipid layer thickness from 100 to 185 nm in brown interference color; grade 4, lipid layer thickness from 190 nm to 370 nm in colorful interference images; and grade 5, no movement of interference image, indicating no lipid presence, lipid layer thickness approximately 0 nm.²⁴ Thus, we could judge tear lipid layer thickness condition from the Yokoi grading system. Furthermore, for the most recent data, a lipid layer thickness quantification system was applied.^{14,24,25}

As shown in the Figure, analysis of distribution of precorneal tear lipid would be important, and the development of its index for the comparison of the data would be highly expected in future studies. Furthermore, in the future, tear evaporimetry of the other dry eye subtypes such as dry eyes with only decreased tear film BUT would be highly anticipated.²⁶

In conclusion, we applied the new tear evaporimeter system to ATD dry eye states. Meibomian gland expressibility and precorneal lipid layer conditions examined by tear interferometry may explain the resultant tear evaporation rates in ATD dry eyes. This method can contribute to further understanding in the pathogenic mechanism of dry eyes and may give us clues for better treatment of dry eye patients.²⁷

THIS STUDY WAS SUPPORTED BY GRANT NO.18070501 FROM THE JAPANESE MINISTRY OF HEALTH, LABOUR, AND WELFARE, Tokyo, Japan; Japanese patent application 2003-032898 (Drs Goto, Endo, and Tsuboto); and Japanese patent application 2003-032899 (Drs Endo and Tsuboto) for the evaporimeter set-up described herein as a "Tear Secretion Quantify Examination System." Drs Endo, Tsuboto, and Goto also have filed a US patent application on the method described herein and its clinical applications as "Tear Secretion Quantify Examination System." Drs Goto, Matsumoto, and Kamoi contributed equally to the work and therefore should be considered equivalent first authors. Involved in design of study (E.G., Y.M., M.K., R.I.); conduct of study (E.G., Y.M., M.K., K.E.); collection and analysis of the data (E.G., Y.M., K.E., R.I., M.K., T.K., K.T.); and approval of the manuscript (E.G., M.D., K.T.). The present research followed the tenets of the Declaration of Helsinki based on a protocol approved by the Institutional Review Board committee of Tokyo Dental College. Informed consent was obtained from all the subjects after explanation of the nature and possible consequences of the study. This clinical trial was registered to Japan Pharmaceutical Information Center (Tokyo, Japan, JapacCTI-060313).

The authors would like to thank Mr Hirayuki Sato, Analytical Research Center, KAO Corporation, Tochigi, Japan, Mr Atsushi Suzuki, Health Care Products Research Laboratories No. 2, KAO Corporation, Tokyo, Japan, and Naoshi Shinozaki, Executive Director, Cornea Center & Eye Bank, Tokyo Dental College, Chiba, Japan, for their instruction of the principles of the interference phenomena.

REFERENCES

1. Lemp MA. Report of the National Eye Institute/Industry Workshop on Clinical Trials in Dry Eyes. *CLAO J* 1995;21: 221-232.
2. Pflugfelder SC, Tseng SCG, Sanabria O, et al. Evaluation of subjective assessments and objective diagnostic tests for diagnosing tear-film disorders known to cause ocular irritation. *Cornea* 1998;17:38-56.
3. Driver PJ, Lemp MA. Meibomian gland dysfunction. *Surv Ophthalmol* 1996;40:343-367.
4. Tiffany JM. The lipid secretion of the meibomian glands. *Adv Lipid Res* 1987;22:1-62.
5. Mathers WD, Daley TE. Tear flow and evaporation in patients with and without dry eye. *Ophthalmology* 1996;103: 664-669.
6. Mathers WD, Binario G, Petroll M. Ocular water evaporation and the dry eye. A new measuring device. *Cornea* 1993;12:335-340.
7. Rolando M, Refojo MF, Kenyon KR. Increased tear evaporation in eyes with keratoconjunctivitis sicca. *Arch Ophthalmol* 1983;101:557-558.

8. Hamano H, Hori M, Mitsunaga S. Application of an evaporimeter to the field of ophthalmology. *J Jpn Contact Lens Soc* 1980;22:101-107.
9. Shimazaki J, Goto E, Ono M, Shimmura S, Tsubota K. Meibomian gland dysfunction in patients with Sjögren syndrome. *Ophthalmology* 1998;105:1485-1488.
10. Tsubota K, Yamada M. Tear evaporation from the ocular surface. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1992;33:2942-2950.
11. Goto E, Endo K, Suzuki A, Fujikura Y, Matsumoto Y, Tsubota K. Tear evaporation dynamics in normal subjects and subjects with obstructive meibomian gland dysfunction. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003;44:533-539.
12. Yokoi N, Takehisa Y, Kinoshita S. Correlation of tear lipid layer interference patterns with the diagnosis and severity of dry eye. *Am J Ophthalmol* 1996;122:818-824.
13. Yokoi N, Mossa F, Tiffany JM, Bron AJ. Assessment of meibomian gland function in dry eye using meibometry. *Arch Ophthalmol* 1999;117:723-729.
14. Goto E, Dogru M, Kojima T, Tsubota K. Computer-synthesis of an interference color chart of human tear lipid layer, by a colorimetric approach. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003;44:4693-4697.
15. Fox RI, Saito I. Criteria for diagnosis of Sjögren's syndrome. *Rheum Dis Clin North Am* 1994;20:391-407.
16. Danjo Y. Diagnostic usefulness and cutoff value of Schirmer's I test in the Japanese diagnostic criteria of dry eye. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 1997;35:761-766.
17. Goto E, Tseng SC. Differentiation of lipid tear deficiency dry eye by kinetic analysis of tear interference images. *Arch Ophthalmol* 2003;121:173-180.
18. Goto E, Tseng SC. Kinetic analysis of tear interference images in aqueous tear deficiency dry eye before and after punctal occlusion. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003;44:1897-1905.
19. Toda I, Tsubota K. Practical double vital staining for ocular surface evaluation. *Cornea* 1993;12:366-367.
20. van Bijsterveld OP. Diagnostic tests in the Sicca syndrome. *Arch Ophthalmol* 1969;82:10-14.
21. Mishima S, Maurice DM. The oily layer of the tear film and evaporation from the corneal surface. *Exp Eye Res* 1961;1:39-45.
22. Shimazaki J, Sakata M, Tsubota K. Ocular surface changes and discomfort in patients with meibomian gland dysfunction. *Arch Ophthalmol* 1995;113:1266-1270.
23. Mathers WD. Ocular evaporation in meibomian gland dysfunction and dry eye. *Ophthalmology* 1993;100:347-351.
24. Goto E. Quantification of tear interference image: tear fluid surface nanotechnology. *Cornea* 2004;23:S20-S24.
25. King-Smith PE, Fink BA, Fogt N. Three interferometric methods for measuring the thickness of layers of the tear film. *Optom Vis Sci* 1999;76:19-32.
26. Toda I, Shimazaki J, Tsubota K. Dry eye with only decreased tear break-up time is sometimes associated with allergic conjunctivitis. *Ophthalmology* 1995;102:302-309.
27. Goto E, Dogru M, Fukagawa K, et al. Successful tear lipid layer treatment for refractory dry eye in office workers by low-dose lipid application on the full-length eyelid margin. *Am J Ophthalmol* 2006;142:264-270.

Noninvasive Interference Tear Meniscometry in Dry Eye Patients With Sjögren Syndrome

ATSURO UCHIDA, MIKI UCHINO, EIKI GOTO, ERI HOSAKA, YUKO KASUYA, KAZUMI FUKAGAWA, MURAT DOGRU, YOKO OGAWA, AND KAZUO TSUBOTA

• **PURPOSE:** To compare noninvasive tear meniscus height (NI-TMH) using a tear interference device in normal subjects and dry eye patients with Sjögren syndrome (SS), and to investigate the applicability of this new method before and after the punctal occlusion procedure.

• **DESIGN:** Prospective case control study.

• **METHODS:** Tear meniscus was visualized noninvasively using a tear interference device (Tearscope plus, Keeler, Windsor, United Kingdom). Tear interference image was captured with digital video camera (SP-321, JFC Sales Plan Co, Tokyo, Japan) attached to the slit-lamp. Lower lid margin NI-TMH was measured using image analysis software. NI-TMH of 28 eyes from 17 normal subjects and 46 eyes from 27 aqueous tear deficiency (ATD) dry eye patients with SS were compared. The change of NI-TMH three weeks after the successful punctal occlusion was examined in 11 eyes of eight dry eye subjects.

• **RESULTS:** Tear meniscus was well visualized with the tear interference device in all cases. Lower lid margin NI-TMH was 0.22 ± 0.065 mm in normal subjects, and 0.13 ± 0.042 mm in SS subjects, respectively ($P < .0001$). After the punctal occlusion, lower lid margin NI-TMH increased significantly from 0.12 ± 0.026 mm to 0.42 ± 0.21 mm ($P = .001$).

• **CONCLUSIONS:** NI-TMH was substantially lower in SS subjects and also significantly improved after punctal occlusion. This method is expected to be helpful in the diagnosis and in the evaluation of the efficacy of punctal occlusion in ATD dry eyes such as SS. (Am J Ophthalmol 2007;144:232–237. © 2007 by Elsevier Inc. All rights reserved.)

TEARS ARE SECRETED FROM THE LACRIMAL GLAND and distributed by blinking to form the tear film of the ocular surface.^{1–3} Tear film is responsible for wetting the ocular surface, which is the first line of defense,

and is also essential for clear visual imaging.^{4–6} Tears are distributed to the cul-de-sac and the exposed ocular surface area, including tear menisci.⁷ Tear meniscus is a major part of the tear reservoir, which holds approximately 70% to 80% of the total tear volume of the exposed ocular surface area. Thus, tear menisci have been considered to reflect tear volume on the ocular surface, and have been considered to be important in the diagnosis of dry eye syndrome.⁸

Using a minimal amount of fluorescein staining, Mainstone and associates reported that the fluorescein-stained tear meniscus height (f-TMH) of normal subjects was 0.46 mm, and f-TMH of dry eye subjects was significantly decreased as 0.24 mm.⁹ This conventional method is widely used as the most common method of tear meniscus height (TMH) measurement. Oguz and associates also reported that f-TMH of dry eye subjects using minimal fluorescein was 0.21 mm, and TMH of the same subjects measured by a noninvasive method with slit-lamp equipped with a micrometer-scale was 0.19 mm.¹⁰ In the meantime, they pointed out that TMH of dry eye subjects sometimes could not be observed without fluorescein, since it was too low. Conventional f-TMH has been reported to be of value in the diagnosis of dry eye; however, it was limited by its invasive nature.^{9,11–15}

Another method to visualize the lucent tear meniscus is to use interference phenomena. Tear interferometry is a noninvasive visualization method of the lucent tear film. The optical path difference from the reflectance at the surface of the tear lipid layer and at the interface of the tear lipid-aqueous layer causes a tear interference image, which could be clearly observed.^{16–18} It has been mainly used to observe the precorneal tear lipid layer.^{19–21}

In ophthalmic practice using the tear interference device (Tearscope Plus, Keeler, Windsor, United Kingdom),^{22–26} not only can the precorneal tear film be observed clearly and noninvasively, but the tear film at the tear meniscus as well. Therefore, we hypothesized that noninvasive tear meniscus height (NI-TMH) could be quantified with the image analysis of tear meniscus interference image, and could be used to differentiate aqueous tear deficiency (ATD) dry eye such as Sjögren syndrome (SS) or to assess surgical efficacy after dry eye treatment by punctal occlusion. The significance of this method and findings are further discussed.

Accepted for publication Apr 4, 2007.

From the Department of Ophthalmology, School of Medicine, Keio University, Tokyo, Japan (A.U., M.U., E.G., E.H., K.F., M.D., Y.O., K.T.); the Tokyo Dry Eye Center in Iidabashi Eye Clinic, Tokyo, Japan (M.U., K.F.); the Department of Ophthalmology, School of Dental Medicine, Tsurumi University, Yokohama, Japan (E.G., E.H., Y.K.); and the Department of Ophthalmology, Ichikawa General Hospital, Tokyo Dental College, Chiba, Japan (M.D., K.T.).

Inquiries to Eiki Goto, Department of Ophthalmology, School of Dental Medicine, Tsurumi University, 2-1-3 Tsurumi, Tsurumi-ku, Yokohama City, Kanagawa, Japan 230-8501; e-mail: goto-e@tsurumi-u.ac.jp