

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 14 日現在

機関番号：24303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462728

研究課題名(和文) 涙液油層の動態特性を決定するマイボーム腺脂質の分子機構の解明

研究課題名(英文) Demonstration of the Molecular Mechanism of Meibomian Lipids on the Determination of Dynamic Characteristics of the Tear Film Lipid Layer

研究代表者

横井 則彦 (Yokoi, Norihiko)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：60191491

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：ソフィア大学のGeorgiev博士の研究協力により、マイボーム腺脂質の粘弾性特性を調べ、健全な脂質では、弾性が優位であり、異常な脂質では粘性が優位であることを見出した。これは、涙液油層が蒸発亢進を抑制することにより涙液層の破壊を防ぐという説に再考を求めるものである。また、涙液層が下方視から正面視に戻る眼球運動時に破壊しやすいことおよび涙液層の破壊パターンに5つの種類があることを見出し、5つの破壊パターンを定量的に評価するトポグラフィーのシステムを開発した。

研究成果の概要(英文)：In collaboration with Dr. Georgi Georgiev of Sofia University, Sofia, Bulgaria, we investigated the viscoelastic property of meibomian lipids. Our results showed that the elastic property of meibomian lipids is predominant in healthy meibum, while the viscous property of those lipids is predominant in diseased meibum. These novel findings suggest that we need to rethink the traditional idea that the tear film lipid layer has the function of preventing the evaporation of aqueous tears from the tear film. In addition, our findings revealed that the lower saccade of the eye facilitates tear film breakup and that there are five different types of tear film breakup pattern. Thus, we developed a topographical analysis system that can quantitatively assess the five different types of tear film breakup.

研究分野：眼科学

キーワード：涙液油層 涙液液層 涙液層破壊 ドライアイ 界面化学 国際情報交換 トポグラフィー

1. 研究開始当初の背景

(1) 涙液層は非極性のマイボーム腺からの分泌油脂 (Meibum) および極性脂質からなる表層の油層と直下の液層からなり、ヒトの涙液油層は、開瞼後、上方に向けて伸展し、それが瞬目毎に非常に再現性よく繰り返されることが知られている。また、その油層の伸展挙動は、油層の粘弾性特性による可能性が我々の *in vivo* での研究¹⁾ および、研究協力者の Georgiev 博士 (ブルガリアソフィア大学) の *in vitro* での研究²⁾ により示唆されていた。そして、涙液油層の機能として、液層の水分蒸発を抑制する機能が従来より提唱されており³⁾、その知見をもとに、涙液油層の機能が蒸発測定装置により評価され、その機能不全によるドライアイのサブタイプとして、蒸発亢進型ドライアイが提唱されていた。一方、涙液層における、液層の存在様式については、水分と分泌型ムチンの分布様式についてさまざまな学説が提唱されていた^{4,5)}。

(2) あらゆるドライアイに共通するコア・メカニズムとして涙液層の破壊が知られており、涙液層の破壊の指標として、涙液層の液層の菲薄化を意味するフルオレセイン breakup time (BUT) と涙液層の全層破壊を意味する非侵襲的涙液層破壊時間 (Non-invasive breakup time: NIBUT) が区別できること、および、NIBUT の直接的、あるいは、間接的評価法として、インターフェロメトリー法、トポグラフィ法、派面収差解析法などが知られていた。

2. 研究の目的

(1) 涙液油層の粘弾性特性が、涙液油層のあらたな機能である可能性を検討するために、健常な Meibum とマイボーム腺機能不全において見られる異常な Meibum を採取して、比較検討すること、および、油層の直下の液層の存在様式を眼球運動による涙液層の油層と液層の振る舞いの違いから検討すること。

(2) 健常眼、および、ドライアイの涙液層の破壊パターンを涙液層の形成理論に基づいて、分類可能か否かを検討すること、および、分類された破壊パターンに基づいて、ドライアイのサブタイプを鑑別できるか否かをそれぞれの破壊パターンを示すドライアイあるいは健常眼の涙液および上皮検査を行って検討すること、加えて、涙液層の破壊パターンが区別できれば、その違いを評価しうる定量的検査方法の確立をめざすこと。

3. 研究の方法

(1) 学内倫理委員会の承認を得た上で、マイボーム腺機能不全を伴わない、あるいは、それを伴うヒトの眼において、眼瞼の圧迫で採取される油脂を採取して、研究協力者であ

る Georgiev 博士の研究室に空輸し、Langmuir trough を用いたレオロジーの手法 (Georgiev 博士が独自に開発⁶⁾) により、それぞれの Meibum の粘弾性特性について調べた。一方、眼球運動に伴う油層と液層の挙動については、水平方向、上方、あるいは、下方への衝動性眼球運動 (サッケード) を行われた際の、油層 (ビデオインターフェロメーターで観察) と液層 (フルオレセインの動態で観察) の動態の違いについて検討し、界面化学的観点から、涙液層における油層および液層の存在様式について検討した。

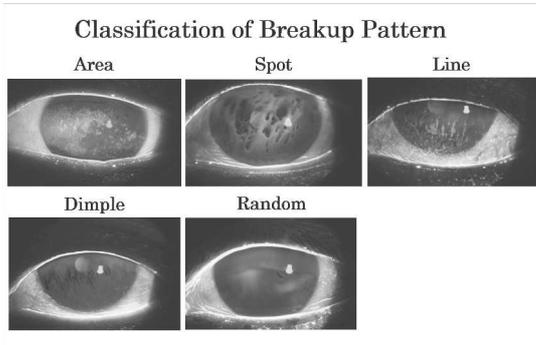
(2) ドライアイ専門外来を受診しているドライアイ患者の眼、あるいは、健常眼を有する眼を対象に、学内倫理委員会の承認を得た上で、涙液層の形成過程の理論に基づいて、想定される涙液層の破壊パターンが見られるか否かを調べ、涙液層の破壊パターンの分類を試みた。次に、その分類に合致する眼を対象に、症状、涙液検査 (フルオレセイン BUT、NIBUT、シルマーテスト I 法など)、上皮障害検査 (フルオレセイン染色) を行い、パターン別の特徴について、調べた。次に、それぞれのパターンの代表例に対して、ビデオトポグラフィ (PR-7000 サンコンタクトレンズ社製) で得たビデオ画像をもとに、定量化を図り、パターンを区別できるか否かについて検討した。

4. 研究成果

(1) Georgiev 博士が開発した Langmuir trough を用いた新しいレオロジーの解析方法により、正常の Meibum が弾性特性を優位に有するのに対して、マイボーム腺機能不全の Meibum は、粘性特性を優位に持つことが世界で初めて明らかにされた⁶⁾。この結果は、これまで、ウサギのマイボーム腺脂質の機能 (蒸発抑制) をそのままヒトに適用してきた考え方³⁾ に一石を投じることになり、健常な Meibum では、その弾性特性が涙液層が破壊しようとした際に、それを生じさせないように働くのに対して、異常な Meibum では、弾性特性が少ないために、涙液層の破壊がそのまま進んでしまうという新しい新しい涙液油層の機能を提唱することにつながった。この新しい Meibum の機能に基づけば、ドライアイそのものの分類にも再考が必要となり、マイボーム腺機能不全を蒸発亢進型ドライアイの原因の一つとするこれまでの考え方が大きなパラダイムシフトを迎える可能性がある。一方、サッケードに伴う涙液の油層と液層の動態についての検討では、水平方向のサッケードに対して、涙液油層は、全く動きを示さないこと、その一方で、液層には、サッケード時に隣接した涙液メニスカスの陰圧の影響を受けて、液層の菲薄化を意味する dark ark が形成されることを見出した。このことは、涙液層の液層が、水分と分泌型ムチンからなるゲル構造を持つことを持ち

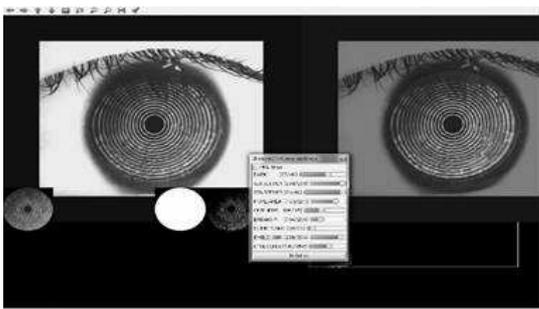
込まずして説明できず、水平方向のサッケードに対して、涙液層の油層と液層は、一体化した動態を示すことが分かり、涙液層の存在様式に対して、Fluid shell という新しい涙液層の構築を提唱する契機となった。また、上方へのサッケードに対して、涙液油層は、大きな変化を示さないが、下方へのサッケードに対して、涙液層の破壊が促進されることを見出した。そしてこのことは、下方視の多い現代人の生活において、眼球運動がドライアイを促進することを初めて示したものとなった。

(2) 涙液層の形成理論^{8,9)}に基づけば、涙液層の破壊は、涙液層の形成までに4つのパターン(area, spot, line, dimple breaks)が、涙液層の破壊後に1つのパターン(random break)が生じることが推定されるが、実際に多くの症例の検討から、それらの5つのパターンがフルオレセインBUTの測定の際に、区別できることが見出された¹⁰⁾。そして、そのパターンの典型像を示すドライアイ、あるいは、健康眼について、症状のアンケート、涙液検査、上皮障害検査を行ったところ、area は、重症の涙液減少型ドライアイ、line、は中等症までの涙液減少型ドライアイ、spot、dimple, random は、BUT短縮型ドライアイの涙液層破壊に相当することが明らかにされた(図1)。



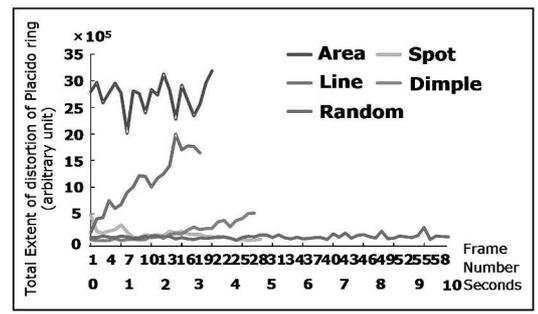
(図1)

また、以上の涙液層の破壊パターンの典型像をビデオトポグラファーと新しく開発した画像ソフト(図2)を用いて取り込み、そのプラチドリリング像を歪み、滲み、濃淡の視点から定量解析可能か否かを検討した結果、



(図2)

5つの破壊パターンが定量的に区別できる可能性が示された(図3)。



(図3)

<引用文献>

- ① Yokoi N, Yamada H, Mizukusa Y, Bron AJ, et al. Rheology of tear film lipid layer spread in normal and aqueous tear-deficient dry eyes. Invest Ophthalmol Vis Sci 49, 2008, 5319-5324,
- ② Georgiev GA, Yokoi N, Ivanova S, Krastev R, et al. Surface chemistry study of the interactions of pharmaceutical ingredients with human meibum films. Invest Ophthalmol Vis Sci 53, 2013, 4605-4615,
- ③ Mishima S, Maurice DM. The oily layer of the tear film and evaporation from the corneal surface. Exp Eye Res 1, 1961, 39-45
- ④ Wolff E. The muco-cutaneous junction of the lid margin and the distribution of the tear fluid. Trans. Ophthalmol. Soc. UK 66, 1946, 291-308
- ⑤ Gipson IK. Distribution of mucins at the ocular surface. Exp Eye Res 78, 2004, 379-388,
- ⑥ Georgiev GA, Yokoi N, Ivanova S, Tonchev V, et al. Surface relaxations as a tool to distinguish the dynamic interfacial properties of films formed by normal and diseased meibomian lipids. Soft Matter 2014, 14, 5579-5588
- ⑦ Yokoi N, Bron AJ, Georgiev GA. The precorneal tear film as a fluid shell: the effect of blinking and saccades on tear film distribution and dynamics. Ocul Surf 12, 2014, 252-266
- ⑧ Berger RE, Corrsin S. A surface tension gradient mechanism for driving the pre-corneal tear film after a blink. J Biomech. 7, 1974, 225-238
- ⑨ King-Smith PE, Fink BA, Hill RM, Koelling KW, et al. The thickness of the tear film. Curr Eye Res 29, 2004, 357-368,
- ⑩ 横井則彦、牛 夢茜：涙液層動態と画像診断 現状と課題. 日本の眼科 86, 2015, 456-461

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 4 件)

①Ivanova S, Tonchev V, Yokoi N, Yappert MC, Borchman D, Georgiev GAs. Surface properties of squalene/meibum films and NMR confirmation of squalene in tears. *Int. J. Mol. Sci.*、査読有、16、2015、21813-21831 DOI:10.3390/ijms160921813

②Yokoi N, Uchino M, Uchino Y, Dogru M, Kawashima M, Komuro A, Sonomura Y, Kato H, Tsubota K, Kinoshita S. Importance of Tear Film Instability in Dry Eye Disease in Office Workers Using Visual Display Terminals: The Osaka Study. *Am J Ophthalmol*、査読有、159、2015、748-754 DOI: 10.1016/j.ajo.2014.12.019.

③Georgiev GA, Yokoi N, Ivanova S, Tonchev V, Nencheva Y, Krastev R. Surface relaxations as a tool to distinguish the dynamic interfacial properties of films formed by normal and diseased meibomian lipids. *Soft Matter*、査読有、10、2014、5579-5588 DOI: 10.1039/c4sm00758a.

④ Yokoi N, Bron AJ, Georgiev GA. The precorneal tear film as a fluid shell: the effect of blinking and saccades on tear film distribution and dynamics. *Ocul Surf*、査読有、12、2014、252-266 DOI: 10.1016/j.jtos.2014.01.006.

[学会発表] (計 9 件)

① Yokoi N, Kawashima M, Kato H, Uchino M, Uchino Y, Dogru M, Kaido M, Tsubota K, Kinoshita S. Alteration of tear-film break-up patterns and its impact on eye dryness after long-hours driving-related work: Tokyo study. *American Academy of Ophthalmology 2015 Annual Meeting*, Las Vegas, U.S.A., 2015.11.15.

② Bron AJ, Yokoi N, Yang Z, Georgiev GA: The pre-corneal fluid shell. what is the effect of drop instillation?. *The Association for Research in Vision and Ophthalmology*, Denver, U.S.A., 2015.5.4.

③Yang Z, Yokoi N, Georgiev GAs, Niu M, Kato H, Koizumi N, Kinoshita S: Assessment of the impact of saccade on corneal topography using video-topographer. *The Association for Research in Vision and Ophthalmology*, Denver, U.S.A., 2015.5.3.

④ Georgiev GAs, Yokoi N, Eftimov P, Stefanova-Eftimova N, Ivanova S: Impact of membrane associated mucin and diquafosolon the wettability of human corneal epithelium cell lines. *The Association for Research in Vision and Ophthalmology*, Denver, U.S.A., 2015.5.3.

⑤Niu M, Yokoi N, Kato H, Sakai R, Komuro A, Sonomura Y, Koizumi N, Kinoshita S: The

comparison of 3 different methods used for the evaluation of precorneal tear film breakup time. *The Association for Research in Vision and Ophthalmology*, Orlando, U.S.A., 2014.5.5.

⑥Yokoi N, Kato H, Sakai R, Georgiev Gas, Kinoshita S: Investigation of the difference in clinical manifestations in different patterns of tear film breakup. *The Association for Research in Vision and Ophthalmology*, Orlando, U.S.A., 2014.5.5.

⑦ Georgiev GAs, Yokoi N, Ivanova S, Tonchev V, Krastev R, Lalchev Z: Investigation of surface properties of films of human meibum from normal eyes and from eyes with meibomian gland dysfunction. *The Association for Research in Vision and Ophthalmology*, Orlando, U.S.A., 2014.5.5.

⑧Georgiev GAs, Yokoi N, Ivanova S, Krastev R, Lalchev Z. Interactions of Meibomian and polar lipid films with hyaluronic acid. *7th Internatinal Conference on the Tear Film & Ocular Surface: Basic Science and Clinical Relevance*, Taormina, Sicily, Italy, 2013.9.19.

⑨Bron AJ, Yokoi N, Georgiev GA s : The tear film as a fluid shell. *7th Internatinal Conference on the Tear Film & Ocular Surface: Basic Science and Clinical Relevance*, Taormina, Sicily, Italy, 2013.9.19.

[図書] (計 2 件)

① 横井則彦、中山書店、涙液の画像診断、専門医のための眼科診療クオリファイ 2014、2-10

②横井則彦、メジカルビュー社、DR-1α、前眼部画像診断 A to Z OCT・角膜形状・派面収差の読み方、2016、382-387

[産業財産権]

該当なし

[その他]

該当なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

横井 則彦 (YOKOI Norihiko)

京都府立医科大学・大学院医学研究科・准教授

研究者番号：60191491

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし