

201034064A

厚生労働科学研究費補助金

医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業

アカントアメーバ角膜炎制御における
レンズケアの重要性

平成22年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 大橋 裕一

平成23(2011)年5月

アカントアメーバ角膜炎制御におけるレンズケアの重要性

班員構成

研究者名		所属等	職名
研究代表者	大橋 裕一	愛媛大学大学院医学系研究科 視機能外科学分野	教授
研究分担者	下村 嘉一	近畿大学医学部眼科	教授
	中田 和彦	メニコン株式会社	部長
	井上 幸次	鳥取大学医学部眼科	教授
研究協力者	白石 敦	愛媛大学大学院医学系研究科 視機能再生学講座	准教授
	稲葉 昌丸	稲葉眼科	院長
	福田 昌彦	近畿大学医学部眼科	講師

目 次

I. 総括研究報告

- アカントアメーバ角膜炎制御におけるレンズケアの重要性……………1
代表研究者 大橋 裕一

II 分担研究報告

1. 抗アカントアメーバ効果の迅速評価法の開発……………4
大橋裕一
2. 市販ソフトコンタクトレンズ消毒剤の抗アメーバ効果の研究 ……7
大橋裕一
3. アカントアメーバ角膜炎の全国定点調査……………11
下村 嘉一
4. アカントアメーバに対する擦り洗い試験……………14
中田 和彦
5. コンタクトレンズケース汚染の多施設調査成績……………17
井上 幸次

III 研究成果の刊行に関する一覧表……………20

厚生労働科学研究費補助金（医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業）
総括研究報告書

アカントアメーバ角膜炎制御におけるレンズケアの重要性

研究代表者 大橋 裕一 愛媛大学眼科学 教授

研究要旨 本研究は、コンタクトレンズ関連角膜炎の中でも、難治性であり、近年急増したアカントアメーバ角膜炎の制御に向けて種々の視点から解決策、対応策を模索することを目的としている。

研究計画の骨子は、①レンズケアに広く使用されている各種消毒剤を対象に、効力比較試験と添加剤による効力阻害試験を実施すること。②レンズ消毒剤の抗アメーバ効果に係る試験方法の迅速化を検討すること。③アカントアメーバとコンタクトレンズとの親和性、擦り洗いおよびすすぎによる物理的除去効果について検討すること。④全国診療拠点をベースにアカントアメーバ角膜炎の発症動向を経年的に追跡すること。⑤コンタクトレンズ診療に精通した医師の診療所を定点にレンズケースなどの汚染状況について調査すること。の5つからなっている。

1年目の本年は、我が国で市販されているレンズ消毒剤の抗アメーバ効果の検討、生体色素を用いた抗アメーバ効果の迅速評価法の開発、アカントアメーバのコンタクトレンズへの付着性の検討、全国定点調査に向けたウェブサイトの整備、全国定点診療所におけるレンズケースの汚染実態調査などを行った。

A. 研究目的

本研究の目的は、近年問題となっているコンタクトレンズ関連角膜炎の中でも、最も難治性であり、かつ増加しつつあるアカントアメーバ角膜炎に焦点を絞り、その制御に向けた方策を種々の視点から検討することにある。

対策を練る上での問題点は、アカントアメーバに対する消毒剤の評価基準がグローバルにも未だ定まっていない点にある。また、実験結果が得られるまでに少なくとも2週間を要する点も研究の進展を妨げる大きな障害である。そこで、本研究では、生体色素を用いて抗アメー

バ効果評価法の迅速化を検討するとともに、擦り洗いやすすぎを併用する中で、確実なレンズ消毒法について提案したい。

その一方で、レンズケアに関する啓発活動の波及効果を確認するためにも、アカントアメーバ角膜炎の発生動向をモニターすることは重要であり、発生の基盤となるレンズケースの汚染状況についても信頼できるデータを収集することが必要となる。

B. 研究方法

1. レンズ消毒剤の抗アメーバ効果評価法の

迅速化の試み

現在用いられているアcantアメーバに対する消毒効果の試験法は結果の解析までに長期間を要するのが難点である。これについては、生菌選択的蛍光染色法のひとつである 5-Cyano-2,3-ditolyl-2H-tetrazolium chloride (CTC) 染色色素を用いた迅速評価法を採り上げ、現在広く実施されている log reduction 法との相関性について検討した。

2. 市販レンズ消毒剤の効力比較試験

我が国においてレンズケアに広く使用されている種々のレンズ消毒剤を対象に、その抗アメーバ効果について log reduction 法を用いて比較検討した。アcantアメーバ(ATCC50514株)は栄養体および2週齢シストを用い、各種消毒剤とは2, 4, 8, および24時間接触させた。

3. アcantアメーバのソフトコンタクトレンズ (SCL) への親和性および擦り洗いの効果の検討

アcantアメーバがどの程度 SCL に親和性を有するかは、感染病理を考える上で重要である。そこで、種々の SCL にアcantアメーバを接触させた後、上述のアッセイ法に準じて残存したアcantアメーバを定量し親和性を検討した。また、レンズ消毒剤で処理したアcantアメーバについても、残存アcantアメーバを定量し、除去効果を比較検討した。

4. アcantアメーバ角膜炎発症動向の全国定点調査

日本コンタクトレンズ学会および眼感染症学会が共同で実施していた CL 関連重症角膜感染症スタディの2年間の総括を踏まえ、全国 15

の大学附属病院をベースに、ウェブによるアンケート調査を行い、アcantアメーバ角膜炎の発生状況を経年的に追跡することとした。

5. レンズケース汚染状況の定点診療所調査
コンタクトレンズ診療に精通した医師の診療所 5カ所を基点に、レンズケースの汚染動向を調査することとした。一定期間内に上記の診療所に来院したユーザーからコンタクトレンズケースを回収し、愛媛大学へ郵送、レンズケースの培養(細菌、真菌、アcantアメーバ)を行うとともに、鳥取大学においてアcantアメーバに対する real-time PCR を実施した。

C. 研究結果

1. レンズ消毒剤の抗アメーバ効果評価法の迅速化の試み

CTC 染色を用いた抗アメーバ効果は、特に栄養体において log reduction 法による定量結果と高い相関を示した。シストについても一定の相関を示したが、さらなる感度向上のために、今後アッセイ法の改良が必要である。

2. 市販レンズ消毒剤の効力比較試験

栄養体に対しては、過酸化水素製剤およびポピドンヨード製剤が高い抗アメーバ効果(4 log 以上)を示したが、MPS(multi-purpose solution:多目的用剤)の消毒効果は全般的に弱く、製品間のばらつきも大きかった。シストに対してはいずれの消毒剤の効果も不十分であり、ポピドンヨード製剤でも 2log 内外にとどまった。

3. アcantアメーバのソフトコンタクトレンズ (SCL) への親和性および擦り洗いの効果の検討

上記の効力試験で消毒効果の高かった MPS は SCL へのアcantアメーバ接着性を低減させることが判明した。ケア方法として、「浸漬のみ」ではアcantアメーバの増殖が認められたが、「すすぎ+浸漬」および「こすり+すすぎ+浸漬」では一部の MPS を除いて認められなかった。

4. アcantアメーバ角膜炎発症動向の全国定点調査

アンケート項目の確定を含むウェブの整備は終了し、現在、患者登録に向けて各施設に要請中である。現時点では、予備的な検討の域を出ないが、減少傾向がうかがわれる。

5. レンズケース汚染状況の定点診療所調査

SCL 使用者 237 例、HCL 使用者 114 例の CL ケース汚染状況を検討したところ、全体の 32.6% (126 / 387 例) に細菌、真菌による汚染がみられ、CL の種類別では SCL 群で 27%、HCL 群では 51%と後者で高い分離率を示した。アcantアメーバは培養にては検出されなかったが、real time PCR では、全例 10 コピー以下と微量であったものの検出率は 19.1% (74/387 例) に達した。

D. 考察

市販コンタクトレンズ消毒剤の抗アcantアメーバ効果が十分でないことが改めて立証され、レンズケアにおけるすすぎ・擦り洗いの重要性とその啓発の必要性が示唆された。また、抗アメーバ効果を評価する上で、CTC Assay が迅速簡便な検査法となる可能性が示された。アcantアメーバ角膜炎の発症動向についてはウェブサイト開設などの準備が終了したこと

を受け、鋭意、調査を実施していきたい。一方、レンズケース汚染状況調査が示すように、比較的ケアレベルの高いユーザーを対象としても、一定の率でケース汚染は存在している。レンズケアに関するユーザー教育の重要性が再認識された。

E. 結論

発症動向調査に多少の遅れはあったが、アcantアメーバ角膜炎の制御に向けて、特に、抗アメーバ効果迅速評価法の開発、およびレンズケース汚染の実態把握などにおいて、今後には有益な成果が得られたものと考えられる。

F. 研究発表 (平成 22 年度)

論文発表

各分担の項および巻末に記載した

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得：なし
2. 実用新案登録：なし
3. その他：なし

分担研究報告書

抗アcantアメーバ効果の迅速評価法の開発

研究分担者 大橋裕一

研究要旨 アcantアメーバ角膜炎 (AK) が増加している背景に多目的製剤 (MPS) が関与していると示唆されるが、国際標準化機構 (ISO) で採用されている SCL 消毒評価試験 (ISO14729 standard during development of the products) “スタンダードロンテスト” にアcantアメーバに対する消毒効果が含まれていない。アcantアメーバに対する薬剤や MPS の消毒効果に対する統一した評価方法がなく、標準となりつつある log reduction 法は比較的正確に消毒効果を反映する方法として認められてきてはいるが、試験方法としては2~3週間という長期の日数を要する難点がある。そこで、比較的短期的に消毒効果を判定する方法を開発すれば、薬剤開発にとって非常に有用となる。本研究では、生菌選択的蛍光染色法のひとつである 5-Cyano-2,3-ditolyl-2H-tetrazolium chloride (CTC) 染色を用いた試験法の検討を行った。

A. 研究目的

本研究では、アcantアメーバ栄養体またはシストに対する PHMB の消毒効果を生菌選択的蛍光染色法のひとつである 5-Cyano-2,3-ditolyl-2H-tetrazolium chloride (CTC) 染色を用いた試験法の検討を行い、log reduction 法は比較的正確に消毒効果を反映する方法として認められてきてはいるが、試験方と比較検討した。

B. 研究方法

① アcantアメーバ栄養体およびシスト

実験には *Acanthamoeba castellanii*

(ATCC50370) を用いた。栄養体の培養は PYG 培地 (ATCC medium 712) を用いて 25°C で行った。また、栄養体の培地を Neff' s constant pH encystment medium に交換することでシスト化を誘導した。シスト化誘導後2週間以上経過したシストを実験に供した。

② CTC 染色

栄養体の CTC 染色に当たっては、菌体を遠心分離により回収後、PBS 1.8 ml に懸濁、900 μ l ずつ2等分し、100 μ l の H₂O または 20 mg/ml アジ化ナトリウム (NaN₃) を添加した。CTC 染色は Bacstain-CTC Rapid Staining Kit (for Microscopy) (株同仁化学研究所) を用い、25°C

で 30 min 行った。染色後 1 ml の 4%PFA を加えて固定した (4°C, 30 min)。

シストの CTC 染色に当たっては、試料を 10 ml PYG (0.2 μ m filtered) に懸濁し、CTC 染色前のプレインキュベート (25°C, 16h) を行った。プレインキュベート後遠心分離により回収し、栄養体と同様に染色と固定を行った。

固定後の栄養体またはシストは遠心分離後 1 ml PBS に懸濁、200 μ l ずつガラスボトムの 96 well plate に移し、蛍光顕微鏡での観察を行った。CTC ホルマザンの蛍光の検出は、励起波長 480 nm、蛍光波長 630 nm で行った。

③ アカントアメーバの消毒剤処理

アカントアメーバ栄養体またはシストを塩酸ポリヘキサニド (PHMB) 溶液 (1/4 リンゲル中、0.2 ppm、1 ppm、10 ppm、100 ppm、または 300 ppm) 40 ml に懸濁し (5x10⁴/ml)、25°C で 4h 静置した。また、コントロールとして 1/4 リンゲルを用い、同様に処理を行った。

④ CTC Assay

消毒剤または 1/4 リンゲル (コントロール) 処理後の栄養体またはシストを遠心分離により回収、1/4 リンゲルで 1 回洗浄後、上記の方法で CTC 染色と固定を行った。固定後の試料は 1 ml PBS に懸濁し、200 μ l ずつ 96 well plate に移した。試料の蛍光強度測定には蛍光プレートリーダー (FlexStation 3, Molecular Devices) を用いた。NaN₃ は細胞の呼吸活性を阻害するため、NaN₃ 添加試料の蛍光をブランクとして差し引くことで、呼吸活性由来の蛍光強度を求めた。1/4 リンゲル処理後 (コントロール) の蛍光強度を 100% とし、各消毒剤処理後の残存呼吸活性を求めた。

⑤ 培養による生残アカントアメーバの定量 (log reduction 法)

消毒剤処理後のアカントアメーバ懸濁液 100 μ l (5x10⁴/ml) を Dey Engley Neutralizing Broth および PYG 培地で 10 倍段階希釈し、4 希釈段階を調製した (5x10³, 5x10², 5x10¹, 5x10⁰/ml)。各希釈段階の試料を 200 μ l ずつ 96 穴プレートの 4 穴に分注し 25°C で培養した。1 週間 (栄養体) または 3 週間 (シスト) 以上培養後に増殖の認められた穴数を計数し、Spearman-Kärber 法にて生残アカントアメーバ数を求めた。1/4 リンゲル処理後のアカントアメーバ数を 100% とし、各消毒剤処理後の生残率を求めた。

(倫理面への配慮)

この研究には適用されない。

C. 研究結果

① CTC 染色

CTC 染色後の栄養体では、CTC ホルマザン由来の強い赤色蛍光が認められ、CTC ホルマザンの結晶が栄養体内に蓄積している様子が観察された。一方で、NaN₃ を添加した場合には CTC ホルマザンの結晶は認められず、弱い自家蛍光だけが認められた。シストに対しては、PYG 培地中でのプレインキュベート (25°C, 16 h) を行うことで、CTC ホルマザン由来の強い赤色蛍光が認められ、CTC ホルマザンの結晶がシスト内に蓄積している様子が観察された。一方で、NaN₃ を添加した場合には CTC ホルマザンの結晶は認められず、弱い自家蛍光だけが認められた。

② CTC Assay

PHMB 処理後の栄養体に対し CTC 染色を行い、その蛍光強度を蛍光プレートリーダーにて測定し、処理後の残存呼吸活性を調べたところ、0.1 ppm から 5 ppm の範囲で PHMB 濃度依存的な残存呼吸活性の低下が認められた。また、10 ppm の PHMB で処理した時、CTC 染色により求められた残存呼吸活性は 1%未満であった。同時に log reduction 法により求めた栄養体の生残率についても 0.1 ppm から 5 ppm の範囲において PHMB 濃度依存的な低下が認められた。5 ppm の PHMB で処理した時には 0.02%のアカントアメーバの生残が認められたが、10 ppm では検出限界以下であった。

次に、PHMB 処理後のシストに対し CTC 染色を行い、その蛍光強度を蛍光プレートリーダーにて測定し、処理後の残存呼吸活性を調べたところ、1 ppm では 37.6%、10 ppm では 1.5%、100 ppm では 1.0%、300 ppm では 1%未満であった。同時に log reduction 法により求めたシストの生残率は、1 ppm では 30.3%、10 ppm では 0.4%、100 ppm では 0.01%、300 ppm では検出限界以下であった。

D. 考察

本研究では PHMB の抗アカントアメーバ効果について標準的な試験方法と認識されつつある log reduction 法と CTC Assay 法について比較検討した。その結果、両試験方法はアカントアメーバ栄養体、シストに対する効果ともに非常に有意な相関を示した。Log reduction 法の試

験結果が出るのに 2～3 週間の長期間を有するのに対して、CTC Assay は数日で結果を得ることができるため、有用な抗アカントアメーバ試験方法となりえる可能性が示された。

E. 結論

本研究により CTC Assay がアカントアメーバ消毒効果の簡便な検査法である可能性が示された。

F. 研究発表（平成 22 年度）

論文発表

次項にまとめて記載

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得：なし
2. 実用新案登録：なし
3. その他：なし

市販ソフトコンタクトレンズ消毒剤の抗アメーバ効果の研究

研究分担者 大橋 裕一 愛媛大学眼科学 教授

研究要旨 アカントアメーバに対するレンズ消毒剤の抗アメーバ効果については、多くの研究施設や消毒剤製造業者の報告があるが、統一された評価方法がないため、結果を比較することがしばしば困難であり、国内で市販されているレンズ消毒剤についても系統的に評価したデータはない。そこで、本研究では、本邦で市販されている主要 MPS 8 種類、過酸化水素製剤 2 種類、ポピドンヨード製剤 1 種類を対象に、アカントアメーバ栄養体、シスト化 1 週目、2 週目のアカントアメーバに対する消毒効果について検討を行った。

A. 研究目的

アカントアメーバ角膜炎(AK)は、頻回交換ソフトコンタクトレンズ装用者で、かつ、多目的用剤(MPS)を使用しているユーザーに多発することが知られている。この背景にはレンズケース内におけるアカントアメーバの繁殖があり、これを許容するコンタクトレンズ消毒剤の抗アメーバ効果の弱さが指摘されている。また、2003年7月より国際標準化機構(ISO)で採用されているSCL消毒評価試験“スタンドアロンテスト”にアカントアメーバに対する消毒試験が含まれていないことも問題である。そこで、本研究では、我が国で市販されているソフトコンタクトレンズ消毒剤について、アカントアメーバの栄養体またはシストに対する効力を比較検討した。

B. 研究方法

1. 市販ソフトコンタクトレンズ洗浄保存液

本試験では8種類の多目的製剤(MPS)、2種類の過酸化水素製剤、1種類のポピドンヨード製剤を対象とした。

2. アカントアメーバ栄養体およびシスト

アカントアメーバは *Acanthamoeba castellanii* ATCC50514 株を用いた。栄養体は、PYG 培地(ATCC medium 712)を用い、シストは、シスト化培地(Neff's constant-pH encystment medium)にて誘導した。シスト化誘導開始1週間後のシストを1週齢シスト、2週間後のシストを2週齢シストとした。

3. ソフトコンタクトレンズ洗浄保存液効力試験

試験方法は log reduction 法を用いて行った。栄養体またはシストをリンゲル溶液 1/4 濃度にて懸濁し、 5×10^6 /ml とし、各種 MPS、過

酸化水素製剤、ポピドンヨード製剤にアメーバ懸濁液を 1/100 量加えて 5×10^4 /ml として 25°C で 2、4、8、または 24 時間処理後、PYG 培地で 10 倍階段希釈することで、アメーバの最終濃度を 5×10^3 , 5×10^2 , 5×10^1 , 5×10^0 /ml とした。それぞれの希釈液を 96 穴組織培養プレートで培養を行い、アメーバの増殖の有無を位相差顕微鏡で確認し、Spearman-Kärber 式にてアメーバの生存数を計算した。

(倫理面への配慮)

この研究には適用されない。

C. 研究結果

1. MPS 製剤の効力

① 栄養体に対する効力

MPS 製剤によるアcantアメーバ栄養体に対する効力を調べた結果、製剤による明らかな効力差が認められた。5 種類の MPS の効力は比較的 low、4 時間の処理では、栄養体を 1.2 log 以上減少させることは出来なかった。一方、3 種類の MPS は栄養体に対する比較的高い効力を示した。

② 1 週齢シストに対する効力

栄養体に対するのと同様に、効力には MPS 製剤による明らかな差が認められた。2 種類の MPS の効力は比較的 low、推奨消毒時間内 (4 時間) の処理では、0.6 log 以上減少させることが出来なかった。栄養体に対する効果の比較的低い MPS の内 3 種類では 4 時間処理において、それぞれ 1.1 log、2.8 log、1.9 log 減少させ、中間的な効力を示した。一方、3 種類の MPS は、栄養体に対するのと同様に、比較的高い効力を

示した。

③ 2 週齢シストに対する効力

MPS 製剤の 2 週齢シストに対する効力はほとんどなく。わずか 1 種類の MPS で推奨消毒時間内 (4 時間) の処理により 1.2 log 減少させるにとどまった。

2. 過酸化水素製剤の効力

2 種の過酸化水素製剤は、MPS 製剤に比べ、栄養体および 1 週齢シストに対する高い効力を示した。過酸化水素製剤による 2 時間以上の処理は、栄養体および 1 週齢シストを 3 log 以上減少させた。一方で、2 週齢シストに対する効力は比較的 low かった。過酸化水素製剤による 4 時間の処理は、2 週齢シストを 0.9 log から 1 log 減少させるにとどまった。

3. ポピドンヨード製剤の効力

ポピドンヨード製剤は栄養体、1 週齢シストおよび 2 週齢シストに対し、MPS 製剤に比べて高い効力を示した。ポピドンヨード製剤による 2 時間以上の処理は、栄養体および 1 週齢シストを 3 log 以上減少させた。また、ポピドンヨード製剤による 4 時間以上の処理は、2 週齢シストを 2.4 log から 2.6 log 減少させた。

D. 考察

本研究では市販 MPS 製剤による抗アcantアメーバ効果消毒効果に違いがあることが証明された。一部の MPS 製剤はアcantアメーバ栄養体に対して消毒効果を示すものの、一方で、栄養体・シストともにほとんど消毒効果のない MPS が存在することが明らかとなったほか、成熟したシストに対してはすべての MPS に効果

がないことも示された。一方で、過酸化水素製剤とポピドンヨード製剤は、栄養体に対して比較的高い抗アメーバ効果を持つこと、中でもポピドンヨード製剤は成熟したシストに対してもある程度の消毒効果を示すことも判明した。現在、SCL 消毒剤の評価試験にはアカントアメーバに対する消毒効果は求められていないが、本研究結果により、今後、評価試験の再検討の必要性が示唆された。

E. 結論

本研究により市販ソフトコンタクトレンズ消毒剤の抗アメーバ効果に製品較差があることが明らかとなった。特にシストに対しては効果を期待できない。

F. 研究発表（平成 22 年度）

論文発表

1. 稲葉 昌丸, 井上 幸次, 植田 喜一, 宇野敏彦, 江口 洋, 大橋 裕一, 下村 嘉一, 外園 千恵, 田川 義継, 近間 泰一郎, 福田 昌彦, 古川 敏仁 重症コンタクトレンズ関連角膜感染症調査からみた危険因子の解析 日本コンタクトレンズ学会誌 52(1): 25-30, 2010
2. Shiraishi A, Uno T, Oka N, Hara Y, Yamaguchi M, Ohash Y. In vivo and in vitro Laser Confocal Microscopy to Diagnose Acanthamoeba Keratitis. *Cornea*. Aug;29(8):861-5.
3. Takezawa Y, Shiraishi A, Noda E, Hara Y, Yamaguchi M, Uno T, Ohashi Y. Effectiveness of In Vivo Confocal Microscopy in Detecting Filamentous Fungi During Clinical Course of Fungal Keratitis. *Cornea*. 2010

Dec;29(12):1346-52

4. Takeshi Kobayashi, Lindsay Gibbon, Tsuyoshi Mito, Atsushi Shiraishi, Toshihiko Uno, Yuichi Ohashi. Efficacy of Commercial Soft Contact Lens Disinfectant Solutions Against Acanthamoeba. *Jpn J Ophthalmol* 2011 in press
5. 宇野敏彦, 福田昌彦, 大橋裕一, 下村嘉一, 石橋康久, 稲葉昌丸, 井上幸次, 植田喜一, 江口洋, 白石敦, 外園千恵, 田川義継, 近間泰一郎重症コンタクトレンズ関連角膜感染症全国調査 日本眼科学会雑誌 115 巻 2 号 Page107-115.
6. 植田喜一, 糸井素純, 大橋裕一, 木下茂, 高橋和博, 宇津見義一, 山田昌和, 福下公子, 白井正一郎, 高野繁, 大瀧守彦, 大橋敏夫, 溝口隆久, 早川豪一, 柘植益郎, 田中英成, 日本コンタクトレンズ協議会インターネットによるコンタクトレンズ眼障害アンケート調査の集計結果報告(平成 21 年度) 日本の眼科 (0285-1326)81 巻 11 Page1457-1462

学会発表

1. 池田欣史、矢倉慶子、魚谷竜、大谷史江、三宅敦子、石倉涼子、宮崎大、井上幸次、水戸毅、白石敦、大橋裕一、佐伯有祐、八木田健司 アカントアメーバ角膜炎に対する real-timePCR の有用性第 114 回日本眼科学会総会(名古屋) 4/15-4/18, 2010.
2. 水戸 毅、小林 剛、白石 敦、大橋裕一、石橋康久 各種ソフトコンタ

クトレンズ消毒剤の抗アcantアメー
バ効力試験成績スリーサム・イン新宿
(東京) 7/9-7/11, 2010.

3. 宇野敏彦、福田昌彦、大橋裕
一 コンタクトレンズ関連角膜炎
全国調査患者アンケート最終報告 ス
リーサム・イン新宿 (東京) 7/9-7/11,
2010.

4. Tsuyoshi MITO, Lindsay
GIBBON, Takeshi KOBAYASHI, Xiaodong
ZHENG, Atushi SHIRAIISHI, Yuichi
OHASHI Influence of acanthamoeba
cyst maturity on its sensitivity to
multipurpose solution(MPS) The 25th
APAO Congress - A Joint Meeting of
APAO/AAO (北京) 9/16-9/20, 2010.

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得：なし
2. 実用新案登録：なし
3. その他：なし

アカントアメーバ角膜炎の全国定点調査

研究分担者 下村 嘉一 近畿大学眼科学 教授

研究要旨 コンタクトレンズ関連角膜炎の実態を把握する目的に日本コンタクトレンズ学会および日本眼感染症学会では2年間にわたり全国の眼科施設に入院を要する重症のCL関連角膜炎に関するアンケート調査を行い、主要病原体、臨床所見、レンズケアレベルなどについて解析した。これに基づき、全国の15大学附属病院を選定し、特に問題となっているアカントアメーバ角膜炎の発症状況につき調査することとした。

A. 研究目的

21世紀に入り、若年者を中心としたコンタクト(CL)関連角膜炎が増加傾向にあり、中でも緑膿菌やアカントアメーバなどによる重症の角膜炎の増加が社会問題化している。この背景には、CLユーザーの増加、不適切なCLケアの実施、CL専門量販店での購入、コンタクトレンズ消毒剤の消毒力低下など、様々な因子の関与が指摘されている。本研究では、その中でも特に難治とされるアカントアメーバ角膜炎の発症状況について、ウェブサイトを用いたアンケート調査により経年的にモニターすることとした。

B. 研究方法

コンタクトレンズ関連角膜炎の全国調査結果を受け、今後、定点施設を定め、発症数について長期的な視点で調査を継続していくこととした。

定点施設には日本眼感染症学会評議員の所属す

る大学附属病院が最も適当であり、近畿大学医学部附属病院(担当責任施設)、愛媛大学医学部附属病院、鳥取大学医学部附属病院、京都府立医科大学附属病院、北海道大学医学部附属病院、東京医科大学附属病院、大阪大学医学部附属病院、筑波大学医学部附属病院、日本大学医学部附属病院、徳島大学医学部附属病院、東京女子医科大学附属病院、東北大学医学部附属病院、山口大学医学部附属病院、順天堂大学医学部附属病院、金沢医科大学附属病院を選定した。

症例集積のためにウェブサイトを構築し、患者背景因子として、年齢、性別、使用CL、レンズ消毒剤などについて記入することとした。

(倫理面への配慮)

この研究は、非匿名化したアンケート調査であり、被験者に対する利益・不利益は生じない。

C. 研究結果

現在、ウェブサイトの構築は終了したが、各施設における倫理委員会での申請作業に時間を要しており、一部の施設でしかデータの登録が進んでいないが、今後、数ヶ月で事態は好転する見込みである。

なお、限られた5施設でのデータではあるが、2010年におけるアcantアメーバ角膜炎の患者数は、2009年に比較して半減している。

D. 考察

アcantアメーバ角膜炎は最も難治なCL関連角膜感染症であり、その発生動向を把握することは、有効な対応策を練る上で不可欠である。特に、日本眼科学会、日本眼科医会、および日本コンタクトレンズ学会では、レンズケアに関する啓発活動（擦り洗い、すすぎ、レンズケースの乾燥と定期的交換）に力を入れており、3年間の動向をモニターすることにより、その成果を明らかにできるのではないかと期待される。

E. 結論

アcantアメーバ角膜炎の発症数の全国調査の本格的実施に向けた環境が整いつつある。

F. 研究発表（平成22年度）

論文発表

1. Sugioka K, Yoshida K, Kodama A, Mishima H, Abe K, Munakata H, Shimomura Y. Connective tissue growth factor cooperates with fibronectin in enhancing attachment and migration of corneal epithelial cells. *Tohoku J. Exp. Med*222(1): 45-50, 2010
2. Ito Y, Nagai N, Shimomura Y Reduction in intraocular pressure by the instillation of eye drops containing disulfiram inCLuded with 2-Hydroxypropyl-β-cyCLodextrin in rabbit Biol Pharm Bull33(9): 1574-1578, 2010
3. Shimomura Y, Higaki S, Watanabe K Suppression of Herpes Simplex Virus 1 Reactivation in a Mouse Eye Model by CyCLOoxygenase Inhibitor, Heat Shock Protein Inhibitor, and Adenosine Monophosphate *Jpn J Ophthalmol* 54(3): 187-190, 2010
4. Itahashi M, Higaki S, Fukuda M, Shimomura Y. Detection and quantification of pathogenic bacteria and fungi using real-time polymerase chain reaction by cyCLing probe in patients with corneal ulcer *Arch Ophthalmol*128(5): 535-540, 2010
5. 稲葉 昌丸, 井上 幸次, 植田 喜一, 宇野敏彦, 江口 洋, 大橋 裕一, 下村 嘉一, 外園 千恵, 田川 義継, 近間 泰一郎, 福田 昌彦, 古川 敏仁 重症コンタクトレンズ関連角膜感染症調査からみた危険因子の解析 *日本コンタクトレンズ学会誌* 52(1): 25-30, 2010
6. Kuniyoshi K, Irifune M, Uno N, Nakao A, Shimomura Y Oscillatory Potentials with Repeated-Flash Electroretinography *Jp J Ophthalmol* 54(1): 32-35, 2010
7. 宇野敏彦, 福田昌彦, 大橋裕一, 下村嘉一, 石橋康久, 稲葉昌丸, 井上幸次, 植田喜一, 江口洋, 白石敦, 外園千恵, 田川義継, 近間泰一郎重症コンタクトレン

ズ関連角膜感染症全国調査 日本眼科学会
雑誌 115 巻 2 号 Page107-115.

8. 植田喜一, 糸井素純, 大橋裕一, 木下茂,
高橋和博, 宇津見義一, 山田昌和, 福下
公子, 白井正一郎, 高野繁, 大瀧守彦,
大橋敏夫, 溝口隆久, 早川豪一, 柘植益
郎, 田中英成, 日本コンタクトレンズ協
議会インターネットによるコンタクトレ
ンズ眼障害アンケート調査の集計結果報
告(平成 21 年度) 日本の眼科
(0285-1326)81 巻 11 Page1457-1462

学会発表

宇野敏彦、福田昌彦、大橋裕一 コンタクトレ
ンズ関連角膜感染症全国調査患者アンケート
最終報告 スリーサム・イン新宿(東京)
7/9-7/11, 2010.

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得：なし
2. 実用新案登録：なし
3. その他：なし

厚生労働科学研究費補助金(医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究)
分担研究報告書

アカントアメーバに対する擦り洗い試験

研究分担者 中田 和彦

研究要旨 コンタクトレンズ着用者におけるアカントアメーバ角膜炎(AK)の発生機序の一つとして、レンズケース中で増殖したアカントアメーバがコンタクトレンズ表面に接着して前眼部に運ばれ、角膜表面に感染する可能性が考えられる。そこで、市販のシリコーンハイドロゲルコンタクトレンズ5種類へのアカントアメーバの接着性を比較し、市販MPS 7種類のアカントアメーバ接着性への影響を評価した。また、コンタクトレンズ表面に接着したアカントアメーバを除去するためには、こすり洗いなどの確実なケア方法の実践が重要と考えられる。そこで、アカントアメーバをあらかじめ接着させたシリコーンハイドロゲルコンタクトレンズを準備し、「浸漬」、「すすぎ+浸漬」、「こすり+すすぎ+浸漬」の3種のケア方法によるアカントアメーバ除去効果を比較検討した。

A. 研究目的

本研究では、アカントアメーバ栄養体の各種シリコーンハイドロゲルコンタクトレンズに対する接着性を比較し、さらにMPSの影響を検討する。さらに、あらかじめコンタクトレンズに接着させたアカントアメーバに対する擦り洗いによる除去効果についても検討する。

B. 研究方法

① アカントアメーバ栄養体

実験には *Acanthamoeba castellanii* (ATCC50370) を用いた。栄養体の培養は PYG 培地 (ATCC medium 712) を用いて 32°C で行った。

② コンタクトレンズに対するアカントアメーバの接着性

本試験では市販の5種類のシリコーンハイドロゲルコンタクトレンズ (Asmofilcon A, Galyfilcon A, Senofilcon A, Lotrafilcon B, Balafilcon A) を直径 5mm のディスク状にくりぬいた試験プレートを使用した。1/4 Ringer Solution を用い、アカントアメーバ濃度 1×10^5 cell/mL に調整した懸濁液を準備した。96well プレートに 1/4 Ringer solution を 100 μ L ずつ分注し、試験プレートに浸漬した。アカントアメーバ懸濁液を 50 μ L 接種して室温で 4 時間放置し、コンタクトレンズに接着したアカントアメーバを位相差顕微鏡下で計数した。

③ アカントアメーバのコンタクトレンズ接着性に対するMPSの影響

本試験では市販の7種類のMPS（エピカコールド、エピカコールドアクアモア、レニューマルチプラス、オプティフリープラス、コンプリートアミノモイスト、コンプリートダブルモイスト、Cキューブソフトワンモイス）を用いた。試験プレートとして Balafilcon A を用いた。試験プレートを挿入した 96well プレートにアカントアメーバ懸濁液 50 μ L を接種し、各種MPSを 100 μ L ずつ分注した。室温で 24 時間放置し、コンタクトレンズに接着したアカントアメーバを位相差顕微鏡下で計数した。

④ アカントアメーバに対する擦り洗い試験

本試験では試験レンズとして Balafilcon A をそのまま用いた。市販MPSとしてエピカコールド、レニューフレッシュ（レニューマルチプラスと同等品）、オプティフリープラス、Cキューブソフトワンモイスを、対照としてPBSを用いた。試験レンズの凹面に 1×10^4 個のアカントアメーバを接種し、約 2 時間乾燥させた。その後、「4 時間浸漬」、「すすぎ（レンズ両面各 5 秒間）+浸漬」、「こすり（20 秒間）+すすぎ+浸漬」のいずれかの処理を行い、レンズ表面を位相差顕微鏡で観察して写真撮影した。レンズを PYG 培地に移して 32 $^{\circ}$ C で 14 日間培養し、アカントアメーバ増殖の有無を確認した。

（倫理面への配慮）

この研究には適用されない。

C. 研究結果

① コンタクトレンズに対するアカントアメーバの接着性

接種 4 時間後のアカントアメーバ栄養体の接着数は Asmofilcon A (22 \pm 6 個), Galyfilcon A (38 \pm 19 個), Senofilcon A (16 \pm 14 個), Lotrafilcon B (212 \pm 119 個), Balafilcon A (232 \pm 89 個)であった。Lotrafilcon B と Balafilcon A への接着数は有意に高かった。

② アカントアメーバのコンタクトレンズ接着性に対するMPSの影響

接種 24 時間後の Balafilcon A への接着数はエピカコールド (10 \pm 6 個)、エピカコールドアクアモア (28 \pm 17 個)、レニューマルチプラス (9 \pm 4 個)、オプティフリープラス (34 \pm 16 個)、コンプリートアミノモイスト (64 \pm 39 個)、コンプリートダブルモイスト (32 \pm 19 個)、Cキューブソフトワンモイス (88 \pm 59 個)であった。Cキューブソフトワンモイスで処理したアカントアメーバの接着数が他のMPSより有意に高く、対照の 1/4 Ringer Solution (143 \pm 60 個)との間に有意差がなかった。顕微鏡観察ではエピカコールド、エピカコールドアクアモア、レニューマルチプラス処理アカントアメーバは球形化していたのに対して、オプティフリープラス、コンプリートアミノモイスト、コンプリートダブルモイスト、Cキューブソフトワンモイスでは栄養体形状を維持していた。

③ アカントアメーバに対する擦り洗い試験

すべての試験群において、試験レンズへの接着アカントアメーバ数は「浸漬」 > 「すすぎ+浸漬」 > 「こすり+すすぎ+浸漬」の順で多かった。「すすぎ+浸漬」および「こ

すり+すすぎ+浸漬」ではエピカコールド、レニューフレッシュ、オプティフリープラスで培養後にアcantアメーバの増殖を認めなかったが、Cキューブソフトワンモイスでは増殖を認めた。

D. 考察

シリコーンハイドロゲルコンタクトレンズの中では Lotrafilcon B と Balafilcon A へのアcantアメーバ接着性が有意に高かったが、含水率、接触角、表面処理などコンタクトレンズの物性との関連は不明であった。別途試験したアcantアメーバシストの Balafilcon A への接着数は 7 ± 4 個であり、栄養体と比較して有意に低かった。MP S の比較では、消毒効果の低いCキューブソフトワンモイス（分担研究報告書「市販ソフトコンタクトレンズ消毒剤の抗アメーバ効果に対する研究」参照）のコンタクトレンズ接着性が有意に高かった。顕微鏡観察で栄養体形状を維持していたオプティフリープラス、コンプリートアミノモイスト、コンプリートダブルモイスト、Cキューブソフトワンモイスではコンタクトレンズへの接着性が高い傾向が示された。こすり洗いの効果については定性的な結果しか得られていないが、定量的手法を用いた研究の継続が重要と考えられる。

E. 結論

アcantアメーバの角膜への感染はコンタクトレンズを介して起こると考えられている。アcantアメーバ角膜炎のリスクを可能な限

り低減させるためには、アcantアメーバ接着性の低いコンタクトレンズと消毒効果の高いMP S を選択することが重要と考えられる。また、消毒効果の高いMP S はアcantアメーバを球形化させることで、コンタクトレンズへの接着性を低減させる効果が期待される。コンタクトレンズユーザーは「こすり+すすぎ+浸漬」法で確実にアcantアメーバを除去することが重要である。

F. 研究発表（平成 22 年度）

論文発表

7. Uno T, Ohashi Y, Nomachi M, Imayasu M. Effects of Multi-Purpose Contact-Lens Care Solutions on the Adhesion of Acanthamoeba to Silicone Hydrogel Contact Lenses. Cornea 2011 in press

学会発表

1. なし

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得：なし
2. 実用新案登録：なし
3. その他：なし

厚生労働科学研究費補助金(医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究)
分担研究報告書

コンタクトレンズケース汚染の多施設調査成績

研究分担者 井上 幸次 鳥取大学眼科学 教授

研究要旨 2006年に眼感染症学会が行ったサーベイランスでは若年者の角膜感染症患者に占めるCL装用者の割合が非常に高いことが指摘されており、近年では特にアカントアメーバ角膜炎の増加が問題となっている。さらに、2009年にCL関連角膜感染症全国調査委員会が行った報告では、CL関連角膜感染症患者のほとんどが交換タイプSCLを使用しており、CL関連角膜感染症患者の半数以上が適切なCL装用、ケアを行っていないことが明らかとなった。本研究では、CLケアの指導によりCLケース汚染がどの程度予防可能か検討することを目的に、全国のCL指導を熱心におこなっている眼科開業医に定期的に通院しているコンプライアンスの良好なCLユーザーを対象に、アンケート調査とともにCLケースを回収してCLケースの汚染動向を検討した。

A. 研究目的

先に行われた国民生活センターの報告によれば、2週間交換ソフトコンタクトレンズ装用者のレンズケースの60%に細菌汚染が見られている。対象のほとんどは学生であり、レンズケアについての意識も低いものであった。われわれにとって興味があるのは、CLケアの指導によってCLケースの汚染がどの程度予防できるかという点である。そこで、CLケアの指導を熱心に行っている全国5施設の眼科開業医に定期的に通院しているコンプライアンスの良好なCLユーザーを対象に、アンケート調査を行うとともに、CLケースを回収し、汚染状況を調査、検討した。

B. 研究方法

対象は、351例(男性:92例、女性:259例、平均年齢 37.6 ± 12.5 歳)CLの種類ではSCL:237例、HCL:114例であった。

CLケアに関するアンケート調査を

- ① CL着脱後のCLケア方法
- ② CL装用前のCLケア方法
- ③ CL装用後のCLケースケア方法
- ④ CL装用状況

について行った。

CLケース汚染調査ではCLユーザーより回収したCLケースを愛媛大学細菌検査室に郵送して以下の方法で微生物培養を行った。

- ① CLケースの乾燥状態を、「液が入っている」、「液滴が認められる」、「乾燥」に分類し、レン