

201132039A

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 23 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 大橋 裕一

平成 24 (2012) 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 | | 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 | 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 | 株式会社メニコン | 部長 |
| | 井上 幸次 | 鳥取大学医学部眼科 | 教授 |
| 研究協力者 | 福田 昌彦 | 近畿大学医学部眼科 | 准教授 |
| | 今安 正樹 | 株式会社メニコン | 主席研究員 |
| | 宮崎 大 | 鳥取大学医学部眼科 | 講師 |
| | 矢倉 慶子 | 鳥取大学医学部眼科 | 技術補佐員 |
| | 稲葉 昌丸 | 稲葉眼科 | 院長 |
| | 宇野 敏彦 | 愛媛大学大学院医学系研究科 視機能外科学 | 准教授 |
| | 白石 敦 | 愛媛大学大学院医学系研究科 視機能外科学 | 准教授 |
| | 鈴木 崇 | 愛媛大学大学院医学系研究科 視機能外科学 | 助教 |
| | 宮本 仁志 | 愛媛大学医学部附属病院 | 副部門長 |

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. アカントアメーバ角膜炎に対する光線力学的療法4
大橋裕一
2. アカントアメーバ角膜炎の全国定点調査8
下村 嘉一
3. アカントアメーバに対する擦り洗い試験11
中田 和彦
4. ソフトコンタクトレンズ消毒剤汚染の多施設調査成績14
井上 幸次

III 研究成果の刊行に関する一覧表18

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標準化を検討すること。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。

2年目の本年は、光感受性物質を用いた抗アメーバ効果の検討、アカントアメーバのコンタクトレンズへの付着性・除去効果の検討、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、全国定点診療所におけるコンタクトレンズ消毒剤ボトル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。

初年度において抗アメーバ効果評価法の迅速化を報告した。本年度では、さらに光感受性物質による抗アカントアメーバ効果について検討するとともに、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、発生の基盤となるレンズケースの汚染状況に続き消毒剤ボトル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。また、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る。

B. 研究方法

1. 光線力学療法をもちいた抗アメーバ効果

の試み

アカントアメーバには特効薬がなく、現在のところ治療としては消毒剤の点眼、抗真菌薬の局所投与と全身投与、角膜搔爬の三者併用療法が標準的とされるが必ずしも良好な結果が得られておらず、新しい治療法が望まれている。そこで、光感受性物質の存在下で特定の波長の光を照射することで酸化ストレスによる細胞障害を惹起する光線力学的療法の抗アカントアメーバ効果について検討した。

2. アカント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効果の検討

アカントアメーバに対する擦り洗い試験

シリコーンハイドロゲルコンタクトレンズにアカントアメーバを接着させた後、MPSによる各種洗浄処理を行い、残存アカントアメーバを定量して、MPSによる除去効果を比較検討する。

3. アカント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関連重症角膜炎感染症スタディの2年間の総括を踏まえ、全国9の大学附属病院をベースに、アンケート調査を行い、アカントアメーバ角膜炎の発生状況を調査することとした。

4. SCL 消毒剤ボトル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、SCL消毒剤ボトル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SCL消毒剤ボ

トルを回収し、愛媛大学へ郵送、ボトル内消毒液の培養（細菌、真菌、アカントアメーバ）を行うとともに、鳥取大学においてアカントアメーバに対するreal-time PCRを実施した。

C. 研究結果

1. 1. 光線力学療法をもちいた抗アメーバ効果の試み

メチレンブルーを用いた光線力学療法による抗アカントアメーバ作用が示され、将来的なアカントアメーバ角膜炎治療法につながると期待される。今後はin vivoモデルでの効果を検討する必要がある。

2. アカント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

アカントアメーバに対する擦り洗い試験：ケア方法としては「こすり」洗いのアカントアメーバ除去効果が最も高かった。「すすぎ」洗いの効果はボトルからの液体噴出量に依存した。

3. アカントアメーバ角膜炎発症動向の全国定点調査

全国9施設で行ったアカントアメーバ角膜炎発症動向調査において、2009年以後減少傾向が認められた。今後、調査施設を全国すべての大学病院に拡大してより詳細な検討を行う予定である。

4. SCL 消毒剤ボトル汚染状況の定点診療所調査

183例のSCL消毒剤ボトル汚染状況を検討したところ、容器内液の3%（183検体中6例）、注出口サンプルの32%（183検体中58例）にお

いて細菌が検出された。真菌、アカントアメーバは検出されなかった。アカントアメーバは培養にては検出されなかったが、real time PCR では、検出例はわずかであり、病原性につながるようなアカントアメーバ汚染は生じていないと考えられた。

D. 考察

光感受性物質による抗アカントアメーバ効果が証明され、その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改めて示された。市販 SCL 消毒剤自体も汚染されていることが明らかとなり、レンズケアにおけるすすぎ・擦り洗いの重要性が改めてしまされ、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。また、アカントアメーバ角膜炎の発症動向については経年的に減少傾向にあることが示唆され今後調査施設を拡大して実施していきたい。

E. 結論

アカントアメーバ角膜炎の制御に向けて、特に、光感受性物質による抗アメーバ治療法の開発、レンズケアにおけるすすぎ・擦り洗いの重要性、および SCL 消毒剤汚染の実態把握などにおいて、今後有益な成果が得られたものと考ええる。

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

アカントアメーバ角膜炎に対する光線力学的療法

研究分担者 大橋裕一

研究要旨 現在急増中であるコンタクトレンズ関連角膜炎を引き起こすアカントアメーバには特効薬がなく、現在のところ治療としては消毒剤の点眼、抗真菌薬の局所投与と全身投与、角膜搔爬の三者併用療法が標準的とされる。しかしながらたとえこれらの治療を行ったとしても症状が悪化し、最終的に角膜移植術が必要となるケースもあるため、異なる視点からの新しい治療法の開発が急務とされる。近年、光感受性物質の存在下で特定の波長の光を照射することで酸化ストレスによる細胞障害を惹起する光線力学的療法(PDT)が感染症領域において注目されている。我々はこのPDTが細菌や真菌に対して抗微生物作用を示すという報告に着目しアカントアメーバ角膜炎への治療に応用できないかと考えた。本研究では光感受性物質として毒性の低いメチレンブルー(MB)を用いた光線力学的療法(MB-PDT)による抗アメーバ効果の検討を行った。

A. 研究目的

本研究では、アカントアメーバ栄養体またはシストに対するメチレンブルー - 光線力学療法(MB-PDT)の *in vitro* における抗アカントアメーバ効果を評価した。評価方法としては、昨年度開発した CTC アッセイ法を用いた。

B. 研究方法

① アカント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 光感受性物質と光源

光感受性物質であるメチレンブルーは蒸留水で 10mM の濃度に希釈し暗所保存しておく。使用する際にはさらに目的の濃度に希釈した後、0.22 μ m 孔のフィルターを通した。光源は MB の最大吸収波長である 660nm のフィルタープローブ付きのハロゲンランプ(LC-122A、LumaCare 社)を使用した。

③ メチレンブルー - 光線力学療法 (MB-PDT)

培養した栄養体またはシストを遠心分離に

より回収し 2×10^6 amoeba の pellet とした。各濃度の MB 溶液 (0.05、0.1、0.25、0.5mM) で懸濁し 10 分間暗室にてインキュベートさせ洗浄した後、2ml の PBS で懸濁し 35mm dish に移し替え、dish 上からの照射距離が一定になる様にプローブを固定し光を照射した。処理後のアカントアメーバ懸濁液を回収し CTC 染色によりその蛍光強度を蛍光プレートリーダーにて測定した。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。対照として無処理群、MB(+) 光照射(-) 群、MB(-) 光照射(+) 群をとり、無処理群の蛍光強度を 100% とし、各処理群の残存呼吸活性を求めた。また光照射量による抗アメーバ効果の違いを調べるため、0.5mM 濃度の MB 溶液で 10 分間インキュベートさせた栄養体の懸濁液を 35mm dish 上で光照射時間別 (10、20、30 分間の連続照射と 10 分間×3 回のパルス照射) に PDT を行い CTC 染色による呼吸活性の測定を行い比較検討した。

④ 透過型電子顕微鏡

0.5mM 濃度での MB-PDT 処理後のアカントアメーバ栄養体に 4% パラホルムアルデヒドを加えて固定し、超薄切片 (60-80nm) を作成した。酢酸ウラニルとクエン酸鉛で電子染色し、JEM1230 (日本電子) 加速電圧 100kV で観察し、対照群と比較した。

⑤ 抗アメーバ薬と MB-PDT との併用効果

抗アメーバ薬として局所投与で使用されることの多い消毒剤のポリヘキサメチレンビグアニド (PHMB)、抗真菌薬のアムホテリシン B

(AMPH-B) とポリコナゾール (VRCZ) を栄養体と 60 分間接触させた後、0.1mM 濃度の MB 溶液と 10 分間インキュベートさせ、無処理群、抗アメーバ薬のみ群、抗アメーバ薬+MB 処理 (光照射なし) 群を対照として、光照射後の呼吸活性を指標に抗アメーバ作用を評価した。

(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 MB-PDT

MB(-) 光照射(+) 群と 0.5mM 濃度以下の MB(+) 光照射(-) 群では無処理群と比較して栄養体の残存呼吸活性率の低下がみられなかったのに対して MB-PDT 群では MB 濃度依存性に残存呼吸活性率の低下がみられ、0.5mM 濃度の MB-PDT 処理後の栄養体の残存呼吸活性率は 11.6% であった。シストについても MB 濃度依存性に残存呼吸活性率の低下がみられ、0.5mM 濃度の MB-PDT 処理後のシストの残存呼吸活性率は 23.2% であった。また MB-PDT 処理後の栄養体の残存呼吸活性率の低下は光照射量依存性であり、連続 10 分間照射で 60.1%、20 分間照射で 36.7%、30 分間照射で 11.6%、10 分間×3 回のパルス照射で 9.5% であった。

次に各処理群の栄養体を透過型電子顕微鏡で観察したところ、無処理群を含めた対照群では栄養体の形態に変化を認めなかったのに対して、MB-PDT 処理群では細胞質内容の欠失、特に核酸の崩壊、消失が顕著にみられた。

② 抗アメーバ薬と MB-PDT との併用効果

膜障害的に作用する PHMB と AMPH-B では

MB-PDT との併用によって相乗効果がみられた。PHMB では 1ppm と 2.5ppm 濃度では薬剤単独では無処理群と比較して残存呼吸活性率の低下は認めなかったのに対し、0.1mM 濃度の MB-PDT を併用することによって残存呼吸活性率はそれぞれ 4.9%、4.2%となった。また AMPH-B では 100 μ g/ml、200 μ g/ml 濃度では薬剤単独では無処理群と比較して残存呼吸活性率の低下は認めなかったのに対し、同様に MB-PDT を併用することによって残存呼吸活性率はそれぞれ 7.4%、7.3%となった。一方、膜合成阻害的に作用する VRCZ と MB-PDT との併用においては VRCZ 単独と比較して有意な残存呼吸活性率の低下がみられなかった。

D. 考察

本研究では MB-PDT による *in vitro* での抗アcantアメーバ効果の検討を行った。その結果、栄養体とシストの双方に対して抗アメーバ効果が MB の濃度依存性に認められた。さらに抗アメーバ効果は光照射量依存性であることも示された。また従来のアcantアメーバ角膜炎の治療として使用されている消毒薬あるいは抗真菌薬との併用において相乗効果が認められるものが有り、MB-PDT が今後のアcantアメーバ角膜炎の治療の追加オプションの一つとなりうる可能性が示された。

E. 結論

本研究により MB-PDT による抗アcantアメーバ作用が示され、将来的なアcantアメーバ角膜炎治療法につながると期待される。

F. 研究発表（平成 22 年度）

論文発表

1. Kobayashi T, Gibbon L, Mito T, Shiraishi A, Uno T, Ohashi Y. Efficacy of commercial soft contact lens disinfectant solutions against Acanthamoeba. Jpn J Ophthalmol. 55(5):547-57, 2011.
2. Ikeda Y, Miyazaki D, Yakura K, Kawaguchi A, Ishikura R, Inoue Y, Mito T, Shiraishi A, Ohashi Y, Higaki S, Itahashi M, Fukuda M, Shimomura Y, Yagita K. Assessment of Real-Time Polymerase Chain Reaction Detection of Acanthamoeba and Prognosis Determinants of Acanthamoeba Keratitis. Ophthalmology. 2012 Feb 28.
3. Kobayashi T, Mito T, Watanabe N, Suzuki T, Shiraishi A, Ohashi Y. Use of 5-cyano-2,3-ditoly-tetrazolium chloride staining as an indicator of biocidal activity in a rapid assay for anti-acanthamoeba agents. J Clin Microbiol. 2012 May;50(5):1606-12.
4. 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 2012 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炎感染症全国調査 日本眼科学会雑誌 2011 年 115 巻 2 号 Page107-115

6. 白石 敦、河野大介、澤口翔太、西康太郎、小林 剛、鄭 暁東、宮本仁志、大橋裕一 ソフトコンタクトレンズケース汚染とケア状況 日本コンタクトレンズ学会誌 53(3):S34-S37, 2011.
7. 秦野 寛、井上幸次、大橋裕一、下村嘉一、坂本雅子、岡本 豊 眼感染症薬剤感受性スタディグループ 前眼部・外眼部感染症起炎菌の薬剤感受性 日本眼感染症学会による眼感染症起炎菌・薬剤感受性多施設調査(第二報) 日本眼科学会雑誌 115(9): 814-824, 2011.
8. 井上幸次、大橋裕一、秦野 寛、下村嘉一、坂本雅子、岡本 豊 眼感染症薬剤感受性スタディグループ 前眼部・外眼部感染症における起炎菌判定 日本眼感染症学会による眼感染症起炎菌・薬剤感受性多施設調査(第一報) 日本眼科学会雑誌 115(9): 810-813, 2011.
9. 小早川信一郎、井上幸次、大橋裕一、下村嘉一、臼井正彦 細菌性結膜炎における検出菌・薬剤感受性に関する5年間の動向調査(多施設共同研究) あたらしい眼科 28(5): 679-687, 2011.
- 115 回日本眼科学会総会 (東京) 5/12-5/15, 2011.
2. 水戸 毅、小林 剛、鈴木 崇、林 康人、白石 敦、大橋裕一 アカントアメーバに対する in vitro での photodynamic (PDT) 効果の検討 スリーサム 2011 京都 第 48 回日本眼感染症学会 (京都) 7/8, 2011.
3. 井上幸次、大橋裕一、江口 洋、杉原紀子、近間泰一朗、外園千恵、八木田健司、野崎智義 わが国のアカントアメーバ角膜炎関連分離株の分子疫学多施設調査 スリーサム 2011 京都 第 48 回日本眼感染症学会 (京都) 7/8, 2011.
4. 植田喜一、大橋裕一、下村嘉一 CL 関連角膜感染症全国調査委員会 コンタクトレンズ関連角膜感染症の発症地域と発症時期 スリーサム 2011 京都 第 54 回日本コンタクトレンズ学会 (京都) 7/9, 2011.
5. 水戸 毅、小林 剛、鈴木 崇、白石 敦、大橋裕一 アカントアメーバへの photodynamic therapy (PDT): 抗アメーバ薬との併用効果の検討 角膜カンファレンス 2012 (東京) 2/23-2/25, 2012.

学会発表

1. 稲葉昌丸、糸井素純、井上幸次、植田喜一、大橋裕一、佐渡一成、水谷 聡、宮本仁志 コンタクトレンズケース内汚染の現状 第

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事業）

分担研究報告書

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。この結果をもとにして、全国各地域（北海道、東北、関東、甲信越、東海、関西、中国、四国、九州）から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て準備していたが、症例数の集積が困難であったために、郵送によるアンケート調査を実施した。

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、全国各地域（北海道、東北、関東、甲信越、東海、関西、中国、四国、九州）から定点施設を定め、発症数について長期的な視点で調査をおこなった。

定点施設には、全国各地域より、北海道大学医学部附属病院（北海道）、東北大学医学部附属病院（東北）、東京歯科大学附属病院（東京）、信州大学医学部附属病院（甲信越）、岐阜大学医学部附属病院（東海）、近畿大学医学部附属病院（関西；担当責任施設）、愛媛大学医学部附属病院（四国）、鳥取大学医学部附属病院（中国）、鹿児島大学医学部附属病院（九州）の9施設を選定した。

各大学にアンケートを郵送し、2007年～2011年の間に診療をおこなったアカントアメーバ角膜炎の症例数の変化について調査を行った。

（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

9施設からのアンケート調査より、2007年～2011年の5年間で174症例を集計した。その5年間の年次変動は、2007年(38例)、2008年(54例)、2009年(48例)、2010年(22例)、2011年(12例)であり、2008年をピークにそれ以降、減少傾向であることが判明した。その傾向はすべての施設で同様であり、地域差はなかった。

D. 考察

アcantアメーバ角膜炎は最も難治なCL関連角膜炎感染症であり、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。本研究により、アcantアメーバ角膜炎は2008年をピークにそれ以降は減少している可能性が考えられた。このことは、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が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)を行っており、それによってコンタクトレンズユーザーのケアに対する意識が変化したことが考えられる。今後は、アcantアメーバ角膜炎の発生動向について、施設数を増加し、追試を行いながら、コンタクトレンズユーザーのケアに対する意識の変化についても調査する

E. 結論

アcantアメーバ角膜炎は2009年以降減少傾向にある。

F. 研究発表(平成23年度)

論文発表

1. 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炎感染症全国調査 日本眼科学会雑誌 2011年 115巻2号 Page107-115
2. 小早川 信一郎, 井上 幸次, 大橋 裕一, 下村 嘉一, 臼井 正彦, COI 細菌性結膜炎検出菌スタディグループ 細菌性結膜炎における検出菌・薬剤感受性に関する5年間の動向調査(多施設共同研究) あたらしい眼科 28(5): 679-687, 2011
3. 秦野 寛, 井上幸次, 大橋裕一, 下村嘉一, 坂本雅子, 岡本 豊, 眼感染症薬剤感受性スタディグループ 前眼部・外眼部感染症起炎菌の薬剤感受性 日本眼感染症学会による眼感染症起炎菌・薬剤感受性多施設調査(第二報) 日本眼科学会雑誌 115(9): 814-824, 2011.
4. 井上幸次, 大橋裕一, 秦野 寛, 下村嘉一, 坂本雅子, 岡本 豊, 眼感染症薬剤感受性スタディグループ 前眼部・外眼部感染症における起炎菌判定 日本眼感染症学会による眼感染症起炎菌・薬剤感受性多施設調査(第一報) 日本眼科学会雑誌 115(9): 810-813, 2011.
5. 宮本 裕子, 下村 嘉一 [CLケア教室 第39回] コンタクトレンズケアの指導と定期検査の重要性ー最近の傾向からー 日本コンタクトレンズ学会誌 53(3): 231-232, 2011
6. Itahashi M, Higaki S, Fukuda M, Mishima H, Shimomura Y Utility of real-time polymerase chain reaction in diagnosing

and treating acanthamoeba keratitis.
Cornea 30(11): 1233-1237, 2011

- Ikeda Y, Miyazaki D, Yakura K, Kawaguchi A, Ishikura R, Inoue Y, Mito T, Shiraishi A, Ohashi Y, Higaki S, Itahashi M, Fukuda M, Shimomura Y, & Yagita K. Assessment of real-time polymerase chain reaction detection of Acanthamoeba and prognosis determinants of acanthamoeba keratitis. Ophthalmology 2012 in press

クトレンズ学会（京都）7/9, 2011.

- 坂本 万寿夫, 福田 昌彦, 渡邊 敬三, 檜垣 史郎, 下村 嘉一. コンタクトレンズ、外傷、角膜移植が誘因ではなかった感染性角膜潰瘍の検討. 第65回日本臨床眼科学会
- 檜垣 史郎, 板橋 幹城, 福田 昌彦, 下村 嘉一. アカントアメーバ角膜炎における細菌、真菌、ウイルス DNA 角膜カンファレンス 2012(第36回日本角膜学会総会・第28回日本角膜移植学会), 東京 2012/2/23-2/25

学会発表

- Shimomura Y. Introduction in Current Trends of Ocular Surface Infection. APAO Sydney 2011(Sydney, Australia March 20th-24th. 2011)
- Tsukiyama J, Miyamoto Y, Fukuda M, Shimomura Y, Miura H, Tsuchiya J. Contamination of Silicone Hydrogel Contact Lenses by Cosmetics and the Cleaning Effect of Contact Lens Daily Cleaners. ARVO 2011 (Fort Lauderdale, USA May 1st-5th. 2011)
- 月山 純子, 宮本 裕子, 福田 昌彦, 下村 嘉一, 三浦 啓彦, 土屋 二郎. シリコーンハイドロゲルレンズに対する化粧品汚染と各種洗浄剤の効果. 第54回日本コンタクトレンズ学会（京都）7/9, 2011.
- 植田喜一、大橋裕一、下村嘉一、CL 関連角膜感染症全国調査委員会 コンタクトレンズ関連角膜感染症の発症地域と発症時期 スリーサム 2011 京都 第54回日本コンタ

G. 知的所有権の取得状況

- 特許取得：なし
- 実用新案登録：なし
- その他：なし

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 コンタクトレンズ装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。 AKのリスクを低減させるには、ケア用品を正しく使い、コンタクトレンズ表面に付着したアカントアメーバを確実に除去すること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、「すすぎ」、「こすり+すすぎ」「浸漬」、「こすり+すすぎ+浸漬」の4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、あらかじめシリコーンハイドロゲルコンタクトレンズに接着させたアカントアメーバ栄養体に対するケア用品処理による除去効果について検討する。

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 30°Cで行った。

② 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としてエピカールド、レニューフレッシュ、オプティフリ

ープラス、コンプリートダブルモイストを、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3時間乾燥させた。その後、「すすぎ (レンズ凹面 5 秒間)」、「こすり (20 秒間) +すすぎ」、「浸漬 (4 時間)」、「こすり+すすぎ+浸漬」のいずれかの処理を行い、レンズ表面に残存したアカントアメーバを超音波処理で回収し、DNAを抽出した。リアルタイムPCR (SYBR Green 法) にて、アカントアメーバの 18S-rDNA を増幅し、別途作製した標準曲線より、アカントアメーバ数を計数した。最終的に「こすり」、「すすぎ」、「浸漬」の各ステップの Log Reduction 効果をケア用品ごとに算出した。実験は4回繰り返した。

③ MPS ボトルからの液体噴出量の測定

4種類のMPSボトルおよびPBS（コンプリートダブルモイストのボトルを使用）から、なるべく一定の圧力にて液体を5秒間噴出し、噴出液をビーカーに回収して、重量法により噴出液量(mL)を求めた。実験は3回繰り返した。なお、ボトルの材質はエピカコールド、オプティフリープラス、コンプリートダブルモイストではポリエチレン（PE）、レニューフレッシュではポリエチレンテレフタレート（PET）であった。

C. 研究結果

① アカントアメーバに対する擦り洗い試験

「こすり」洗いによるアカントアメーバ除去効果はPBSで1.00 LOG、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、コンプリートダブルモイストでそれぞれ0.88、1.30、1.30、1.31 LOGであった。「すすぎ」洗いによるアカントアメーバ除去効果はPBSで0.59 LOG、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、コンプリートダブルモイストでそれぞれ0.88、0.09、0.70、0.43 LOGであった。「浸漬」によるアカントアメーバ除去効果はPBSで0.08 LOG、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、コンプリートダブルモイストでそれぞれ0.67、0.28、0.49、0.49 LOGであった。全体的に3種類の洗浄方法の比較では「こすり」洗いの効果が最も大きかった。「こすり」+「すすぎ」+「浸漬」によるアカントアメーバ除去効果はPBSで1.67 LOG、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、コンプリートダブルモイストでそれぞれ2.43、

1.67、2.49、2.23 LOGであった。

② MPSボトルからの液体噴出量の測定

PBS（コンプリートダブルモイストのボトル）、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、コンプリートダブルモイストからの液体噴出量（5秒間）はそれぞれ3.0、5.1、2.6、3.5、2.8mLであった。

D. 考察

「こすり」洗浄では各種MPSと対照のPBSで大きな差はなかった。「すすぎ」洗浄ではレニューフレッシュの効果が他のMPS及びPBSと比較して1ケタ低く、PEより硬いPETボトルからの液体噴出力の低さに起因すると考えられた。「浸漬」では、対照のPBSのアカントアメーバ除去効果がすべてのMPSより1ケタ低く、消毒効果がないことに起因すると考えられた。すべてのステップを組合せた「こすり」+「すすぎ」+「浸漬」のアカントアメーバ除去効果はMPSで1.67～2.49であり、コンタクトレンズに接着させた約10,000個のアカントアメーバをすべて除去することはできなかった。しかし、今回採用したリアルタイムPCR法では生死に関係なくカウントしており、実際に生残していたアカントアメーバ数はより少ないと考えられる。今後はアカントアメーバの生死判定を含めた定量法が必要と考えている。

今回の実験には *Acanthamoeba castellanii* (ATCC50370) のみを用いたが、今後は臨床分離株での検討も必要である。また、アカントアメーバシストのコンタクトレンズへの接着性は栄養体より低いことが知られているが、コ

ンタクトレンズ上の栄養体が接着したままシ
スト化したときの接着性に関する知見はない。
今後はコンタクトレンズ上で形成されたシス
トに対するMPSの除去効果を検討する予定
である。

E. 結論

アカント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。
アカント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、消毒効果の高いMPS
を選択し、「こすり」、「すすぎ」、「浸漬」の各
ステップを正しい方法で確実に実施すること
が重要と考えられる。特に「すすぎ」洗浄で
は、ボトルからの液体噴出量を十分確保するた
め、適度に柔らかいボトルの材質とデザインが

重要と考えられる。

F. 研究発表（平成 23 年度）

論文発表

1. 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 2012 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

ソフトコンタクトレンズ消毒剤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、および2009年にCL関連角膜感染症全国調査委員会が行った報告において、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、中でもアcantアメーバ角膜炎が予後不良となりやすいため問題であること、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、その半数以上が適切なCL装用、ケアを行っていないことが示されている。また平成23年度の当分担研究においては、CLケースの細菌汚染が高率に認められることが明らかになった。今回は使用中のSCL消毒剤自体の細菌、アcantアメーバによる汚染状況の現状把握と、汚染の多寡に関わるパラメータの検索を行うために、全国の眼科開業医を初診で受診したCLユーザーを対象に、アンケート調査を行うとともに使用中のCL消毒剤を回収して、その汚染動向を検討した。

A. 研究目的

平成23年度の当分担研究、および先に行われた国民生活センターの報告において、ソフトコンタクトレンズ(SCL)装用者のレンズケースに高率の細菌汚染、時にアcantアメーバ汚染が認められることが判明している。この汚染の起源として、SCL操作時の手指の汚れ、SCLケース周囲の菌などとともに、CL消毒剤の汚染も考える必要がある。事実、諸外国の調査においてSCLケースの24~87%に細菌汚染が認められると同時に、SCL消毒剤の11~63%にも汚染が認められることが報告されている。CL関連角膜感染症予防のためにはわが国におけるSCL消毒剤汚染の現状を把握し、その成因と対策を検討する必要がある。そこでSCLの使用者が実際

に使用中のSCL消毒剤を収集し使用状況および汚染状況を調査した。

B. 研究方法

SCL消毒剤は全国5施設のSCL処方施設とし、気温の高い9~10月を前期、気温の低い1~3月後期とする二期に分けてSCL消毒剤収集を行った。一般的なSCL使用者の実情を知るため、対象は各施設を初診で訪れた者に限定し、診察時に返送用セットを渡して帰宅後直ちに使用中のSCL消毒剤を各施設に返送するよう指示した。各使用者には簡単なアンケート(表1)を渡し、SCL消毒剤とともに返送させた。

表1: 使用者アンケート内容

1. 年齢 () 歳
2. 性別 () 男 () 女
3. 使っているソフトレンズの種類 : () 1 週間交換 () 2 週間交換 () 1 ヶ月交換 () 3 ヶ月交換 () その他
4. ソフトレンズの使用頻度 : () 週 6~7 日 () 週 3~5 日 () 週 1~2 日 () それ以下 () その他
5. 今使っている消毒剤を「開封してから」の経過日数 : () 3 日以内 () 1 週間以内 () 2 週間以内 () 1 ヶ月以内 () 2 ヶ月以内 () 2 ヶ月を超える () 不明

SCL 消毒剤は各施設で冷蔵保管した後、毎週 1 回まとめて愛媛大学細菌検査室に送付し、細菌、真菌、アcantアメーバの培養検査を行った (表 2)。

表 2: 培養検査手順

1. 各 SCL 消毒剤について、容器内液と、容器注出口周囲をぬぐった液の 2 つをサンプルとし、滅菌した大腸菌を塗ったクロモアガーカンジタ培地にて 10 日間室温培養後、鏡検にてアメーバの有無を確認した。
- 2 約 50 μ L の液を血液寒天培地/BTB 寒天培地に広げ、35°C、48 時間培養した (残った液はアcantアメーバ PCR 検査に使用)。
- 3 48 時間後、コロニーのグラム染色を行い、染色性および形態で同定を行った。
- 4 菌量については、以下の基準で簡易定量を行った (単位は CFU/mL)。 (±) 10^3 以下、 (+) $10^4 \sim 10^5$ 、 (2+) 10^6 、 (3+) 10^7 以上

検体の一部は鳥取大学眼科学教室に送付し、

アcantアメーバに対するリアルタイム PCR 検査を行った (表 3)。

表 3 : Real time PCR 手順 (TaqMan Probe 法、Ikeda et al. 2012)

1. DNA 抽出 : QIAamp® DNA Mini Kit
2. Real-time PCR 施行 : LightCyCler®
3. *Acanthamoeba castellanii* (ATCC30010D) の genomic DNA の既知濃度サンプルより PCR で増幅した DNA fragment による検量線作成
4. 解析 : LightCyCler Software version 3.

また、アンケート結果を性別、年齢、使用 SCL 消毒剤種別、開封後使用日数、前後期の別などに分類し、培養検査結果との相関を調査した。

(倫理面への配慮)

この研究は、患者から SCL 消毒剤を回収して微生物検査を行うため、被験者の利益・不利益は生じない。

C. 研究結果

前期 (9~10 月) 98 例、後期 (1~3 月) 85 例、計 183 例の SCL 消毒剤を収集し検査することが出来た。

1. 培養検査による細菌、真菌、アcantアメーバ検出率

容器内液の 3% (183 検体中 6 例)、注出口サンプルの 32% (183 検体中 58 例) において細菌が検出された。真菌、アcantアメーバは検出されなかった。前期、後期間に検出率の差は認められなかったため、全期を一つにまとめて以後の統計処理を行った。

2. SCL 消毒剤の種類による汚染率の違い
注出口サンプルについて、多目的用剤の 38%、過酸化水素剤の 6%に汚染が認められた。この差は統計的にも有意であった。容器内液については差は認められなかった。

3. 使用者の性別、年齢による汚染率の違い
性別、年齢による汚染率の差は認められなかった。

4. 開封後使用期間と汚染率
開封後 1 ヶ月以内の SCL 消毒剤 (81 例) と 1 ヶ月超の SCL 消毒剤 (101 例) の 2 群間において、注出口サンプル、容器内液とも汚染率に有意な差はなかった

5. アカントアメーバに対する Real time PCR 結果
検出例はわずかであり、病原性につながるようなアカントアメーバ汚染は生じていないと考えられた。

D. 考察

本研究により、

1. 一般的な SCL 使用者において、使用している SCL 消毒剤の注出口には高率の細菌汚染が認められた。

2. アカントアメーバによる汚染はほとんど (real time PCR) あるいはまったく (培養検査) 認められなかった。

3. SCL 消毒剤注出口の汚染は過酸化水素剤よりも多目的用剤に多く認められた

4. 性別、年齢による差はなかった。また開封後使用期間 1 ヶ月以内と 1 ヶ月超との間に差はなかった。

などが明らかとなった。SCL 消毒剤からの細菌

持ち込みを予防するには、注出口を清潔に保つ操作が必要と考えられた。また、次の課題として、開封後どの程度の期間で SCL 消毒剤を交換すれば汚染率を低く留めることが出来るかを調査する必要があると考えられた。

E. 結論

一般的な SCL 使用者が使用している SCL 消毒剤においては、注出口部分に高率の細菌汚染が生じており、これを防止する対策を講ずる必要がある。

F. 研究発表 (平成 24 年度)

論文発表

- Ikeda Y, Miyazaki D, Yakura K, Kawaguchi A, Ishikura R, Inoue Y, Mito T, Shiraiishi A, Ohashi Y, Higaki S, Itahashi M, Fukuda M, Shimomura Y, & Yagita K. Assessment of real-time polymerase chain reaction detection of Acanthamoeba and prognosis determinants of acanthamoeba keratitis. *Ophthalmology* 2012 in press
- 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炎感染症全国調査. *日眼会誌* 115:107-115,2011
- 小早川信一郎、井上幸次、大橋裕一、下村嘉一、臼井正彦、COI 細菌性結膜炎検出菌スタディグループ：細菌性結膜炎における検出菌・薬剤感受性に関する 5 年間の動向調査 (多施設共同研究) . *あたらしい眼科* 28:679-687,2011

4. 井上幸次、大橋裕一、秦野寛、下村嘉一、坂本雅子、岡本豊、眼感染症薬剤感受性スタディグループ：前眼部・外眼部感染症における起炎菌判定—日本眼感染症学会による眼感染症起炎菌・薬剤感受性多施設調査（第一報）—。日眼会誌 115:801-813,2011
5. 秦野寛、井上幸次、大橋裕一、下村嘉一、坂本雅子、岡本豊、眼感染症薬剤感受性スタディグループ：前眼部・外眼部感染症起炎菌の薬剤感受性—日本眼感染症学会による眼感染症起炎菌・薬剤感受性多施設調査（第二報）—。日眼会誌 115:814-824,2011
6. 井上幸次、大橋裕一、江口洋、杉原紀子、近間泰一郎、外園千恵、下村嘉一、八木田健司、野崎智義：わが国のアcantトアメーバ角膜炎関連分離株の分子疫学多施設調査（中間報告）。あたらしい眼科 29:397-402,2012
4. 武信二三枝、川口亜佐子、宮崎大、矢倉慶子、井上幸次：角膜表層切除術が治療に有効であったアcantトアメーバ角膜炎の1例。角膜カンファランス 2012(第36回日本角膜学会総会・第28回日本角膜移植学会)，東京 2012/2/23-2/25

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

学会発表

1. 稲葉昌丸、糸井素純、井上幸次、植田喜一、大橋裕一、佐渡一成、水谷 聡、宮本仁志 コンタクトレンズケース内汚染の現状 第115回日本眼科学会総会（東京）5/12-5/15, 2011.
2. 井上幸次、大橋裕一、江口洋、杉原紀子、近間泰一郎、外園千恵、八木田健司、野崎智義：わが国のアcantトアメーバ角膜炎関連分離株の分子疫学多施設調査。第48回日本眼感染症学会，京都，2011/7/8-7/10
3. Inoue Y : Application of real-time PCR for the management of Acanthamoeba keratitis Corneal Symposium: Current Therapies , Novel Approaches, and Challenging Cases. Taipei, 2012/2/11