

**Figure 3.** Significant correlation of *Acanthamoeba* DNA copy number with stage of *Acanthamoeba* keratitis (AK) and visual acuity. *Acanthamoeba* DNA copy number at first visit was significantly correlated with AK stage ( $\rho=0.53$ ) (A) and logarithm of the minimum angle of resolution visual acuity ( $\rho I=0.37$ ) (B) by Spearman correlation analysis ( $P<0.05$ ). Bacterial load in the lesion is not significantly correlated with the AK stage (C) or visual acuity (D). logMAR = logarithm of the minimum angle of resolution.

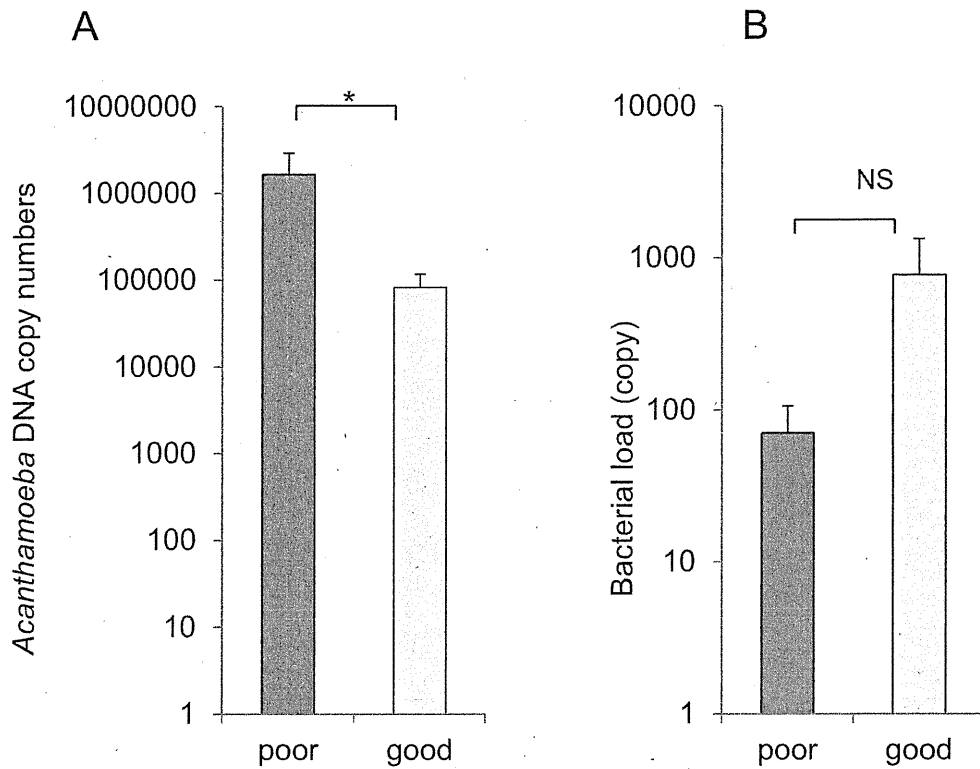
58.82,  $P<0.05$ , after adjustment of age). The amoebic DNA copy number at the first visit also had a similar risk. The bacterial load at the first visit was not significantly associated with the DNA reduction.

## Discussion

*Acanthamoeba* keratitis is a persistent infection and generally requires prolonged intensive treatment. However, our understanding of how to treat this disease remains undetermined. Presumably, the clinical presentation of

AK (i.e., the stage of the AK) reflects the *Acanthamoeba* load, and the immunologic responses significantly affect its prognosis. Culturing, smear staining, and confocal microscopy are widely used for diagnosing AK. However, their qualitative nature and low sensitivity limit the amount of information that can be obtained to determine the cause of the AK. Thus, our initial aim was to determine how real-time PCR can be used for the diagnosis and management of AK.

Earlier studies with multivariate analysis of AK classified AK into 5 stages according to the corneal depth of the lesion and the severity of the corneal involvement as as-



**Figure 4.** Elevation of *Acanthamoeba* DNA copy number in *Acanthamoeba* keratitis (AK) cases with poor outcomes. The AK cases with poor outcome, defined as visual acuity <20/50 at last visit or requiring keratoplasty, have a significantly higher number of *Acanthamoeba* DNA copies at the first visit compared with the AK eyes with good outcomes (A). Bacterial load at the first visit is not significantly different between them (B). \* $P < 0.05$ . NS = not significant.

essed by slit-lamp examinations.<sup>4</sup> The disease staging at presentation was predictive of worse outcomes and shown to help identify patients who might benefit from more aggressive therapy. Of note, advanced-stage AK with deep stromal involvement and ring infiltrates was associated with worse outcomes.<sup>4,8,9</sup>

Then, the important question arose on how much *Acanthamoeba* load is present at each stage. Our results showed that there was a strong and positive correlation of each stage with the *Acanthamoeba* DNA copy number, that is, more advanced stages of AK had higher *Acanthamoeba* DNA copy numbers. This explains why more advanced stages of AK were so refractory to treatment.

Although the living amoebic bodies were fewer (Fig 1), this means that destroyed amoeba-derived DNA is abundant. Thus, the strong immunologic responses of the host to *Acanthamoeba*, manifested as ring infiltrate, are still not effective in eliminating the high *Acanthamoeba* copy numbers.

The most obvious advantage of real-time PCR is its high sensitivity.<sup>3,10,11</sup> Real-time PCR for *Acanthamoeba* genomic DNA will detect both live and destroyed amoeba. This was shown in our analysis of cultured *Acanthamoeba* cysts or trophozoites (Fig 1). Cultured *Acanthamoeba* samples generally are accompanied by fragments of the dead bodies and DNA. Real-time PCR attains its greater sensitivity in detecting

Table 1. Parameters Associated with Poor Outcome of *Acanthamoeba* Keratitis by Logistic Regression Analysis

	Odds Ratio					P Value
	Lowest Category	Second Category	95% CI	Highest Category	95% CI	
<i>Acanthamoeba</i> DNA copy number at the first visit	1.0	≤1000:3.48	1.04–111.63	>100 000:147.39	1.18–18 281.3	0.04*
AK stage	1.0	Stage 2:2.8	1.07–7.30	Stage 5:61.56	1.31–2838.69	0.04*
Bacterial load at the first visit	1.0	≤10:0.88	0.47–1.64	>10 000:0.53	0.02–11.86	0.69
Previous use of steroids	(-):1	8.84	0.852–91.68			0.07
Contact lens use	(-):1					0.996

AK = *Acanthamoeba* keratitis.  
\* $P \leq 0.05$ .

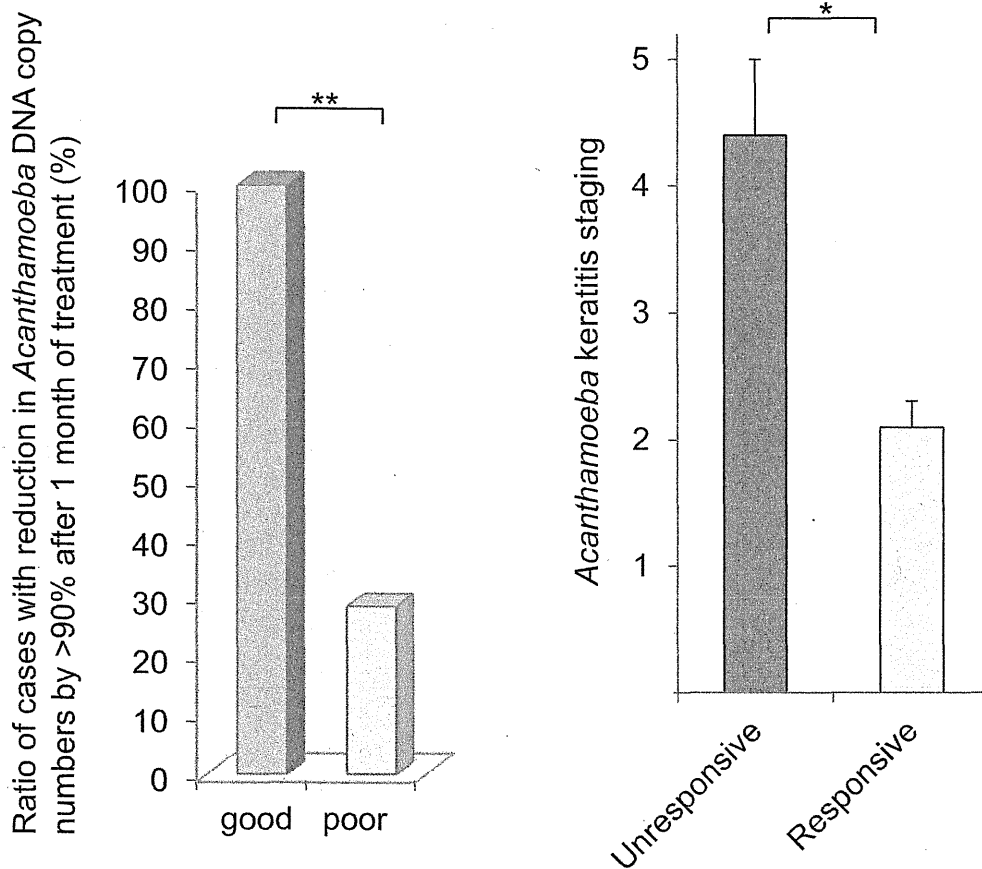


Figure 5. Association of poor outcomes with unresponsive *Acanthamoeba* copy reduction after treatment. Ratio of *Acanthamoeba* keratitis (AK) cases with unresponsive *Acanthamoeba* copy reduction after 1 month of treatment was significantly higher in AK with adverse prognosis (A). In the unresponsive AK cases, AK stage was significantly advanced compared with the responsive cases for amoebic copy reduction (B). \* $P < 0.01$ . \*\* $P = 0.0005$ .

*Acanthamoeba* because it does not rely on the functional integrity of the amoeba as do the conventional methods. The high sensitivity of the real-time PCR is also derived from the specificity of the TaqMan probe method<sup>3</sup> and the precise regression to the predetermined amount of amoebic DNA standards.

Even though *Acanthamoeba* is environmentally ubiquitous, our real-time PCR did not detect amoebic DNA in conjunctival smears from normal subjects. Although the number of subjects tested was limited, our findings indicate that amoebic trace is most likely absent in healthy eyes.

*Acanthamoeba* preys mainly on bacteria but also on fungi and other protozoans. Thus, *Acanthamoeba* might be observed as coinfectants in infectious keratitis cases. When we determined the specificity of *Acanthamoeba* PCR in BK cases, *Acanthamoeba* DNA was not detected in any of the BK cases, but 53.6% of the AK cases had low levels of bacterial DNA. This supports the concept of a bacterial involvement in the cause of AK, although the stage of the AK was not significantly correlated with the bacterial load (Fig 3). Thus, once AK is established, the bacterial load probably plays a limited role in its progression.

Table 2. Parameters Associated with Unresponsive *Acanthamoeba* DNA Reduction after 1 Month by Logistic Regression Analysis

	Odds Ratio					P Value
	Lowest Category	Second Category	95% CI	Highest Category	95% CI	
AK stage	1.0	Stage 2:8.00	1.06-58.82	Stage 5:4096	1.28-11 973 037	0.04*
<i>Acanthamoeba</i> DNA copy number at the first visit	1.0	≤1000:2.79	0.98-8	>100 000:60.88	0.92-4096	0.055
Bacterial load at the first visit	1.0	≤10:1.30	0.60-2.85	>10 000:6.52	2.99-14.25	0.51

AK = *Acanthamoeba* keratitis.  
\* $P \leq 0.05$ .

In the course of lengthy treatments for AK, clinicians are often frustrated when a chosen treatment regimen is ineffective. In refractory cases, *Acanthamoeba* is sometimes resistant to antifungal drugs or antiseptic drugs. Indeed, in our case series, multidrug-resistant *Acanthamoeba* were detected especially in the refractory cases. Moreover, drug-sensitivity testing of *Acanthamoeba* in vitro takes weeks for completion and does not necessarily mirror the sensitivity to the drugs in vivo, especially in refractory cases.<sup>12</sup> This suggests that the proliferation of *Acanthamoeba* seems to depend on both an impaired immune response of the host and the virulence of the *Acanthamoeba*. Consistent with this, the AK outcome was significantly correlated with an unresponsive reduction of amoeba copy numbers after anti-amoeba treatment.

Previous multivariate analysis of AK showed that the duration of the symptoms before diagnosis was a risk factor for a more advanced stage of the disease, and the more advanced stage at presentation was a risk factor for worse outcome.<sup>4</sup> Consistent with these findings, advanced disease stage was one of the significant risk factors for poor outcomes. Furthermore, we found that the detected *Acanthamoeba* copy numbers at the first visit were another risk factor. Advanced AK stage was also a risk factor for unresponsive reduction of amoebic DNA.

Our findings should help clinicians make earlier decisions on when to switch to surgical intervention after treatment. Of note, risk assessments for poor outcomes do not necessarily require real-time amoebic PCR. We suggest that conventional PCR or even smear staining would be sufficient for this purpose. For example, careful sampling of AK lesions during the course of treatment and evaluations by conventional Calcofluor or Fungiflora Y staining will determine whether more than 90% of amoebic bodies have been cleared after 1 month of treatment.

The sensitivity of real-time PCR in patients with AK did not reach the theoretic 100% sensitivity that real-time PCR should have achieved, perhaps because the sampled amount was not sufficient and the sampled location was not correct. The staining of corneal lesions usually requires more tissues, and therefore staining samples were collected before sampling for PCR. When AK is at an early stage and has low amoebic numbers, the sampling may remove even trace amounts of *Acanthamoeba*. In this case, smear staining would be positive but PCR would be negative. The location or depth of the lesion may also affect its outcome. For example, when samples are obtained from inflammatory-prone lesions at the early stage, but without amoeba, real-time PCR would be negative.

The strong immune responses of the host also affect the amoebic DNA load. Aggressive AK treatment or presumably host factors would exacerbate the *Acanthamoeba* copy numbers. This can present as dense inflammatory opacities that are difficult to differentiate from AK with high levels of *Acanthamoeba*. Indeed, we had a case with low visual acuity due to severe corneal and anterior chamber inflammation, in which the small amount of amoebic DNA was readily eradicated after a few weeks of treatment, and treatment was successfully switched to topical steroid therapy to reduce the inflammatory responses.

Refractory AK cases sometimes require therapeutic keratoplasty. The management of post-keratoplasty cases requires intensive use of steroids because they are susceptible to rejection because of the larger graft size and strong inflammatory environment provoked by the AK.

Real-time PCR for *Acanthamoeba* is also useful for confirmation of the complete removal of *Acanthamoeba*. It is a great relief for surgeons to know that the amoebic DNA becomes negative after surgical intervention in cases with advanced-stage AK with a million copies. *Acanthamoeba* real-time PCR requires only a minute amount of sample and is useful for confirming the absence of *Acanthamoeba*. Amoebic PCR ensures the validity of aggressive treatment or surgical intervention and would support the proper timing for the use of steroids for better visual outcome.

In conclusion, collectively, *Acanthamoeba* real-time PCR is effective in diagnosing AK. Real-time PCR detection does not provide information on virulence of *Acanthamoeba* or immunologic responses of the host, but it does provide useful information in managing AK.

## References

1. Shiraishi A, Kobayashi T, Hara Y, et al. Rapid detection of *Acanthamoeba* cysts in frozen sections of corneal scrapings with Fungiflora Y. *Br J Ophthalmol* 2009;93:1563–5.
2. MacLean RC, Hafez N, Tripathi S, et al. Identification of *Acanthamoeba* sp. in paraffin-embedded CNS tissue from an HIV+ individual by PCR. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2007;57:289–94.
3. Riviere D, Szczebara FM, Berjeaud JM, et al. Development of a real-time PCR assay for quantification of *Acanthamoeba* trophozoites and cysts. *J Microbiol Methods* 2006;64:78–83.
4. Tu EY, Joslin CE, Sugar J, et al. Prognostic factors affecting visual outcome in *Acanthamoeba* keratitis. *Ophthalmology* 2008;115:1998–2003.
5. Kandori M, Inoue T, Takamatsu F, et al. Two cases of *Acanthamoeba* keratitis diagnosed only by real-time polymerase chain reaction. *Cornea* 2010;29:228–31.
6. Kakimaru-Hasegawa A, Kuo CH, Komatsu N, et al. Clinical application of real-time polymerase chain reaction for diagnosis of herpetic diseases of the anterior segment of the eye. *Jpn J Ophthalmol* 2008;52:24–31.
7. Nadkarni MA, Martin FE, Jacques NA, Hunter N. Determination of bacterial load by real-time PCR using a broad-range (universal) probe and primers set. *Microbiology* 2002;148:257–66.
8. Chew HF, Yildiz EH, Hammersmith KM, et al. Clinical outcomes and prognostic factors associated with *Acanthamoeba* keratitis. *Cornea* 2011;30:435–41.
9. Nguyen TH, Weisenthal RW, Florakis GJ, et al. Penetrating keratoplasty in active *Acanthamoeba* keratitis. *Cornea* 2010;29:1000–4.
10. Thompson PP, Kowalski RP, Shanks RM, Gordon YJ. Validation of real-time PCR for laboratory diagnosis of *Acanthamoeba* keratitis. *J Clin Microbiol* 2008;46:3232–6.
11. Chang CW, Wu YC, Ming KW. Evaluation of real-time PCR methods for quantification of *Acanthamoeba* in anthropogenic water and biofilms. *J Appl Microbiol* 2010;109:799–807.
12. Perez-Santonja JJ, Kilvington S, Hughes R, et al. Persistently culture positive *Acanthamoeba* keratitis: in vivo resistance and in vitro sensitivity. *Ophthalmology* 2003;110:1593–600.

## Footnotes and Financial Disclosures

---

Originally received: August 11, 2011.

Final revision: November 5, 2011.

Accepted: December 15, 2011.

Available online: March 3, 2012.

Manuscript no. 2011-1207.

<sup>1</sup> Division of Ophthalmology and Visual Science, Faculty of Medicine, Tottori University, Tottori, Japan.

<sup>2</sup> Department of Ophthalmology, Ehime University School of Medicine, Ehime, Japan.

<sup>3</sup> Department of Ophthalmology, Kinki University Faculty of Medicine, Osaka, Japan.

<sup>4</sup> Department of Parasitology, National Institute of Infectious Diseases, Tokyo, Japan.

Financial Disclosure(s):

The author(s) have no proprietary or commercial interest in any materials discussed in this article.

Supported by a grant for research on emerging and reemerging infectious diseases from the Ministry of Health, Labor, and Welfare of Japan: H23-Shinko-Ippan-014. The funding organization had no role in the design or conduct of this research.

Correspondence:

Yoshifumi Ikeda, 81-859-38-6617, Division of Ophthalmology and Visual Science, Tottori University Faculty of Medicine, 36-1 Nishi-cho, Yonago 683-8504, Japan. E-mail: yoshifumiikeda@hotmail.com.

# わが国のアcant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)

井上幸次\*<sup>1</sup> 大橋裕一\*<sup>2</sup> 江口 洋\*<sup>3</sup> 杉原紀子\*<sup>4</sup> 近間泰一郎\*<sup>5</sup> 外園千恵\*<sup>6</sup>  
下村嘉一\*<sup>7</sup> 八木田健司\*<sup>8</sup> 野崎智義\*<sup>8</sup>

\*<sup>1</sup> 鳥取大学医学部視覚病態学 \*<sup>2</sup> 愛媛大学大学院医学系研究科視機能外科学分野 \*<sup>3</sup> 徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス  
研究部眼科学分野 \*<sup>4</sup> 東京女子医科大学東医療センター眼科 \*<sup>5</sup> 広島大学大学院医歯薬学総合研究科視覚病態学  
\*<sup>6</sup> 京都府立医科大学大学院医学研究科視覚機能再生外科学 \*<sup>7</sup> 近畿大学医学部眼科学教室 \*<sup>8</sup> 国立感染症研究所寄生動物部

## Multicenter Molecular Epidemiological Study of Clinical Isolates Related with *Acanthamoeba* Keratitis (Interim Report)

Yoshitsugu Inoue<sup>1)</sup>, Yuichi Ohashi<sup>2)</sup>, Hiroshi Eguchi<sup>3)</sup>, Noriko Takaoka-Sugihara<sup>4)</sup>, Tai-ichiro Chikama<sup>5)</sup>,  
Chie Sotozono<sup>6)</sup>, Yoshikazu Shimomura<sup>7)</sup>, Kenji Yagita<sup>8)</sup> and Tomoyoshi Nozaki<sup>8)</sup>

<sup>1)</sup> Division of Ophthalmology and Visual Science, Faculty of Medicine, Tottori University, <sup>2)</sup> Department of Ophthalmology,  
Graduate School of Medicine, Ehime University, <sup>3)</sup> Department of Ophthalmology, Institute of Health Biosciences, The University  
of Tokushima Graduate School, <sup>4)</sup> Department of Ophthalmology, Tokyo Women's Medical University Medical Center East,  
<sup>5)</sup> Department of Ophthalmology and Visual Science, Hiroshima University Graduate School of Biomedical Sciences,  
<sup>6)</sup> Department of Ophthalmology, Kyoto Prefectural University of Medicine, <sup>7)</sup> Department of Ophthalmology, Kinki University  
Faculty of Medicine, <sup>8)</sup> Department of Parasitology, National Institute of Infectious Diseases

**目的:** 角膜炎に関連したアcantアメーバのDNA分子を多施設疫学研究として解析する。 **方法:** 全国6施設で、アcantアメーバ角膜炎に関連して分離されたアメーバ株をクローニング後、18S ribosomal RNA 遺伝子のシーケンス解析を行った。そして、BLAST (basic local alignment search tool) 検索による既存アメーバとの相同性を調べ、Tタイピングによる分類を行った。本研究は現在も継続中であるが、最初の2年間の結果を中間報告としてまとめた。**結果:** 43株〔角膜擦過物27株、保存液15株、MPS (multi-purpose solution) ボトル内液1株〕中42株がT4に分類され、角膜由来の1株のみT11に分類された。角膜分離株のシーケンスタイプは15種類に分かれたが、すべて既知のもの一致した。保存液分離株のタイプは10種類に分かれ、角膜分離株と比較できた9株中6株は角膜分離株と一致した。**結論:** 最近のアcantアメーバ角膜炎のわが国での増加は、新たなシーケンスタイプのアメーバの出現によるものではなく、既存の株による感染の増加である。

**Objective:** To analyze *Acanthamoeba* DNA molecule's relationship to keratitis, in a multicenter epidemiological study. **Method:** *Acanthamoeba* keratitis-related isolates from 6 institutes were cloned, and sequences of the 18S ribosomal RNA gene were analyzed. Homology between them and known sequences was then examined using BLAST (basic local alignment search tool), and they were classified by T typing. This research is still ongoing; the results of the first two years have been analyzed as an interim report. **Results:** Of 43 isolates, including 27 isolates from the cornea, 15 from lens cases and 1 from an MPS (multi-purpose solution) bottle, 42 isolates were classified as T4; only 1 was classified as T11. Sequences were classified into 15 types; none were unique genotypes. Sequences of isolates from lens cases were classified into 10 types; of the 9 isolates with which corneal isolates had also been obtained, the sequences of 6 were identical with the sequences of the corneal isolates. **Conclusion:** These results indicate that the recent increase of *Acanthamoeba* keratitis incidence in Japan is not due to the emergence of novel amoebic genotypes, but to increased incidence of infection by known genotypes.

(Atarashii Ganka (Journal of the Eye) 29(3) : 397~402, 2012)

〔別刷請求先〕 井上幸次：〒683-8504 米子市西町36-1 鳥取大学医学部視覚病態学

Reprint requests: Yoshitsugu Inoue, M.D., Ph.D., Division of Ophthalmology and Visual Science, Faculty of Medicine, Tottori University, 36-1 Nishi-cho, Yonago 683-8504, JAPAN

**Key words** : アカントアメーバ角膜炎, 分子疫学, T タイピング, 18S ribosomal RNA, 多施設共同研究. *Acanthamoeba keratitis, molecular epidemiology, T typing, 18S ribosomal RNA, multicenter study.*

## はじめに

アカントアメーバは土壌・水中をはじめ自然界に広く生息する原虫であり, 水道水からも検出される。アカントアメーバにより角膜炎を発症することは1974年にはじめて報告された<sup>1)</sup>が, 本来は外傷に伴う非常にまれな感染症であった。しかし, その後コンタクトレンズ (CL) 装用に伴う感染として認められるようになり, わが国では1988年に石橋ら<sup>2)</sup>がはじめて報告した。当初はそれでもまれな疾患であったが, CL保存に水道水を用いることのできたソフィーナ<sup>®</sup>での感染が多いことが注目されるようになり, その後しだいに報告が増加し, 特に2006年頃からは急速に増えて, 従来報告のなかった北海道や東北でも症例が報告されるようになった。2007年4月~2009年3月にかけて行われたコンタクトレンズ関連角膜炎の全国調査<sup>3)</sup>でも, 入院を必要としたCL関連角膜炎の2大起炎菌として緑膿菌とともに浮かび上がった。その多くが, multi-purpose solution (MPS) をケア用品として使用している頻回交換型のCLユーザーであり, MPSのアカントアメーバに対する効果が低いことが検証されるとともに, CLユーザーの最大の合併症として, その診断・治療や予防対策の重要性が高まっている。

このような状況のなかで, わが国のアカントアメーバ角膜炎 (AK) の原因となっているアメーバの感染源・感染経路, アメーバ感染の地域差や年次動向, アメーバ株と臨床所見・治療への反応性・予後との関係を疫学的に調べる必要性が生じてきた。アカントアメーバを疫学的に分類・比較するにあたって, 形態学的に分類することはもちろん重要だが, 培養条件によって, 形態を変化させるアカントアメーバの場合, 限界があり, 現在は, アカントアメーバのDNAを利用して分子遺伝学的に分類, 同定することが主流となっている。

アカントアメーバの遺伝子型別の方法としてはTタイピングが用いられている。これは1996年Gastらにより提唱され, 18S ribosomal RNA (18S rRNA) をコードしているDNAを用いて行われる<sup>4)</sup>。この方法では2つのシーケンスを全長比較して相同性が5%以上違う場合, 別々のTタイプと分類される。現在15のタイプがあり, 1つのTタイプには多種類のシーケンスが含まれる。これまでT1-T6, T10-T12のアメーバが角膜炎あるいはアメーバ性脳炎より検出されている。タイピングは特定の集団と疾患との関連を調べるうえできわめて有用である。

今回, 筆者らは先に述べたコンタクトレンズ関連角膜炎調査研究班の施設を中心に多施設からのアカントアメーバ株を国立感染症研究所寄生動物部に集積し, Tタイピングに

よる解析を行った。この研究は厚生労働省の新興・再興感染症研究事業の一環として行われており, 現在も参加施設を増やして継続中であるが, 本報告では最初の2年の結果を中間報告としてまとめる。

## I 対象および方法

### 1. 対象

対象は, 全国の6施設 (鳥取大学, 愛媛大学, 徳島大学, 東京女子医科大学東医療センター, 山口大学, 京都府立医科大学) の眼科に2009年4月~2010年12月の間に受診したAK患者の角膜擦過物, CLケース (保存液), MPSボトル, 使用環境 (洗い場) から分離されたアカントアメーバ株および, これらの施設で過去に分離され, 保存されていた株を対象とした。本研究については, 各施設の倫理委員会にかけて了承を得, 過去に分離された株も含めて, 本研究に使用することを患者本人あるいは代諾者に文書で承諾を得た。

角膜擦過物から27株, CLケース (保存液) から15株, MPSボトルから1株, 計43株が対象である。

### 2. アカントアメーバの培養と無菌クローン化

アカントアメーバは大腸菌を塗布した1.5% non-nutrient agar (NN培地) 上で25℃にて分離, 培養した。これをキャピラリーピペットによる釣り上げ法 (micro-manipulation法) にて単離し, さらに大腸菌寒天培地上でクローン培養した<sup>5)</sup>。

無菌化の手順としては, クローン化したアカントアメーバのシストを1mlの0.1N塩酸溶液中で, 37℃にて一晚処理を行った後, 500×g, 5分間遠心分離を行ってシストを沈殿させた。その後, 塩酸を除去して滅菌蒸留水に浮遊させ, 同じ条件で再度遠心を行った。滅菌蒸留水を除去し, 得られたシストを100単位/mLのペニシリン (明治製菓) と, 100μg/mLのストレプトマイシン (明治製菓) を添加し, PYGC培地 (10g/L Proteose peptone, 5g/L NaCl, 10g/L Yeast extract, 10g/L Glucose, 0.95g/L L-Cysteine, 10mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 5mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) で培養した<sup>5)</sup>。

### 3. DNA解析

遺伝子抽出キットQIAamp<sup>®</sup> DNA Mini Kit [(株) キアゲン] を使用して, 添付のプロトコールに従ってDNAを抽出した。

抽出したアメーバDNAを, GeneAmp<sup>®</sup> PCR (polymerase chain reaction) system 2400により, アメーバ特異プライマーであるJDP1-JDP2を用い, 18S rRNA遺伝子の高可変領域の一つであるDF3 (diagnostic fragment 3) を含む約

400塩基対を既報の温度条件で増幅した<sup>6)</sup>。

PCRにて増幅された産物の塩基配列を蛍光シーケンサー (ABI PRISM<sup>®</sup> 310 Genetic Analyzer) を用いて、シーケンス用プライマー 892Cにより解析した<sup>6)</sup>。

#### 4. ホモロジー検索

このようにして得られた塩基配列を BLAST (basic local alignment search tool) を用いて GenBank, EMBL (European Molecular Biology Laboratory), DDBJ (DNA Data Bank of Japan) に登録された株と照合した。データベースに登録された株で、対象株と同一性の最も高いものを検索し、データベース登録名、対象株と登録株との同一性、登録株の分離元を調べた。

#### 5. 系統樹作製

対象株とデータベースに登録されている T タイピング (T1~T15) の代表的な株を用いて、解析用プログラムとして Clustal W を用いて系統樹を作製した。

## II 結 果

### 1. 角膜分離 27 株ホモロジー検索の結果

角膜分離 27 株の T タイピングの結果では 1 株のみが T11

であったが、他は T4 であった (96.3%)。T4 に属する 26 株のうち 22 株は角膜炎より分離されている既知の配列と一致し、それ以外の 4 株は角膜炎分離株では認められないものやより既知の配列と一致した (表 1)。

ホモロジー検索の結果をもとに、系統樹を描く (図 1) と T4 の中で特定の遺伝的集団を形成せず、遺伝的には多様性を認め 15 種類に分かれた。そのうち、複数株、複数地域に検出されるシーケンスのタイプとして、ATCC30461 Eye strain や ATCC50497 Rowdon strain などと同一性を認めるものが存在した (図 2)。

### 2. CL ケース (保存液) 由来株・MPS ボトル由来株と角膜分離株の関係 (表 2)

保存液分離株 15 株のシーケンスはすべて T4 であったが、10 種類のシーケンスタイプに分かれた。このタイプでは、患者の角膜分離株とともに分離された 9 組中 6 組は一致したが、3 組では一致しなかった。MPS ボトル由来の 1 株についてはその患者の角膜分離株および CL ケース (保存液) 由来株の 3 者のシーケンスタイプが一致した。

表 1 アカントアメーバ角膜炎患者の角膜擦過物由来株の 18S rRNA 遺伝子タイピング

由来	試料 ID	T type	BLAST で同一性の高かった (99-100%) 株の配列	左記配列の分離試料
角膜	1-1-1	T4	ATCC50497 <i>Acanthamoeba</i> sp. Rowdon strain	Keratatis
角膜	1-2-1	T4	ATCC50497 <i>Acanthamoeba</i> sp. Rowdon strain	Keratatis
角膜	1-3-1	T4	<i>Acanthamoeba</i> sp. S2JDP	Soil
角膜	1-5-1	T4	ATCC30461 <i>A. polyphaga</i> Eye strain	Keratatis
角膜	1-6-1	T4	ATCC50497 <i>Acanthamoeba</i> sp. Rowdon strain	Keratatis
角膜	1-7-1	T4	<i>Acanthamoeba</i> sp. KA/E10	Keratatis
角膜	1-8-1	T4	<i>Acanthamoeba</i> sp. KA/E6	Keratatis
角膜	1-9-1	T4	<i>Acanthamoeba</i> sp. Vazaldua	Keratatis
角膜	3-1-1	T4	<i>Acanthamoeba</i> sp. CDC #V390	Brain, Skin
角膜	3-2-1	T4	ATCC30461 <i>A. polyphaga</i> Eye strain	Keratatis
角膜	3-3-1	T4	ATCC 50370 <i>A. castellanii</i> Ma strain	Keratatis
角膜	3-4-1	T4	ATCC 50374 <i>A. castellanii</i> Castellani	Yeast culture
角膜	3-7-1	T4	ATCC 50370 <i>A. castellanii</i> Ma strain	Keratatis
角膜	4-1-1	T4	<i>Acanthamoeba</i> sp. CDC # V390	Brain, Skin
角膜	4-3-1	T4	ATCC50497 <i>Acanthamoeba</i> sp. Rowdon strain	Keratatis
角膜	4-4-1	T4	ATCC30461 <i>A. polyphaga</i> Eye strain	Keratatis
角膜	4-5-1	T4	<i>A. castellanii</i> CDC #V042	Keratatis
角膜	6-2-1	T4	ATCC30461 <i>A. polyphaga</i> Eye strain	Keratatis
角膜	6-5-1	T4	ATCC30461 <i>A. polyphaga</i> Eye strain	Keratatis
角膜	7-1-1	T11	<i>A. hatchetti</i> 4RE	Keratatis
角膜	7-2-1	T4	<i>Acanthamoeba</i> sp. KA/E24	Keratatis
角膜	7-3-1	T4	<i>Acanthamoeba</i> sp. KA/E6	Keratatis
角膜	7-4-1	T4	<i>Acanthamoeba</i> sp. UIC 1060 voucher	Keratatis
角膜	7-5-1	T4	<i>Acanthamoeba</i> sp. CDC #V014	Keratatis
角膜	9-1-1	T4	<i>Acanthamoeba</i> sp. CDC #V062	Keratatis
角膜	9-2-1	T4	<i>Acanthamoeba castellanii</i> CDC #V042	Keratatis
角膜	9-3-1	T4	<i>Acanthamoeba</i> sp. KA/E6	Keratatis



図1 角膜分離 27 株の系統関係  
26 株は T4 に含まれ、1 株のみ T11 であった。

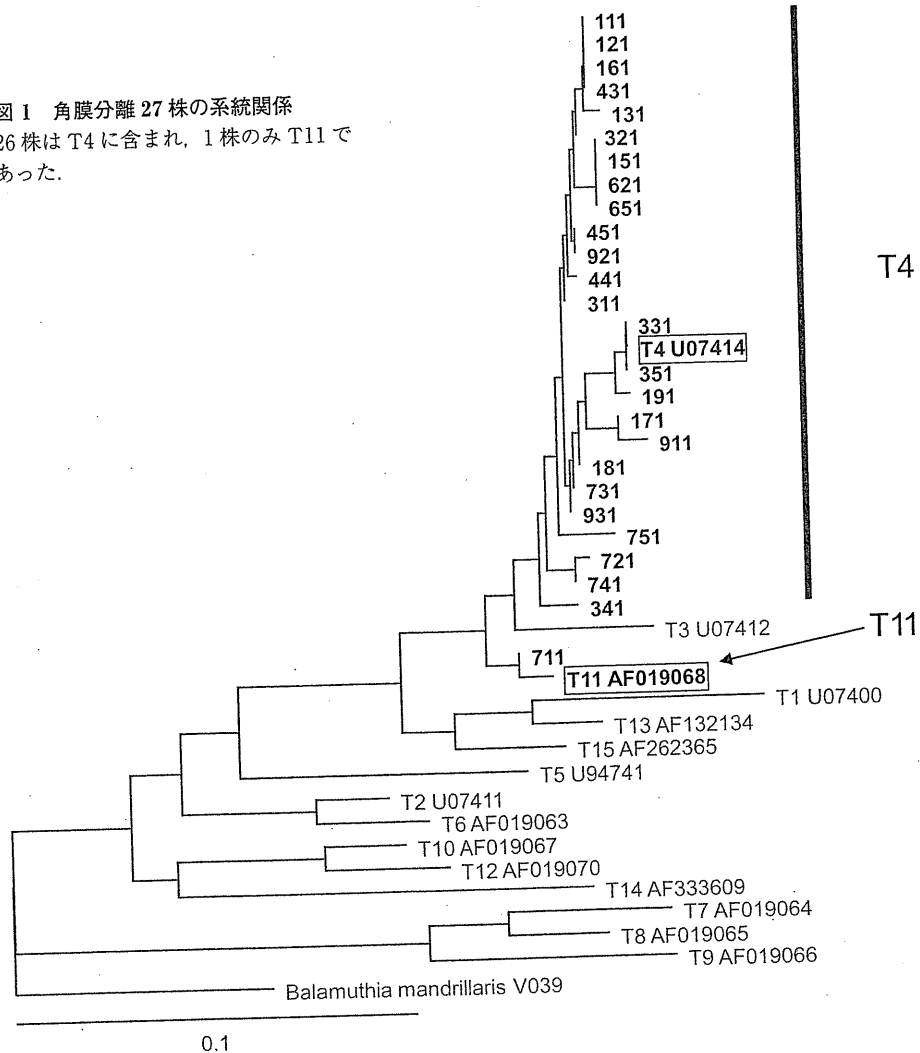


表2 アカントアメーバ角膜炎患者のレンズケース (保存液)・MPS ボトル・使用環境 (洗い場) 由来株の 18S rRNA 遺伝子タイピングと角膜由来株との一致性

試料	試料 ID	T type	BLAST で相同性の高かった (99-100%) 株の配列	左記配列の分離試料	角膜分離株との一致性
保存液	1-3-2	T4	<i>Acanthamoeba</i> sp. S2JDP	Soil	一致
保存液	1-4-2	T4	<i>Acanthamoeba</i> sp. S15	Keratatis	不明
保存液	1-5-2	T4	ATCC30461 <i>A. polyphaga</i> Eye strain	Keratatis	一致
保存液	1-6-2	T4	ATCC50497 <i>Acanthamoeba</i> sp. Rowdon strain	Keratatis	一致
保存液	1-7-2	T4	<i>Acanthamoeba</i> sp. KA/E10	Keratatis	不一致
保存液	3-1-2	T4	<i>Acanthamoeba</i> sp. KA/E6	Keratatis	不一致
保存液	3-2-2	T4	<i>Acanthamoeba</i> sp. CDC #V390	Keratatis	一致
保存液	3-5-2	T4	<i>Acanthamoeba</i> sp. KA/E6	Brain, Skin	不明
保存液	4-2-2	T4	<i>Acanthamoeba</i> sp. CDC # V390	Keratatis?	不明
保存液	6-1-3	T4	<i>Acanthamoeba</i> sp. CDC #V062	Keratatis	一致*
保存液	6-2-2	T4	ATCC30461 <i>A. polyphaga</i> Eye strain	Keratatis	不一致
保存液	6-5-2	T4	<i>Acanthamoeba</i> sp. CDC #V014	Keratatis	不明
保存液	6-10-2	T4	ATCC30461 <i>A. polyphaga</i> Eye strain	Keratatis	不明
保存液	6-11-2	T4	<i>Acanthamoeba</i> sp. KA/E10	Keratatis	不明
保存液	9-4-1	T4	<i>Acanthamoeba</i> sp. CDC #V042	Keratatis	不明
MPS	6-2-3	T4	ATCC30461 <i>A. polyphaga</i> Eye strain	Keratatis	一致*

\*角膜とレンズケース (保存液) とケア用品の 3 者で一致。

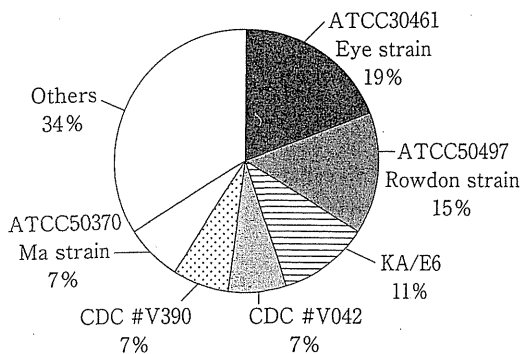


図2 シークエンスタイプの検出頻度  
多くのタイプが認められたが、Eye strain 次いで Rowdon strain が多かった。

### III 考 按

AKの原因となったアメーバのTタイピングについてはすでに各国から報告がなされており、わが国でも高岡らの報告がある<sup>5)</sup>が、今回のように多施設で広く日本の株を集めて行われたスタディははじめてである。

今回の報告では1株を除いてすべてをT4が占めており、これは過去の多くの報告と一致している。たとえば、Ledeeら<sup>7)</sup>は米国フロリダ州のAK患者のサンプル37株のうち36株がT4、1株のみT5であったと報告している。一方、Yeraら<sup>8)</sup>はフランスのアカントアメーバ分離株37株のうち、AK患者由来の10株はすべてT4であったとしている。ただし、それ以外のCL使用者のCL、保存液でも79%がT4であるとしており、臨床的に重要なT4はもともと環境中に最も多く認められるグループである(半数以上)ことには留意が必要であり<sup>9)</sup>、より多くの環境に適応しうる能力をもっていると考えられ、そのため保存液中で生存しやすく、さらにはアカントアメーバにとって決して住みやすいとは言いがたい角膜でも生存しうるのではないかと推察される。

今回のスタディでは1株のみT11が認められたが、T11が角膜炎を発症するという報告は過去にもすでにあり<sup>10)</sup>、本研究のこの症例(試料ID 7-1-1)が特に他の症例と比較して臨床所見に特徴があるとか、難治であるとかいうことはなかった(データ示さず)。また、今回のスタディには1例、非CL装用者の症例が含まれており(試料ID 1-2-1)、感染経路は不明で1カ月ほどの間に急速に進行して穿孔し、治療的角膜移植を要したが、この症例も分類上はT4で、しかも今回2番目に多いサブタイプであるRowdon strainに含まれていた(データ示さず)。インドではCLと関係ないAK患者が多いが、分離株はやはりT4であることが報告されており<sup>11)</sup>、CLとT4との間に特別な結びつきがあるわけではないようである。

T4の中のサブタイプで、Eye strainの患者5名は愛媛・

徳島・岡山・静岡と瀬戸内および太平洋側に分布しており、Rowdon strainの4名は鳥取・京都の患者で、日本海側であった(データ示さず)。これが地域差を示すものか、偶然のものかは個々のグループの株数が少ないため、結論できないが、興味深い傾向であり、株数を増やして解析を続け、明らかにしていきたい。

感染症の分子サーベイランスの効能として、高病原性株や薬剤抵抗株の発生監視やアウトブレイク時の迅速な要因解明と感染拡大の阻止があり、AKでもこれが一つの重要な目的となる。たとえば、米国シカゴ周辺で上水道の消毒の方法が変更になったことに伴って生じたと推測されるAKのアウトブレイク(2003~2005年)の株を解析した報告があり<sup>12)</sup>、87%がT4、13%がT3であったが、アカントアメーバ角膜炎からの分離株として報告されたことのない新たなシークエンスタイプの株は見つからなかったとしている。また、Zhangら<sup>13)</sup>は中国北部のAK患者からのアカントアメーバは26株中25株はT4、1株はT3だったが、18株(69.2%)はユニーク・シークエンスだったとしている。今回、わが国のAKの増加を受けて、解析を行ったが、新たなシークエンスタイプは見つからず、特定のシークエンスタイプへの集積も認められなかった。

本報告で、角膜とCLケース(保存液)の株を比較できた9例のうち、6例はシークエンスタイプが一致しており、これは十分予想されることであったが、3例においては不一致であった。これをどう考えるかであるが、一つはCLケース(保存液)に複数の株が汚染しており、そのうちの一つが角膜に感染を起し、別の一つが保存液から分離された可能性である。もう一つの可能性として、不一致例では、角膜感染株はCL保存液でなく、CLを使用している洗い場などの環境由来と考えることもできる。Bootonら<sup>14)</sup>は香港のAK患者の角膜擦過物と家の水道水から分離された株は一致しなかったとしている。今回の筆者らの検討では使用環境(洗い場)由来株が1株しかなく、かつその症例では角膜から分離ができていないため、本報告からは除外した。今後、環境由来株も増やして、角膜由来株との一致性について検討していきたい。

本研究では、アカントアメーバ分子疫学を行うにあたって、アメーバ株のクローン化と無菌化を行ったが、このように、分離株を保存し、研究資源として活用していくうえでも分子疫学は有用である。

今回の分子疫学により、国内AKの起因アメーバのほとんどはT4タイプであったが、特定のシークエンスのタイプには収束せず、近年のわが国のAK増加は、新たな高病原性タイプあるいは株の出現ではなく、以前から環境中に生息していたT4中の多くのシークエンスタイプのアメーバの感染リスクが増加したものであると考えられた。いくつかのシ

ークエンスタイプの異なるアメーバが角膜より高頻度で検出されたが、アメーバ自体の生物学的特性の関与か、地域性(環境, 温度など)の違いなのかは不明である。

アカントアメーバについては病原因子の解析が十分ではなく、細胞表面への付着に関与するマンノース結合性蛋白や蛋白分解酵素の関与がいられている<sup>15,16)</sup>ものの、Tタイピングがそのような性質や病原性と関連するかどうかはまだよくわかっていない。今後は、参加施設数を増やしてアメーバ株をさらに集積し、使用環境からの分離株も増やして分子疫学を継続・拡大し、感染経路、地域差や温暖化による影響などについて検討するとともに、アメーバ株に対する薬剤感受性試験を行い、臨床所見とも比較することによって、臨床病型や治療経過との関連についても検討を加えていく予定である。

本研究は厚生労働科学研究費補助金 新興・再興感染症研究事業「顧みられない病気に関する研究」「顧みられない寄生虫病の効果的監視法の確立と感染機構の解明に関する研究」の分担研究として行われた。

以下のコンタクトレンズ関連角膜炎感染症全国調査委員会委員の先生方に多くの有益なご助言をいただきました。ここに深謝致します。

石橋康久(東鷲宮病院眼科), 植田喜一(ウエタ眼科), 稲葉昌丸(稲葉眼科), 宇野敏彦(愛媛大学), 田川義継(北海道大学), 福田昌彦(近畿大学)。(敬称略)

#### 文 献

- 1) Naginton J, Watson PG, Playfair TJ et al : Amoebic infection of the eye. *Lancet* 2 : 1537-1540, 1974
- 2) 石橋康久, 松本雄二郎, 渡辺亮子ほか : Acanthamoeba keratitis の 1 例—臨床像, 病原体検査法および治療についての検討—。日眼会誌 92 : 963-972, 1988
- 3) 宇野敏彦, 福田昌彦, 大橋裕一ほか : 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
- 4) Gast RJ, Ledee DR, Fuerst PA et al : Subgenus systematics of *Acanthamoeba* : four nuclear 18S rDNA sequence types. *J Eukaryot Microbiol* 43 : 498-504, 1996
- 5) 高岡紀子, 八木田健司, 山上 聡ほか : 当院で得られたアカントアメーバの遺伝学的分類。眼科 52 : 1811-1817, 2010
- 6) Schroeder JM, Booton GC, Hay J et al : Use of subgenetic

- 18S ribosomal DNA PCR and sequencing for genus and genotype identification of *Acanthamoebae* from humans with keratitis and from sewage sludge. *J Clin Microbiol* 39 : 1903-1911, 2001
- 7) Ledee DR, Iovieno A, Miller N et al : Molecular Identification of T4 and T5 genotypes in isolates from *Acanthamoeba* keratitis patients. *J Clin Microbiol* 47 : 1458-1462, 2009
- 8) Yera H, Zamfir O, Bourcier T et al : The genotypic characterisation of *Acanthamoeba* isolates from human ocular samples. *Br J Ophthalmol* 92 : 1139-1141, 2008
- 9) Booton GC, Visvesvara GS, Byers TJ et al : Identification and distribution of *Acanthamoeba* species genotypes associated with nonkeratitis infections. *J Clin Microbiol* 43 : 1689-1693, 2005
- 10) Lorenzo-Morales J, Morcillo-Laiz R, Lopez-Velez R et al : *Acanthamoeba* keratitis due to genotype T11 in a rigid gas permeable contact lens wearer in Spain. *Contact Lens Anterior Eye* 34 : 83-86, 2011
- 11) Sharma S, Pasricha G, Das D et al : *Acanthamoeba* keratitis in non-contact lens wearers in India. DNA typing-based validation and a simple detection assay. *Arch Ophthalmol* 122 : 1430-1434, 2004
- 12) Booton GC, Joslin CE, Shoff M et al : Genotypic identification of *Acanthamoeba* sp. isolates associated with an outbreak of *Acanthamoeba* keratitis. *Cornea* 28 : 673-676, 2009
- 13) Zhang Y, Sun X, Wang Z et al : Identification of 18S ribosomal DNA genotype of *Acanthamoeba* from patients with keratitis in North China. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 45 : 1904-1907, 2004
- 14) Booton GC, Kelly DJ, Chu Y-W et al : 18S ribosomal DNA typing and tracking of *Acanthamoeba* species isolates from corneal scrape specimens, contact lenses, lens cases, and home water supplies of *Acanthamoeba* keratitis patients in Hong Kong. *J Clin Microbiol* 40 : 1621-1625, 2002
- 15) Cao Z, Jefferson DM, Panjwani N : Role of carbohydrate-mediated adherence in cytopathogenic mechanisms of *Acanthamoeba*. *J Biol Chem* 273 : 15838-15845, 1998
- 16) Hurt M, Niederkorn J, Alizadeh H : Effects of mannose on *Acanthamoeba castellanii* proliferation and cytolytic ability to corneal epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 44 : 3424-3431, 2003

\* \* \*

## コンタクトレンズケース内汚染の現状

稲葉昌丸<sup>1</sup>, 糸井素純<sup>2</sup>, 井上幸次<sup>3</sup>, 植田喜一<sup>4</sup>, 大橋裕一<sup>5</sup>, 佐渡一成<sup>6</sup>, 水谷 聡<sup>7</sup>,  
宮崎 大<sup>3</sup>, 宮本仁志<sup>8</sup>, 矢倉慶子<sup>3</sup>

大阪市 (稲葉眼科)<sup>1</sup>, 東京都 (道玄坂糸井眼科医院)<sup>2</sup>, 鳥取大学医学部視覚病態学<sup>3</sup>, 下関市 (ウエダ眼科)<sup>4</sup>,  
愛媛大学大学院医学系研究科視機能外科学分野<sup>5</sup>, 仙台市 (さど眼科)<sup>6</sup>, 名古屋市 (水谷眼科診療所)<sup>7</sup>,  
愛媛大学医学部附属病院臨床検査部<sup>8</sup>

## Present Status of Contact Lens Contamination

Masamaru Inaba<sup>1</sup>, Motozumi Itoi<sup>2</sup>, Yoshitsugu Inoue<sup>3</sup>, Kiichi Ueda<sup>4</sup>, Yuichi Ohashi<sup>5</sup>, Kazushige Sado<sup>6</sup>,  
Satoshi Mizutani<sup>7</sup>, Dai Miyazaki<sup>3</sup>, Hitoshi Miyamoto<sup>8</sup> and Keiko Yagura<sup>3</sup>

Osaka City (Inaba Eye Clinic)<sup>1</sup>, Tokyo (Dougenzaka Itoi Eye Clinic)<sup>2</sup>,  
Division of Ophthalmology and Visual Science, Faculty of Medicine, Tottori University<sup>3</sup>, Shimonoseki City (Ueda Eye Clinic)<sup>4</sup>,  
Department of Ophthalmology, Ehime University School of Medicine<sup>5</sup>, Sendai City (Sado Eye Clinic)<sup>6</sup>,  
Nagoya City (Mizutani Eye Clinic)<sup>7</sup>, Department of Clinical Laboratory, Ehime University School of Medicine<sup>8</sup>

コンタクトレンズ (CL) ケースの細菌, 真菌およびアカントアメーバ汚染の現状を調査するために, コンプライアンス良好なソフト CL (SCL), ハード CL (HCL) 装用者の使用中の CL ケースを回収した。351個の CL ケースが回収され, うち SCL ケースが237個, HCL ケースが114個であった。アカントアメーバは培養では検出されず, polymerase chain reaction (PCR) 法による DNA 検査結果も否定的であった。培養検査によって SCL ケースの27.0%に細菌が, 4.7%に真菌が, 28.7%に細菌または真菌が検出された。HCL ケースでは50.9%に細菌が, 7.0%に真菌が, 50.9%に細菌または真菌が検出され, HCL ケースの方が有意に高い汚染率を示した。また, 使用者の CL および CL ケース管理に関するコンプライアンスは, HCL 装用者の方が不良だった。CL ケースの乾燥程度を「乾燥」, 「液滴が残る」, 「液体が入っている」に分けると, 「液滴が残る」ケースが最も高い汚染率を示した。よい CL および CL ケース管理によって CL ケースの汚染を防止することはある程度可能である。HCL 装用者の CL ケースは汚染されていることが多い。CL ケースは完全に乾燥するように注意する必要がある。

(日コレ誌 54 : 31-40, 2012)

キーワード : コンタクトレンズケース, 汚染, コンタクトレンズケア, 細菌, アカントアメーバ

To investigate the current status of contact lens (CL) case contamination, CL cases were collected from users of soft CLs (SCLs) and hard CLs (HCLs) who were in good compliance with lens care procedures. Among the 351 CL cases collected, 237 were for SCLs and 114 were for HCLs. *Acanthamoeba* was not found on cultures, and polymerase chain reaction (PCR) amplification found low levels of *Acanthamoeba* DNA. The results of culturing SCL cases showed bacteria in 27.0% of cases, fungi in 4.7%, and bacteria or fungi in 28.7%. Cultures of HCL cases showed higher proportions with bacteria (50.9%), fungi (7.0%), and bacteria or fungi (50.9%). In addition, compliance with CL and CL case care was worse in HCL wearers. When CL cases were classified according to whether they were "dried", had "drop remains", or were "filled with fluid", the highest contamination rate was among cases with "drop remains". Good CL and CL case care can prevent CL case contamination to some extent. CL cases from HCL users are frequently contaminated. Care should be taken to dry CL cases completely.

(J Jpn CL Soc 54 : 31-40, 2012)

Key Words : Contact Lens Case, Contamination, Contact Lens Care, Bacteria, *Acanthamoeba*

### 緒 言

コンタクトレンズ (以下 CL) 装用に伴う角膜感染症は, 重症化すれば入院加療が必要となり, 治療を行っても矯正

視力の低下を残すことがあるため, 医学的にも社会的にも重大な問題となっている<sup>1-3)</sup>。角膜感染症の病原菌は細菌, 真菌, アカントアメーバなどと多彩であるが, ケア不良が原因となって CL ケースの病原菌汚染が生じ, これが CL

装用時に眼表面に移動して感染を起こすと考えられる<sup>4)</sup>。このため、CLケースの汚染調査は以前から国内外で行われてきたが、大半の報告は調査対象の半数以上においてCLケース、あるいはCLケース液が汚染されていることを示している<sup>5)</sup> (国民生活センター：ソフトコンタクトレンズ用消毒剤のアカントアメーバに対する消毒性能。報道発表資料：2009年12月16日。2011年6月現在、[http://www.kokusen.go.jp/pdf/n-20091216\\_1.pdf](http://www.kokusen.go.jp/pdf/n-20091216_1.pdf) からダウンロード可能)。CLおよびCLケースケアの有効性を確認するためには、良好なケアによってCLケースの汚染を防ぐことが可能なのか、どの程度までCLケースを清潔に保つことができるかを知る必要がある。

このため良好なCLおよびCLケースケアを行っていると考えられるソフトCL (以下 SCL) およびハードCL (以下 HCL) 装用者が、現在使用しているCLケースの細菌、真菌、アカントアメーバによる汚染の発生率を調査した。

対象および方法

1. 対象

CLケアの指導を積極的に行っている (表1)、全国5箇所のCL処方施設 (表2) を、2010年6~10月の間に、定期検査のために再診した、ほかに眼疾患がなくコンプライアンスが良好な2週間交換または1カ月、3カ月交換SCL

表1 参加した調査施設における、コンタクトレンズ (CL) およびCLケースケアの指導内容

CL種別	ソフトCL (SCL)						
	多目的用剤 (MPS)		過酸化水素剤	MPS, 過酸化水素剤共通			
ケア内容	CLを脱後にこすり洗う	CLを脱後にすすぐ	装着前にCLをすすぐ	装着前にCLをすすぐ	装着後のCLケースをすすぐ	装着後のCLケースを乾燥させる	定期的にCLケースを交換する
施設A	○	○	○	○	○	○	○
施設B	○	○	○	○	○	○	○
施設C	○	○	○	△	○	○	○
施設D	○	○	○	△	○	○	○
施設E	○	○	○	○	○	○	○

CL種別	ハードCL (HCL)			
	ケア内容	装着後のCLケースを空にする	装着後のCLケースをすすぐ	装着後のCLケースを乾燥させる
施設A	○	○	○	△
施設B	○	○	○	○
施設C	○	○	△	△
施設D	○	○	○	○
施設E	○	○	○	○

○：必ず指導している、△：時々指導している

装用者およびHCL装用者である。

2. 方法

調査施設に各80セットずつのCLケース回収用封筒およびCLケア状況調査のためのアンケート用紙 (表3) を、新品CLケースとともに用意し、定期検査のために来院した患者に配布した。患者には帰宅後、使用中のCLケースをそのまま (ふたを開けておいてある場合はふたを閉めさせて)、記入したアンケート用紙とともに回収用封筒に入れて調査施設に返送させた。調査施設は返送された封筒を冷蔵保存し、1週間ごとにまとめて菌検査施設に送付した。菌検査は愛媛大学医学部附属病院臨床検査部が表4の手順に従って半定量検査を行った。また、最初の305例については、アカントアメーバの polymerase chain reaction (以下 PCR) 検査を、鳥取大学が表5の手順に従って行った。同時に回収されたアンケート用紙も各調査項目を解析した。細菌検査結果については、検出菌種数と半定量結果に基づく各CLケースの「汚染度」を表6のように定義して算出した。

CLケースはHCL用、SCL用ともに、左右眼で保存区画が分かれているものと、同一区画に左右のCLを保存するものがあった。すべての保存区画を調査対象とする

表2 調査施設一覧

施設名	所在地	調査担当医師
さと眼科	宮城県	佐渡一成
道玄坂糸井眼科医院	東京都	糸井素純
水谷眼科診療所	愛知県	水谷 聡
稲葉眼科	大阪府	稲葉昌丸
ウエダ眼科	山口県	植田喜一

表3 患者に記入させたCLケア状況調査用アンケート用紙の記入項目概要

性別
年齢
使用CLの種類、メーカー名、製品名
ケア用品名
ケア用品をほかの容器に移し替え使用しているか?
CLケア前に手を洗っているか? 石けんを使用しているか?
脱後のCLをこすり洗いしているか?
脱後のCLをすすいでいるか?
装着前にCLをすすいでいるか?
装着後、CLケースを空にしているか?
装着後、CLケースをすすいでいるか?
装着後、CLケースを乾燥させているか?
CLケースを定期的に交換しているか?
現在使用中のCLケース (回収したCLケース) の使用期間
連続装用の有無
連続装用する場合、1週当たりの連続装用日数
SCLの交換期間を守っているか?
定期検査の受診間隔
こすり洗いの方法は? (掌上でCLを動かす、指先にはさんでこする、など)
CLの週平均装用日数
CLの1日平均装用時間

表 4 CL ケース汚染調査の菌検査手順

1. CL ケースに液が入っているか、液滴が認められる程度か、乾燥しているかを判定し、記録する。レンズケースに液がない場合は、1 ml の滅菌生理食塩水を入れて、ミキサーで混ぜる。
2. 液のうち、0.5ml を滅菌した大腸菌を塗ったクロモアガーカンジダ培地に落とし、室温にて10日培養後、鏡検にてアモバの有無を確認する。
3. 液のうち、約50 $\mu$ l を血液寒天培地/BTB 寒天培地に広げ、35 $^{\circ}$ C 48時間培養する。
4. 残った液はアモバ polymerase chain reaction (PCR) 検査 (表 5) に使用する。
5. 48時間後、3. の培地でコロニーのグラム染色を行い、以下の手順で染色性および形態で区別し、性状を検査し同定を行う。
  - I. グラム陽性球菌
    - ①カタラーゼ試験陽性の場合、結合型コアグララーゼ試験を行い、黄色ブドウ球菌 (陽性) とコアグララーゼ陰性ブドウ球菌 (CNS) に分類する。
    - ②陰性の場合、EF 寒天培地に接種し発育が認められた場合は腸球菌と同定する。
    - ③EF 寒天培地に発育しない場合、血液寒天培地での  $\beta$  溶血性を観察し、溶連菌 (陽性)、他のレンサ球菌 (陰性) に分類する。溶連菌は群別を行う (A 群から F 群)。
    - ④  $\alpha$  溶血を示した場合、オプトヒン感受性試験を行い、感受性であれば *Streptococcus pneumoniae* と同定し、耐性であれば  $\alpha$ -*Streptococcus* とする。
    - ⑤溶血のない場合は  $\gamma$ -*Streptococcus* とする。
  - II. グラム陽性桿菌
    - ①芽胞陽性の場合 *Bacillus* 属と同定する。
    - ②芽胞陰性の場合、カタラーゼ試験陽性は *Corynebacterium* 属、陰性は通性嫌気性の *Lactobacillus* 属とする。
  - III. グラム陰性桿菌
    - クリグラー寒天培地でグルコースの発酵性の確認およびオキシダーゼ試験を行う。
      - ①グルコース発酵、オキシダーゼ陽性菌  
ビブリオ科、エロモナス科、プレジオモナス属として同定を進める。
      - ②グルコース発酵、オキシダーゼ陰性菌  
腸内細菌科として、  
クリグラー寒天培地、リジン鉄寒天培地、シモンズ・クエン酸ナトリウム培地、DNA 培地、SIM 培地、VP 半流動培地の性状により同定を進める。
      - ③グルコース非発酵、オキシダーゼ陽性菌  
シュードモナス属、バクホルデリア属、アルカリゲネス属、アクロモバクター属、クリセオバクター属として同定を進める。
      - ④グルコース非発酵、オキシダーゼ陰性菌  
ステノトロホモナス属、アシネトバクター属として同定を進める。
      - ⑤グルコース非発酵 (上記の③、④以外)  
ID テスト NF-18 を使用して、菌名を同定する。
6. 菌量はおよそ次のような基準で簡易定量を行う (単位は CFU/ml)。
  - ( $\pm$ )  $10^3$  以下
  - (+)  $10^{4-5}$
  - (2+)  $10^6$
  - (3+)  $10^7$  以上

BTB : brom thymol blue, SIM : sulfide-indole-motility, CFU : colony forming unit

と、1 症例で 1 区画が対象となるものと、2 区画が対象になるものが生じ、統計解析が複雑になるため、左右眼で保存区画が分かっている CL ケースについては、右眼用保存区画のデータのみを調査対象とすることにした。

結 果

5 施設合計で 400 セット配布した回収用封筒のうち、351 セットが回収され、回収率は 87.8% であった。内容は SCL ケースが 237 個、HCL ケースが 114 個であった。装用者の

表 5 アモバ PCR 検査の手順

- Real time-PCR (TaqMan Probe 法), Riviere D et al. J Microbiological Method 64 : 78-83, 2006 を改修して構築したもの
1. DNA 抽出 : QIAamp<sup>®</sup> DNA Mini Kit
  2. Real-time PCR 施行 : LightCycler<sup>®</sup>
    - i) プライマー : *Acanthamoeba* の 18S rDNA 領域を特異的に認識  
forward : 5' -CGACCAGCGATTAGGAGACG-3'  
reverse : 5' -CCGACGCCAAGGACGAC-3'
    - ii) プロープ : 5' -FAM-TGAATACAAAACACCACCATCGGCGC-BHQ
    - iii) 条件
 

	時間 (秒)	温度 ( $^{\circ}$ C)	ランプ ( $^{\circ}$ C/秒)
初期活性化ステップ	900	95	20
2 ステップサイクリング 変性	0	95	20
(サイクル数 : 50) アニール/エクステンション	60	60	20
  3. 既知濃度サンプル (*Acanthamoeba castellanii* strain Neff の genomic DNA (ATCC 30010D) より PCR で増幅した DNA fragment による検量線作成
  4. 解析 : LightCycler Software version 3.5

表 6 CL ケース汚染度の定義

表 4 の半定量検査結果を基に、(-) : 0, ( $\pm$ ) : 1, (+) : 2, (2+) : 3, (3+) : 4 のスコアを与え、複数検出例では各菌種についてのスコアを合計したものを、その CL ケースの汚染度とした。真菌は細菌と尺度が異なるため、汚染度算出から除外した。

例 1 : CNS ( $\pm$ )  $\rightarrow$  汚染度 = 1  
 例 2 : CNS (2+), *Acinetobacter* sp. (2+), *Steno. maltophilia* (3+)  $\rightarrow$  汚染度 = 3 + 3 + 4 = 10

CNS : coagulase-negative *Staphylococcus*

表 7 回収された CL ケースの使用者概要

	例数	性別	平均年齢 $\pm$ 標準偏差 (年齢幅)
全症例	351	男 : 92 例, 女 : 259 例	37.6 $\pm$ 12.5 歳 (14~77 歳)
SCL 装用者	237	男 : 58 例, 女 : 179 例	34.6 $\pm$ 11.5 歳 (14~68 歳)*
HCL 装用者	114	男 : 34 例, 女 : 80 例	43.9 $\pm$ 12.1 歳 (20~77 歳)*

\*Wilcoxon 順位和検定にて男女間で年齢分布に有意差あり (p = 0.000)

表 8 SCL 装用者の CL 種別, ケア用品種別

CL 種別・使用期間	例数
2 週間交換 SCL	217
1 カ月交換 SCL	17
3 カ月交換 SCL	3
CL 種別・CL 素材	
シリコーンハイドロゲル	133
シリコーンハイドロゲル以外の SCL 素材	104
ケア用品種別	
MPS (PHMB 含有)	112
MPS (Polyquad* 含有)	85
不明な多目的用剤	14
過酸化水素剤	18
不明なケア用品	8

MPS : 多目的用剤, PHMB : polyhexamethylenebiguanide, Polyquad\* : poly-quaternium-1

表9 CL ケースの左右区画分離の有無 (例)

	左右同区画	左右別区画
SCL ケース	16*	221**
HCL ケース	95	19

\*16例中15例は過酸化水素剤使用, 1例はケア用品名不明,  
\*\*221例中3例は過酸化水素剤使用, 7例はケア用品名不明,  
ほかはMPS使用

表11 左右同区画のCL ケースと左右別区画のCL ケース間での菌検出率比較

	菌検出率*	検出菌種数**	汚染度	アカントアメーバDNA 検出率	
SCL ケース (n=221)	左右別区画***	28.5%	0.5±0.9	0.7±1.7	12.2%
	左右同区画	31.3%	0.8±1.6	2.0±5.1	18.8%
	差	なし****	なし*****	なし*****	なし****
HCL ケース (n=19)	左右別区画***	31.6%	0.6±1.0	1.1±2.1	26.3%
	左右同区画	54.7%	1.1±1.2	2.7±3.7	22.1%
	差	なし****	なし*****	なし*****	なし****

細菌あるいは真菌の検出率, 汚染度 (表6), アカントアメーバDNA 検出率とも有意差はなかった

\*: 平均値±標準偏差, 真菌含む, \*\*: 平均値±標準偏差, 細菌のみ,  
\*\*\*: 右眼用区画のデータを使用, \*\*\*\*:  $\chi^2$ 検定,  
\*\*\*\*\*: Mann-Whitney U 検定

性別, 年齢などを表7に, SCL 装用者については使用CLの詳細とケア用品種別を表8に示す。HCL 装用者はSCL 装用者より有意に年齢が高かった。使用SCLの大半は2週間交換SCLであり, 過半数をシリコンハイドロゲルレンズが占めていた。また, SCL 装用者の大半は多目的用剤 (以下MPS) を使用していた。

CL ケース保存区画の左右分離の有無を表9に示す。HCL 保存ケース, 過酸化水素剤を使用しているSCL 装用者の保存ケースにおいては, 左右の区画が共通しているケースが大半を占めていた。逆に, MPSを使用するSCL 装用者の保存ケースはすべて左右別区画であった。左右が別区画になっているCL ケースについて, 菌検出率, 検出菌種数, 汚染度 (表6), PCR法によるアカントアメーバDNAの検出率の差をみたのが表10である。統計的に有意なレベルの左右差はなく, 左右別区画のCL ケースについて右眼用保存区画のデータのみを採用するのは妥当と判断した。また, 左右別区画のCL ケースと左右同区画のCL ケースについて, 菌検出率, 検出菌種数, 汚染度, PCR法によるアカントアメーバDNA 検出率の差を検討した (表11) が, 両者の間に統計的な有意差はなかった。以後の結果は, 左右別区画のCL ケースにおいてはすべて右眼用区画のデータのみを使用する。

全CL ケース中34.8%で細菌が, 35.9%で細菌または真菌が検出された (表12)。真菌の検出率は5.1%であった。

表10 同一CL ケースの左右区画間での菌検出率比較

	菌検出率*	検出菌種数**	汚染度 (表6)***	アカントアメーバDNA 検出率	
SCL ケース (n=221)	右眼用区画	28.5%	0.5±0.9	0.7±1.7	12.2%
	左眼用区画	28.5%	0.4±0.8	0.8±2.2	17.6%
	左右差	なし****	なし*****	なし*****	なし****
HCL ケース (n=19)	右眼用区画	31.6%	0.6±1.0	1.1±2.1	26.3%
	左眼用区画	47.4%	0.8±1.1	1.9±2.9	15.8%
	左右差	なし****	なし*****	なし*****	なし****

\*: 半定量で (±) およびそれ以上となった例, 真菌含む (培養ではアカントアメーバは検出されず),  
\*\* : 平均値±標準偏差, 真菌含む, \*\*\* : 平均値±標準偏差, 細菌のみ,  
\*\*\*\* :  $\chi^2$ 検定, \*\*\*\*\* : Mann-Whitney U 検定

表12 細菌, 真菌の検出率と汚染度

	細菌検出例	真菌検出例	細菌または真菌検出例	真菌のみ検出例	汚染度 (表6)
全CL ケース (351例)	122例 (34.8%)	18例 (5.1%)	126例 (35.9%)	4例 (1.1%)	1.3±2.7
SCL ケース (237例)	64例 (27.0%)* <sup>1</sup>	10例 (3.7%)	68例 (28.7%)* <sup>2</sup>	4例 (1.5%)	0.8±2.1* <sup>3</sup>
HCL ケース (114例)	58例 (50.9%)* <sup>1</sup>	8例 (7.0%)	58例 (50.9%)* <sup>2</sup>	0例 (0.0%)	2.4±3.5* <sup>3</sup>

\*<sup>1</sup>, \*<sup>2</sup>:  $\chi^2$ 検定にてSCL, HCL ケース間に有意差あり (p=0.000),  
\*<sup>3</sup>: Wilcoxon 順位和検定 (p=0.000), 分散分析 (p=0.000) にてSCL, HCL ケース間に有意差あり

表13 Real-time PCR 法によるアカントアメーバDNA 検出結果

	検査例数	207
	陽性例数	35
	最大値	497.5copies/ $\mu$ l
SCL ケース	平均	3.1copies/ $\mu$ l
	標準偏差	34.8copies/ $\mu$ l
	10.0copies/ $\mu$ l 以上の症例数	2
	100.0copies/ $\mu$ l 以上の症例数	1
	検査例数	78
	陽性例数	20
	最大値	14.2copies/ $\mu$ l
HCL ケース	平均	0.9copies/ $\mu$ l
	標準偏差	2.4copies/ $\mu$ l
	10.0copies/ $\mu$ l 以上の症例数	2
	100.0copies/ $\mu$ l 以上の症例数	0

SCL ケースの28.7%, HCL ケースの50.9%で細菌または真菌が検出された。細菌検出, 細菌または真菌の検出率, 汚染度ともにHCL ケースの方がSCL ケースより有意に高かった。真菌検出率にはSCL, HCL ケース間で有意差を認めなかった。アカントアメーバは培養では検出されなかった。Real-time PCR 法によるアカントアメーバDNA 検出率

表14 SCL ケースについて、ケア用品の違いによる検出菌種数、汚染度比較

ケア用品種別	例数	菌検出率*	検出菌種数**	汚染度**
過酸化水素剤	18	27.8%	0.6±1.5	1.4±4.7
MPS (PHMB 含有)	112	26.8%	0.4±0.8	0.6±1.5
MPS (Polyquad®含有)	85	29.4%	0.5±0.9	0.7±1.5
不明な MPS	14	28.6%	0.6±1.3	0.6±1.4
全 MPS	211	28.0%	0.5±0.9	0.7±1.5

分散分析および Wilcoxon 順位和検定にて各群間に有意差を認めず  
 \* : 平均値 ± 標準偏差, 真菌含む, \*\* : 平均値 ± 標準偏差, 細菌のみ

表16 SCL ケースについて、乾燥状態の違いによる検出菌種数、汚染度比較

CL ケースの乾燥状態	例数	菌検出率*	検出菌種数**	汚染度
乾燥している	208	27.9%	0.5±1.0	0.7±2.1
液滴を認める	17	47.1%	0.9±1.2	1.5±2.6
液体が入っている	12	16.7%	0.2±0.4	0.7±1.6

分散分析および Wilcoxon 順位和検定にて、全データにおいて各群間に有意差を認めず  
 \* : 平均値 ± 標準偏差, 真菌含む, \*\* : 平均値 ± 標準偏差, 細菌のみ

表17 SCL ケースについて、乾燥状態の違いによる細菌汚染度比較

CL ケースの乾燥状態	汚染度	
	汚染度 0	汚染度 1 以上
乾燥している	154例	54例
液滴を認める	9例	8例
液体が入っている	10例	2例

CL ケースの乾燥状態	汚染度 1 以下	汚染度 2 以上
乾燥している	179例	29例
液滴を認める	12例	5例
液体が入っている	10例	2例

汚染度 0, 汚染度 1 をそれぞれ基準として、乾燥状態の違いによる細菌汚染度を比較  
 汚染度 0 は細菌半定量 (-), 汚染度 1 は細菌半定量 (±) が 1 菌種のみ検出を意味する  
 $\chi^2$ 検定にて有意差なし

は表13に示すとおりであるが、ほとんどが10.0copies/ $\mu$ l 未満であり、10.0copies/ $\mu$ l 以上の症例は 4 例、100.0copies/ $\mu$ l 以上の症例は 1 例にすぎず、それも500.0copies/ $\mu$ l 以下であった。今回用いた real-time PCR 法の感受性はアメーバの個数をカウントするのと比較して、シストでは50倍以上、栄養体で300倍以上である。したがって、10copies/ $\mu$ l 未満の PCR 陽性例は、ケース内のアcantアメーバに限らず環境中のアcantアメーバの残渣などを検出している可能性が高く、今回の結果は臨床的に問題となるレベルには達しないと判断した。そのため、real-time PCR 法によるアcantアメーバ DNA 検出率は以後の検討対象から除外

表15 SCL ケースについて、ケア用品の違いによる細菌汚染度比較

ケア用品種別	汚染度 0 以下	汚染度 1 以上
過酸化水素剤	13例	5例
MPS (PHMB 含有)	85例	27例
MPS (Polyquad®含有)	61例	24例
不明な MPS	10例	4例
全 MPS	156例	55例

ケア用品種別	汚染度 1 以下	汚染度 2 以上
過酸化水素剤	15例	3例
MPS (PHMB 含有)	96例	16例
MPS (Polyquad®含有)	73例	12例
不明な MPS	12例	2例
全 MPS	181例	30例

汚染度 0, 汚染度 1 をそれぞれ基準として、ケア用品の違いによる細菌汚染度を比較  
 汚染度 0 は細菌半定量 (-), 汚染度 1 は細菌半定量 (±) を 1 菌種のみ検出を意味する  
 $\chi^2$ 検定および分散分析にて有意差なし

表18 HCL ケースについて、乾燥状態の違いによる検出菌種数、汚染度比較

CL ケースの乾燥状態	例数	菌検出率*1	検出菌種数*2	汚染度(表 6)
乾燥している	60	53.3%	0.8±1.1*3	1.9±3.1*5
液滴を認める	17	76.5%	1.8±1.3*3, *4	5.1±4.5*5, *6
液体が入っている	37	45.9%	0.8±1.0*4	2.0±3.2*6

\*1 : 平均値 ± 標準偏差, 真菌含む,  
 \*2 : 平均値 ± 標準偏差, 細菌のみ,  
 \*3~\*6 : 分散分析にて群間に差あり  
 (\*3 : p=0.002, \*4 : p=0.004, \*5 : p=0.001, \*6 : p=0.006),  
 \*7 :  $\chi^2$ 検定にて有意差なし

した。

SCL について、ケア用品の種別による検出菌種数、汚染度を比較したが、すべてのパラメータについてケア用品による差は認められなかった(表14)。また、汚染度によって 0 と 1 以上、および 1 以下と 2 以上にグループ分けし、ケア用品の種別との関連をみたが、統計的な有意差は認められなかった(表15)。

SCL について CL ケースの乾燥状態による菌検出率、検出菌種数、汚染度を比較した。液滴を認めるケースが最も検出率、菌種数、汚染度とも高かったが、統計的有意差は認められなかった(表16)。更に汚染度によって 0 と 1 以上、および 1 以下と 2 以上にグループ分けし、CL ケースの乾燥状態との関連をみたが、統計的な有意差は認められなかった(表17)。HCL について同様に CL ケースの乾燥状態による検出菌種数、汚染度を比較したところ、CL ケースに液滴を認めた症例は、CL ケースが乾燥、あるいは CL ケースに液体が入っている症例より、検出菌種数、汚染度ともに有意に大きかった(表18)。また、汚染度に



表19 HCL ケースについて、乾燥状態の違いによる細菌汚染度比較

CL ケースの乾燥状態	汚染度 0	汚染度 1 以上
乾燥している* <sup>1</sup>	32例	28例
液滴を認める* <sup>1</sup> * <sup>2</sup>	4例	13例
液体が入っている* <sup>2</sup>	20例	17例

CL ケースの乾燥状態	汚染度 1 以下	汚染度 2 以上
乾燥している* <sup>3</sup> * <sup>4</sup>	47例	13例
液滴を認める* <sup>3</sup>	7例	10例
液体が入っている* <sup>4</sup>	29例	8例

汚染度 0, 汚染度 1 をそれぞれ基準として、乾燥状態の違いによる細菌汚染度を比較

汚染度 0 は細菌半定量 (-), 汚染度 1 は細菌半定量 (±) が 1 菌種のみ検出を意味する

\*<sup>1</sup>~\*<sup>4</sup>:  $\chi^2$  検定にて群間に有意差あり

(\*<sup>1</sup>: p=0.029, \*<sup>2</sup>: p=0.004, \*<sup>3</sup>: p=0.003, \*<sup>4</sup>: p=0.007)

表21 シリコンハイドロゲルレンズとそれ以外の素材の SCL の比較

SCL 素材	例数	菌検出率* <sup>1</sup>	検出菌種数* <sup>2</sup>	汚染度* <sup>3</sup>
シリコンハイドロゲル	133	30.1%	0.5±0.8	0.7±1.5
それ以外	104	23.1%	0.4±1.0	0.9±2.7

SCL 素材の違いによる検出菌種数, 汚染度比較

\*<sup>1</sup>:  $\chi^2$  検定にて有意差なし

\*<sup>2</sup>: 平均値±標準偏差, 真菌含む, Wilcoxon 順位和検定, 分散分析にて有意差なし

\*<sup>3</sup>: 平均値±標準偏差, 細菌のみ, Wilcoxon 順位和検定, 分散分析にて有意差なし

表23 性差による検出菌種数, 汚染度比較

CL 種別	性別	例数	菌検出率* <sup>1</sup>	検出菌種数* <sup>2</sup>	汚染度* <sup>3</sup>
SCL	男	58	34.5%	0.6±0.9	1.1±2.2
	女	179	24.6%	0.7±2.9	0.8±2.1
HCL	男	34	58.8%	1.1±1.1	2.9±3.8
	女	80	47.5%	0.9±1.1	2.2±3.4

\*<sup>1</sup>: 真菌含む,  $\chi^2$  検定にて有意差なし,

\*<sup>2</sup>: 平均値±標準偏差, 細菌のみ, Wilcoxon 順位和検定, 分散分析にて有意差なし,

\*<sup>3</sup>: 平均値±標準偏差, 細菌のみ, Wilcoxon 順位和検定, 分散分析にて有意差なし

よって 0 対 1 以上, および 1 以下対 2 以上にグループ分けを行って CL ケースの乾燥状態との関連をみたところ, いずれのグループ分けにおいても, CL ケースに液滴を認めた症例において有意に汚染度が高かった (表19)。

真菌検出の有無と CL ケースの細菌汚染の関連を表20に示す。真菌が検出された CL ケースでは細菌の検出率, 汚染度ともに高く, SCL, HCL とともに細菌汚染と真菌汚染が関連して発生していることが示された。SCL ケースについてシリコンハイドロゲルレンズとそれ以外の SCL

表20 SCL, HCL ケースについて、真菌検出の有無と細菌汚染との関連比較

	真菌検出	細菌検出なし	細菌検出あり	汚染度
SCL	なし	169例	58例* <sup>1</sup>	0.4±0.8* <sup>2</sup>
	あり	4例	6例* <sup>1</sup>	1.5±1.6* <sup>2</sup>
HCL	なし	56例	50例* <sup>3</sup>	2.2±3.4* <sup>4</sup>
	あり	0例	8例* <sup>3</sup>	5.3±4.0* <sup>4</sup>

\*<sup>1</sup>:  $\chi^2$  検定にて群間に有意差あり (p=0.016)

\*<sup>2</sup>: Wilcoxon 順位和検定 (p=0.004), 分散分析 (p=0.000) にて有意差あり

\*<sup>3</sup>:  $\chi^2$  検定にて群間に有意差あり (p=0.010)

\*<sup>4</sup>: Wilcoxon 順位和検定 (p=0.003), 分散分析 (p=0.016) にて有意差あり

表22 施設間の細菌検出率, 汚染度の比較

CL 種別	施設名	細菌検出なし	細菌検出あり	汚染度
SCL	A	53	13	0.8±3.0
	B	31	13	0.6±1.3
	C	22	11	0.9±1.8
	D	50	19	0.8±1.7
	E	18	25	0.8±3.9
HCL	A*	3	0	0.0±0.0
	B*	5	12	3.8±4.2
	C	15	20	2.8±3.5
	D	3	2	4.4±6.1
	E	30	24	1.6±2.9

\*  $\chi^2$  検定にて AB 間のみ有意差あり (p=0.021)

ほかは  $\chi^2$  検定および分散分析にて, 施設間に有意差なし

間で, 菌検出率, 検出菌種数, 汚染度に有意な差はなかった (表21)。調査施設間における細菌の検出率, 汚染度の差を検討したところ, 2 施設間でのみ細菌の検出率に有意差が認められた (表22) が, 例数自体が非常に少ないため, 統計的な意義は少ないと考えられる。性差については, SCL ケース, HCL ケースとも, 性別による細菌検出率, 検出種数, 汚染度に有意な違いはなかった (表23)。SCL の使用期間には 2 週間交換, 1 カ月交換, 3 カ月交換の 3 種があったが, 表 8 のとおり 1 カ月交換, 3 カ月交換の使用者は少なかったため, 使用期間の違いに対する検討は行わなかった。

検出された細菌の菌種と CL 種別の関連を図 1 に示す。SCL ケースにおいても HCL ケースにおいてもグラム陰性桿菌がグラム陽性球菌より多く検出されたが, とくに HCL ケースの方が SCL ケースよりも有意に高率にグラム陰性桿菌が分離された。一方, グラム陽性球菌については逆に SCL ケースの方が HCL ケースよりも有意に高率に分離された。検出された菌種を表24に示す。SCL ケースからは coagulase-negative *Staphylococcus* (以下 CNS), HCL ケー

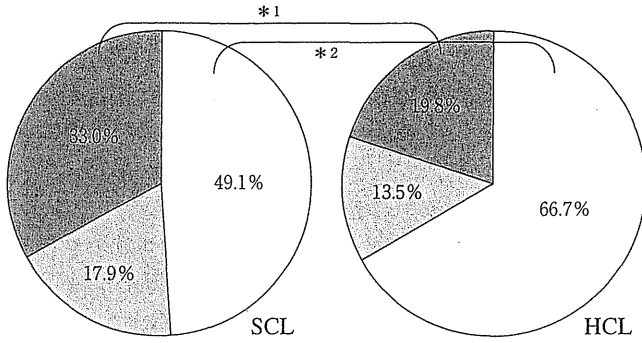


図1 細菌検出例における検出菌種とCL種別の関連  
 □: グラム陰性桿菌, □: グラム陽性桿菌, □: グラム陽性球菌  
 SCL: ソフトコンタクトレンズ, HCL: ハードコンタクトレンズ  
 \*1:  $\chi^2$ 検定にて有意差あり (p=0.011)  
 \*2:  $\chi^2$ 検定にて有意差あり (p=0.034)

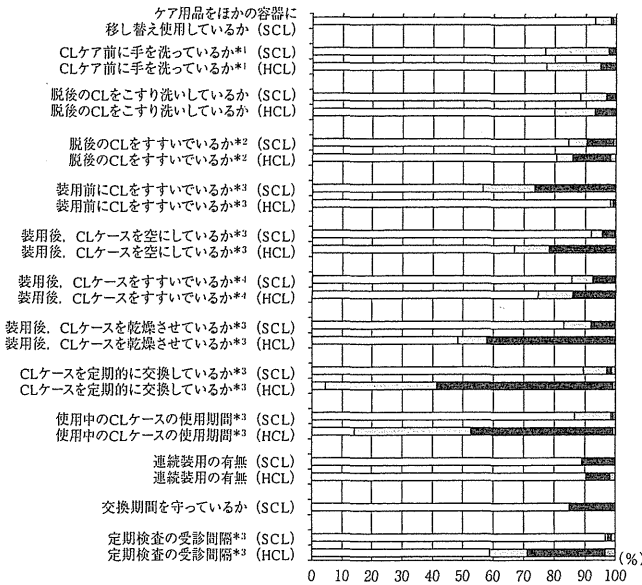


図2 使用者へのアンケートのコンプライアンス関連項目集計結果  
 使用者のコンプライアンス  
 □: 良, □: 可, □: 不可, □: 無回答  
 \*1: Wilcoxon 順位和検定, p=0.001でSCL, HCL間に有意差あり  
 \*2: Wilcoxon 順位和検定, p=0.013でSCL, HCL間に有意差あり  
 \*3: Wilcoxon 順位和検定, p=0.000でSCL, HCL間に有意差あり  
 \*4: Wilcoxon 順位和検定, p=0.019でSCL, HCL間に有意差あり

スからは *Serratia marcescens* (以下 *S. marcescens*) の検出が目立った。

表3のアンケート集計結果の、コンプライアンスにかかわる部分の概略を図2に示す。HCL使用者の方がSCL使用者よりコンプライアンスに劣る項目が多く、「定期検査の受診間隔」、「装用後のCLケースを空にする」、「装用後のCLケースを乾燥させる」、「CLケースを定期的に交換する」、「現用CLケースの使用期間が短い」、「装用後のCLケースをすすぐ」の項目で有意な差が認められた。逆に「装用前のCLのすすぎ」に関してはHCLの方が良好であった。細菌検出率、汚染度と有意の関連があったのは

表24 SCL ケース, HCL ケースからの検出菌種と例数

SCL			HCL		
菌種	例数	汚染度 (平均値)	菌種	例数	汚染度 (平均値)
CNS	27	1.2	<i>S. marcescens</i>	17	3.1
<i>Bacillus subtilis</i>	17	1.2	CNS	13	1.5
<i>Micrococcus</i>	8	1.4	<i>A. xylooxidans</i>	10	3.1
GNF-GNR	7	2.3	<i>Bacillus subtilis</i>	10	1.7
<i>Acinetobacter</i> sp.	7	2.6	<i>Chryseobacterium</i> sp.	6	3.2
<i>Steno. maltophilia</i>	7	2.6	<i>Micrococcus</i>	6	2.5
<i>P. putida</i>	5	2.2	GNF-GNR	5	2.2
<i>S. paucimobilis</i>	5	1.2	<i>Alcaligenes denitrificans</i>	4	2.8
<i>S. marcescens</i>	3	2.3	<i>E. cloacae</i>	3	3.0
<i>Chryseobacterium</i> sp.	3	2.3	<i>K. pneumoniae</i>	3	3.7
<i>A. xylooxidans</i>	2	3.0	<i>P. fluorescens</i>	3	2.3
<i>Moraxella</i> sp.	2	1.0	<i>P. putida</i>	3	2.7
<i>P. vesicularis</i>	2	3.0	<i>Steno. maltophilia</i>	3	2.3
<i>C. acidovorans</i>	2	2.5	<i>K. oxytoca</i>	2	2.5
<i>E. cloacae</i>	1	1.0	<i>Acinetobacter</i> sp.	2	4.0
<i>K. oxytoca</i>	1	3.0	<i>C. acidovorans</i>	2	3.5
<i>P. fluorescens</i>	1	2.0	<i>Chryseo. meningosepticum</i>	2	3.0
<i>P. stutzeri</i>	1	4.0	<i>E. aerogenes</i>	2	2.0
<i>Alcaligenes denitrificans</i>	1	4.0	<i>Bacillus cereus</i>	2	2.0
<i>Chryseo. meningosepticum</i>	1	3.0	<i>Flavimonas oryzzihabitans</i>	1	3.0
<i>E. aerogenes</i>	1	4.0	<i>Ochrobacterium anthropi</i>	1	3.0
<i>Bacillus cereus</i>	1	1.0	<i>Oligella urethralis</i>	1	4.0
			<i>P. aeruginosa</i>	1	2.0
			<i>P. vesicularis</i>	1	2.0
			<i>S. paucimobilis</i>	1	2.0
			<i>B. cepacia</i>	1	2.0
			<i>Bacillus</i> sp.	1	2.0

GNF-GNR: ブドウ糖非発酵グラム陰性桿菌,  
 Steno.: *Stenotrophomonas*, P.: *Pseudomonas*, S.: *Serratia*,  
 A.: *Achromobacter*, C.: *Comamonas*, E.: *Escherichia*, K.: *Klebsiella*,  
 Chryseo.: *Chryseobacterium*

次の項目であった。「CLケア前の手洗い」については、HCL使用者においてコンプライアンス良好な方が細菌検出率が低かった。「脱後CLのすすぎ」については、SCL使用者においてコンプライアンス良好な方が汚染度が低かった。

考 察

今回のアンケートの回収率は87.8%と良好であった。謝礼は提供しておらず、帰宅後、使用中のCLケースをそのまま返送用封筒に入れるよう指示しているため、結果は実状を反映しているものと考えられる。CLケースには左右の区画が共通しているものと個別のものがある。左右個別の場合は、左右両区画のフタを開閉する手順が必要であり、後から操作する区画が汚染されやすい可能性も考えられたが、今回の結果で左右間、あるいは共通区画と個別区画間で細菌、真菌検出率に差がないことが示された(表10, 11)。今回のような調査では、左右共通区画のケースであれば共通区画を、左右区画が個別のケースであれば左右いずれかの区画を取り上げて、1症例1区画のデータを対象とすると統計処理が容易であり、妥当でもと考えられた。

Szczotka-Flynn ら<sup>5)</sup>は1986~2008年の間の11件のCLケース調査結果をまとめているが、その過半数の報告において70%以上の細菌検出率が観察されている。最近の我が国のSCL使用者を対象とした国民生活センターの調査(国民生活センター:ソフトコンタクトレンズ用消毒剤のアカントアメーバに対する消毒性能。報道発表資料:2009年12月16日。2011年6月現在、[http://www.kokusen.go.jp/pdf/n-20091216\\_1.pdf](http://www.kokusen.go.jp/pdf/n-20091216_1.pdf)からダウンロード可能)でも60%の細菌検出率が示されている。これに対して、今回の調査における細菌または真菌の検出率は、SCLケースにおいて28.7%、成績の悪かったHCLケースでも50.9%(表12)と低率であった。上記の国民生活センターの調査結果では385例中2例からアカントアメーバが培養検出されたが、今回の351例からは培養検出はなく、real-time PCR法によるアカントアメーバDNA検出も低率、低値であった。細菌汚染例が少ない対象においては、アカントアメーバ検出例も少ないことが示唆された。逆に、今回の真菌検出例では細菌も高率に検出されており(表12)、細菌で汚染されたCLケースに真菌汚染も生じやすいことが示された。真菌、アカントアメーバとも環境中の有機物や細菌を餌として活動するから、細菌が検出されるような不潔なCLケースで検出されやすいのは当然といえる。

CL装用者のコンプライアンスは、角膜感染症例<sup>1-4)</sup>はもちろん、一般SCL装用者(国民生活センター:ソフトコンタクトレンズ用消毒剤のアカントアメーバに対する消毒性能。報道発表資料:2009年12月16日。2011年6月現在、[http://www.kokusen.go.jp/pdf/n-20091216\\_1.pdf](http://www.kokusen.go.jp/pdf/n-20091216_1.pdf)からダウンロード可能)においてさえ、CLケア前の手洗いが不良の者が17.4%、レンズケースの交換頻度が3カ月をこえる者が66.8%、定期検査受診頻度が6カ月をこえる者が34.8%と不良である。これに対し、今回の対象では図2に示すように、上記の項目についてそれぞれ2.5%、10.5%、3.4%とコンプライアンス不良例が少なく、ほかの項目についてもおおむね良好であった。これは処方施設の適切な指導によって、使用者の理解とよいコンプライアンスが得られた結果と考えられる。

ただし、HCL装用者のコンプライアンスはSCL使用者より悪く、HCLケースの方がSCLケースより細菌検出率、細菌または真菌の検出率、汚染度とも高かったのは、CLおよびCLケースケアの不良が原因と推測される。とくにCL装用後のCLケースの乾燥、CLケースの定期的交換、定期検査間隔について成績が悪かった。HCL装用者の定期検査時には、これらの点に注意して問診、指導を行う必要がある。逆に装用前のCLのすすぎはHCL装用の方が励行できていたが、これはHCL保存液はすすぎないと装用できないためと考えられる。

今回の調査ではHCLケースの方が明らかに細菌、真菌

の検出率が高く(表12)、使用者のコンプライアンスも悪かった(図2)が、角膜感染症調査<sup>1-4)</sup>ではHCLの方がSCLより安全性が高いという、一見矛盾した結果が示されている。親水性のSCLの方がケース内の病原菌を眼表面に取り込みやすいとも考えられるが、Millerら<sup>6)</sup>はSCLよりHCL表面の方が緑膿菌付着は多いと報告しており、HCL使用者に角膜感染症が少ないのはこすり洗いを励行するから、あるいはSCL使用者が正しい消毒操作を行わないからではないかと考察している。しかし、CL下の涙液交換がHCLの安全性に大きく寄与している可能性もある。すなわちHCL下の涙液は、瞬目ごとに5.7%前後入れ替わる<sup>7)</sup>のに対し、SCLの場合は0.7%前後にすぎないと報告<sup>8)</sup>されており、仮にCLに病原菌が付着していても、HCLの場合は瞬目と涙液交換によって、速やかに眼表面から流し去られてしまうと考えられる。SCL下の涙液厚がHCL下のそれよりもはるかに薄い<sup>9)</sup>ことを考えると、HCL装用時のCL、眼表面は、SCL装用時よりも涙液による洗浄がずっと効果的に行われていると推測できる。

SCL装用時には、涙液交換の減少とともに、バンデージ効果によって最表層角膜上皮の剝脱が抑制されている可能性がある。SCLは角膜輪部も覆うため、酸素透過性が不足していれば角膜上皮幹細胞とtransient amplifying cellによる角膜上皮細胞の分裂も抑制される<sup>10)</sup>。これらの要素がSCL装用時の角膜上皮のターンオーバーを阻害し、病原菌の侵入を容易にしている可能性が考えられる。実際、無水晶体眼用SCLの連続装用で最表層上皮細胞の平均露出面積が拡大する<sup>11, 12)</sup>、HCL装用者では非装用者と差がない<sup>13, 14)</sup>、SCLの連続装用によって拡大した面積が、ガス透過性HCLの連続装用に替えると正常化する<sup>15)</sup>、などの報告がある。このような結果には、低酸素負荷による角膜上皮のターンオーバー低下と、その結果としての角膜上皮細胞面積の拡大がかかわっていると考えられるが、現代の酸素透過性良好なCLの終日装用については、角膜上皮細胞面積の拡大は認められないとする報告<sup>16)</sup>がある。また、面積の拡大はあっても、むしろHCLの方が大きいとする報告<sup>17)</sup>や、剝脱上皮数から推定されるターンオーバーの低下は、HCL、SCL双方に同等に認められるという報告<sup>18)</sup>もある。少なくとも現代のSCLの終日装用においては、角膜上皮のターンオーバー抑制や剝脱阻害がHCLより多いとはいえないようである。そうであれば、CL関連角膜感染症におけるHCLの安全性は、豊富な涙液交換によるCL下の異物、角膜上皮剝脱物、分泌物などの除去によるのが妥当かもしれない。また、HCL装用前に必ずすすぎを行うことが眼表面への病原菌持ち込みを抑制している可能性もある。

性差については従来から男性がCL関連角膜感染症の危険因子といわれており、我が国の調査<sup>2, 3)</sup>でも男性に有意

に角膜感染症が多いことが報告されているが、今回の調査ではCLケース汚染に性別による差は認められなかった。

SCL消毒剤の消毒力には製品による差があると報告<sup>19, 20)</sup>されているが、今回の調査結果では過酸化水素とMPS間、MPSの主成分間で差は認められなかった。適切に使用されていれば、どのSCL消毒剤も同様に有効であると考えられる。SCLの素材については、従来のSCL素材よりもシリコンハイドロゲル素材の方が表面へのアカントアメーバ付着が多いという報告<sup>21)</sup>があるが、今回の調査では、細菌、真菌については従来素材とシリコンハイドロゲル間で差は認められなかった。装用中のSCLについてSCL表面の細菌および結膜囊細菌叢を調査した報告<sup>22)</sup>でも、従来のSCL素材とシリコンハイドロゲル素材間に差は認められておらず、細菌、真菌については素材間でCLへの付着しやすさに差がないか、差があってもCLケース内の汚染には直接関係しないことが考えられる。

CLケースの乾燥状態を、乾燥している、液滴が認められる、液体が入っているに三分類した場合、液滴が認められるCLケースで最も細菌検出率が高かった点が注目される。液滴だけ残っている場合、消毒力は発揮されず、しかし乾燥もしないため、細菌が生残しやすいのかもしれない。CL装用後のCLケースをすすぎ、乾燥させる指導は一般的に行われているが、確実に乾燥できない場合はかえって汚染を招く可能性がある。かといって、消毒液を満たしたまま放置すると、液を入れ替えずに注ぎ足し使用するおそれもある。装用後のCLケースはいったん空にし、すすぎを行った上で確実に乾燥させる工夫をするべきだろう。洗面所は湿気やすいため、ほかの風通しのよい部屋に移動して乾燥させるのも一つの方法ではあるが、日常継続して行うのは難しい。洗面所であれば、水のたまりにくい高いところに置く。ティッシュペーパーで水気を取ってから乾燥させるといった対策が可能であろう。ティッシュペーパー自体も無菌とは言い難いが、確実に乾燥させれば汚染の可能性は少ないと考えられる。CLケースに残っているかもしれない病原菌を洗い流す意味で、CLケースにCLを保存する前に、使用している消毒液でCLケースをいったんすすぐのも、有効かもしれない。

菌種については、表24のようにSCLケースにはCNSに代表されるグラム陽性球菌の検出例が多く、HCLケースに*S. marcescens*に代表されるグラム陰性桿菌の検出例が多い結果が得られた。HCLケースはケアが不十分のため、環境菌が侵入し、棲息しやすい状態になっていると考えられる。消毒力をもつHCL保存液やHCL消毒剤を開発する際には、このようなCL種別による菌種の違いを考慮する必要があるだろう。また、CNSや*Micrococcus*のような常在菌は例数は多くとも汚染度が低く、*S. marcescens*や*Achromobacter xylosoxidans*, *Chryseobacterium*などの環境

菌は比較的汚染度が高い傾向がみられたのは興味深い。いずれにせよ、今回調査対象としたCLケースは、使用者から調査施設に郵送された上でいったん冷蔵保存され、更に細菌検査施設に送られたものであるから、今回の結果が実際に使用中のCLケース内の状況を完全には反映していない可能性も考える必要がある。

なお、今回の調査結果では、HCL装用者において「CLケア前の手洗い」、SCL装用者において「脱後CLのすすぎ」の良否が細菌検出率、汚染度と有意に関連していたが、これらはCLケア上、最も重要な要素というわけではなく、図2に示したようにコンプライアンスが良好な症例において、なお残った要素と考えるべきであろう。

## 文 献

- 1) 福田昌彦：コンタクトレンズ関連角膜感染症の実態と疫学. 日本眼科 80 : 693-698, 2009.
- 2) 宇野敏彦, 福田昌彦, 大橋裕一, 下村嘉一他：重症コンタクトレンズ関連角膜感染症全国調査. 日眼会誌 115 : 107-115, 2011.
- 3) 稲葉昌丸, 井上幸次, 植田喜一, 宇野敏彦他：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. 日コレ誌 52 : 25-30, 2010.
- 4) 福田昌彦：コンタクトレンズ関連角膜感染症. あたらしい眼科 28 : 337-342, 2011.
- 5) Szczotka-Flynn LB, Pearlman E & Ghannoum M : Microbial contamination of contact lenses, lens care solutions, and their accessories : A literature review. Eye & Contact Lens 36 : 116-129, 2010.
- 6) Miller MJ, Wilson LA & Ahearn DG : Adherence of *Pseudomonas aeruginosa* to rigid gas-permeable contact lenses. Arch Ophthalmol 109 : 1447-1448, 1991.
- 7) Dillehay SM & Hill RM : Measures of tear exchange under rigid contact lenses : Part II. Individual systems and a population model. ICLC 18 : 71-73, 1991.
- 8) Paugh JR, Stapleton F, Keay L & Ho A : Tear exchange under hydrogel contact lenses : Methodological considerations. Invest Ophthalmol Vis Sci 42 : 2813-2820, 2001.
- 9) Nichols JJ & King-Smith PE : Thickness of the pre- and post-contact lens tear film measured in vivo by interferometry. Invest Ophthalmol Vis Sci 44 : 68-77, 2003.
- 10) 浜野 光, 荒井 忠, 小谷摂子, 杉浦栄一他：コンタクトレンズと前眼部生理. 日コレ誌 27 : 145-152, 1985.
- 11) 山田昌和, 坪田一男：高含水率ソフトコンタクトレンズ連続装用の角膜上皮への影響—スベキュラーマイクロスコープによる検討—. あたらしい眼科 6 : 1699-1704, 1989.
- 12) 細谷比左志, 佳波真弓, 吉田弘俊, 大橋裕一他：白内障術後眼のコンタクトレンズ連続装用による角膜上皮の変化—上皮スベキュラー・マイクロスコープによる観察—. 日コレ誌 32 : 108-112, 1990.
- 13) 宮下浩平, 太田誠一郎, 千葉桂三：コンタクトレンズ装用が角膜上皮に与える影響について. 日コレ誌 31 : 220-225, 1989.
- 14) 黒川真理, 大谷園子, 行定節子, 金井 淳他：コンタクトレンズ装用による角膜上皮細胞への影響—内皮細胞プレブとの関連—. 日コレ誌 39 : 148-152, 1997.
- 15) 山田昌和, 坪田一男：コンタクトレンズと角膜上皮. あたらしい眼科 8 : 1691-1697, 1991.
- 16) Mathers WD, Sachdev MS, Petroll M & Lemp MA : Morphologic effects of contact lens wear on the corneal surface. CLAO J 18 : 49-52, 1992.