

201235010A

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 24 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 大橋 裕一

平成 25(2013)年 3 月

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	愛媛大学医学部付属病院	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の開発……………4

大橋裕一

2. アカントアメーバ角膜炎の全国定点調査……………7

下村 嘉一

3. アカントアメーバに対する擦り洗い試験(臨床分離株での評価)……………10

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……………19

IV. 研究成果の刊行物・別刷 ……………21

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。

3年目の本年は、光線力学的療法（PDT）の生体への影響の検討、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。

平成 22, 23 年度において抗アメーバ効果評価法の迅速化を報告し光線力学的療法（PDT）の抗アカントアメーバ効果について検討した。本年度には、臨床応用を目指して、光線力学的療法（PDT）の生体への影響を検討する。また、

擦り洗いやすすぎを併用することで、より確実なレンズケアが行われることを報告してきたが、本年度では臨床分離株を用いた検討を行う。

その一方で、発生の基盤となるレンズケース、消毒剤ボトルについても一定の割合で汚染されていることを報告してきたが、本年度ではさらに使用状況と消毒剤ボトル汚染についての検討を行う。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、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、昨年度には主要施設においてアカン

トアメーバ発生状況も調査し、減少傾向であることを報告した、本年度ではさらに全国調査を行う。

B. 研究方法

1. 光線力学療法をもちいたアカントアメーバ角膜炎治療の試み

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、前年度では、メチレンブルーを用いた光線力学療法（MB-PDT）が抗アカントアメーバ効果を有することを確認した。本年度は、臨床応用に向けてMB-PDTの生体への影響についてウサギ角膜を用いて検討した。

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、すすぎ、浸漬効果の検討

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し、「こすり+すすぎ」洗いの効果を示してきたが、本年度では、臨床株に対する有効性について検討するとともに浸漬効果についても検討した。

3. アカントアメーバ角膜炎発症動向の全国定点調査

前年度にはアカントアメーバ角膜炎発生状況につき、全国主要15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を行ったが、本年度では全国48大学病院を対象に調査を行った。

4. SCL消毒剤ボトル汚染状況の定点診療所調査

前年度に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し、SCL消毒ボトルにも汚染が認められることを示した。本年度にはCLケアとの関連を探る目的に使用期間とSCL消毒剤容器汚染について検討した。

C. 研究結果

1. 光線力学療法をもちいたアカントアメーバ角膜炎治療の試み

MB-PDTにより実質浅層の角膜実質細胞の消失が認められるものの、角膜上皮創傷治癒障害や角膜内皮細胞障害は認められず、角膜組織への影響が限定的であると推測された。MB-PDT療法は、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。

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、すすぎ、浸漬効果の検討

アカントアメーバに対する擦り洗い試験：ケア方法としては臨床株においても「こすり」洗いよりも「こすり+すすぎ」のアカントアメーバ除去効果が最も高かった。また、「こすり+すすぎ+浸漬」によりアカントアメーバ除去の

効果が高くなることが認められた。

3. アカントアメーバ角膜炎発症動向の全国定点調査

2007年から2011年までのアカントアメーバ角膜炎発症者数は、2008年～2009年をピークに以後明らかな減少傾向を示した。その傾向の地域差は認められなかった。

4. SCL 消毒剤ボトル汚染状況の定点診療所調査

SCL 消毒剤の使用開始後経過日数と、SCL 消毒剤ノズル部の細菌汚染発生率には相関が認められなかったものの、SCL 消毒剤のノズル部は高率の細菌汚染が認められた。SCL の清潔なケアと同時に、SCL 消毒剤自体も清潔に取り扱い、ノズル部への不用意な接触などがないように指導する必要があることが浮かび上がってきた。

D. 考察

光線力学療法が新たなアカントアメーバ角膜炎治療法として有効である可能性が示された。市販 SCL 消毒剤でも特にノズル部の汚染が顕著であることが明らかとなり、SCL 消毒剤自体も清潔に取り扱う必要が示された。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めされ、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、啓蒙活動の有効性が示されたと推測される。

E. 結論

アカントアメーバ角膜炎の制御に向けて、特に、光線力学療法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

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に対する光線力学的療法の開発

研究分担者 大橋裕一

研究要旨：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、角膜掻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、光線力学的療法（PDT）が感染症領域において注目されており、前年度には、*in vitro*におけるメチレンブルーを用いた光線力学療法（MB-PDT）の抗アカントアメーバ効果を確認した。本年度は、臨床応用に向けてMB-PDTの生体への影響についてウサギ角膜を用いて検討した。結果として、光照射1日目に炎症所見を認めたものの、上皮創傷治癒や内皮細胞への影響は認めず、臨床応用の可能性があることが示唆された。

A. 研究目的

アカントアメーバ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薬、抗真菌薬の使用が標準的とされる。しかしながらたとえこれらの治療を行ったとしても重症化し、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。前年度までに、新規の治療法としてメチレンブルー（MB）を用いた光線力学療法（PDT）を評価し、*in vitro*において抗アカントアメーバ効果があることを確認した。本年度は、光線力学療法の生体への影響についてウサギ角膜を用いて評

価した。

B. 研究方法

白色家兎の角膜上皮を剥離した後に0.5mMのMB水溶液を5分間隔で6回点眼した。その後、光照射装置を用いて660nmの光を10分間照射した（MB⁺PDT⁺群）。対照として、MB⁻PDT⁻、MB⁻PDT⁺、MB⁺PDT⁻群とした。処置1週間後の角膜上皮創傷治癒、実質細胞、内皮細胞について、細隙灯顕微鏡および組織学的に検討した。

（倫理面への配慮）

本研究は動物実験であるため、倫理面の配慮の

必要ない。また、本試験は愛媛大学医学研究科における動物実験規程等に適合し、委員会の承認が得られている。

C. 研究結果

MB+PDT+においてのみ、光照射後、角膜混濁、虹彩充血が観察された（図1）が、1週間で角膜も透明性が回復し、炎症所見も消失した。また、各群間で上皮創傷治癒に有意差は認められなかった（図2）。処置直後の角膜内皮細胞は正常であった。

処置後1週間における組織学的検討でも大きな障害はなく、MB+PDT+群においてのみ、実質浅層の角膜実質細胞の消失が認められた。（図3）

図1 PDT処置後の前眼部写真

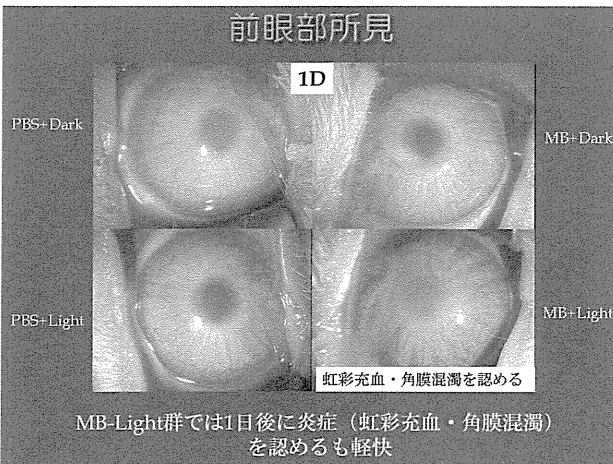


図2 角膜上皮創傷治癒

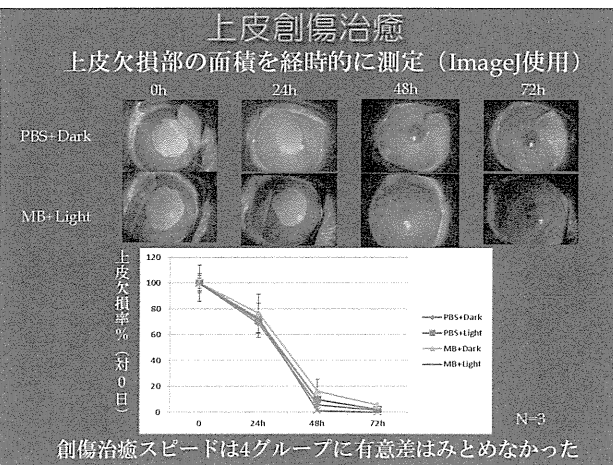
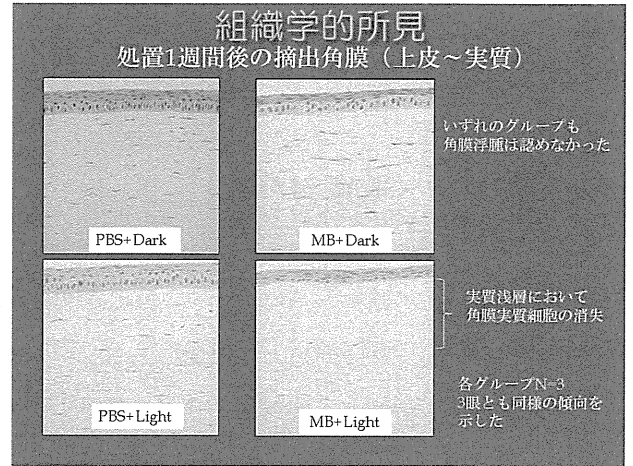


図3 PDT処置後1週間の角膜組織学的所見



D. 考察

PDT処置群（MB+PDT+群）にのみ、処置1日後角膜や虹彩への炎症所見を認めた。このことは過去にPDTによりマウス皮膚炎症が惹起されるという過去の報告（Tanaka M, et al. PLoS One. 2012;7(6):e39823.）と同様であった。しかしながら、その炎症所見は1週間で消失していた。1週間後の組織学的所見では、PDT処置群において実質浅層の角膜実質細胞が消失していた。このことはPDTによって細胞が死滅し、その後の炎症反応が一過性に生じた可能性が考えられた。また、MBは実質を染色するものの、正常な上皮細胞や内皮細胞は染色されないため、上皮創傷治癒障害や角膜内皮不全などの障害は引き起こされない可能性が高い。このことにより、PDT治療の角膜組織への影響は許容範囲であり、アカントアメーバ角膜炎の治療に応用できる可能性が考えられる。今後は、動物感染モデルを作成し、有効性について検討する予定である。

E. 結論

MB-PDT療法は角膜に対して重篤な影響を与えることはなく、臨床応用への可能性が示唆された。

F. 研究発表（平成 24 年度）

論文発表

1. Mito T, Suzuki T, Kobayashi T, Zheng X, Hayashi Y, Shiraishi A, Ohashi Y. Effect of photodynamic therapy with methylene blue on Acanthamoeba in vitro. Invest Ophthalmol Vis Sci. 53(10):6305-13, 2012.
2. Uno T, Ohashi Y, Nomachi M, Imayasu M. Effects of multipurpose contact lens care solutions on the adhesion of Acanthamoeba to silicone hydrogel contact lenses. Cornea. 31(10):1170-5, 2012.
3. Kobayashi T, Mito T, Watanabe N, Suzuki T, Shiraishi A, Ohashi Y. Use of 5-cyano-2,3-ditolyl-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, Imayasu M. Antimicrobial efficacy tests of multipurpose contact lens care solutions simulating poor contact lens hygiene behaviors. Eye Contact Lens. 38(6):388-93, 2012.
5. Ohta K, Shimamura I, Shiraishi A, Ohashi Y. Confocal microscopic observations of stromal keratocytes in soft and rigid contact lens wearers. Cornea. 31(1):66-73, 2012.

学会発表

1. 小林 剛, 渡部成美, 白石 敦, 宇野敏彦, 大橋裕一 ソフトコンタクトレンズ用洗浄液(ミラフロー®)の抗アcantアメーバ消毒効果の検討第 49 回日本眼感染症学会 フォーサム 2012 横浜 7/14-16, 2012. (京都)
2. 鳥山浩二, 鈴木 崇, 鄭 暁東, 原 祐子, 山口昌彦, 白石 敦, 宇野敏彦, 大橋裕一 初診時に角膜内皮炎と診断されたアcantアメーバ角膜炎の 2 例第 49 回日本眼感染症学会 フォーサム 2012 横浜 7/14-16, 2012. (京都)
3. 鳥山浩二, 鈴木 崇, 鄭 暁東, 原 祐子, 白石 敦, 宇野敏彦, 大橋裕一 最近 5 年間のアcantアメーバ角膜炎発症者数の全国調査 第 66 回日本臨床眼科学会 10/25-28, 2012. (京都)

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、全国の大学附属病院を対象に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

2007年1月から2011年12月までに、臨床所見または微生物学的検査により、アカントアメーバ角膜炎と診断された症例に関して、アンケートによる調査協力を全国の大学付属病院に依頼し、協力が得られた48施設の回答をもとに、近年における本邦のアカントアメーバ角膜炎発症者数の推移につき検討を行った。調査事項は、より正確な動向を把握するため可能な限り多くの施設から参加協力が得られることを目的に、性別、年齢、発症年、使用CLの種類のみと、簡便なアンケート内容とした。

(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

1. 対象症例数および性別・年齢

対象となった症例は 524 例で、男性が 255 例、女性が 269 例であった。平均年齢は 28.7 ± 11.1 歳 (10~97 歳) で、男女別では男性 29.1 歳、女性 28.3 歳と平均年齢に差は認めなかったものの、男性が 20 代~30 代で発症者数が最も多かったのに対し、女性のピークは 10 代~20 代とより若年の発症者が多い傾向にあった。

2. 使用 CL の種類

発症時に使用していた CL の種類を表 1 に示す。FRSCL が 323 例 (61.6%) と過半数を占めていた。次いで、1 日使い捨て SCL (DDSCL) が 61 例 (11.6%) と多く、従来型 SCL が 57 例 (10.9%) と続いた。CL 装用歴のない症例は 9 例 (1.7%) であった。

3. 発症者数の推移

2007 年から 2011 年までの AK 発症者数は、それぞれ 105 例、152 例、155 例、65 例、47 例と、2008 年、2009 年をピークに以後明らかな減少傾向をした。その傾向の地域差は認められなかった。

さらに消毒薬による日常のケアを要する SCL、従来型 SCL および FRSCL 装用者の、発症者全体に占める割合につき検討した。両群の占める割合は、2008 年の 79.6% をピークに以後減少傾向であり、2011 年には 59.6% まで減少していた。

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、2009 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。

E. 結論

アcantアメーバ角膜炎は 2010 年以降減少傾向にある。

F. 研究発表 (平成 23 年度)

論文発表

- 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* 119:1111-1119, 2012
- 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 最近の傾向から 日本コンタクトレンズ学会誌 53 巻 3 号 Page231-232

学会発表

- 月山 純子, 宮本 裕子, 加藤 光男, 市島 英司, 坂田 博行 下村 嘉一. ソフトコンタクトレンズ装用者におけるレンズ試用期間に関するコンプライアンス. 第 55 回日本コ

ンタクトレンズ学会（横浜）7/15-16, 2012.

2. 植田喜一、大橋裕一、下村嘉一、CL 関連角膜炎感染症全国調査委員会 コンタクトレンズ関連角膜炎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.
3. 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
4. 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

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)
総括研究報告書

アcantアメーバに対する擦り洗い試験(臨床分離株での評価)

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cant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cant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cant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cantアメーバを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」の3種のケア方法によるアcantアメーバ除去効果を比較検討した。なお、平成23年度の本研究ではATCC株のみで評価したが、今回はアメーバ株による相違を確認するため、ATCC株2種とAK患者からの臨床分離株2種を用いて評価した。

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cant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、ATCC株2種とAK患者からの臨床分離株2種を用いて評価する。

B. 研究方法

① アcantアメーバ栄養体

実験には2種類の *Acanthamoebacastellanii* (ATCC50370, ATCC 50514) および2種類の臨床分離株 (EC1 (愛媛大学にて分離), TC2 (鳥取大学にて分離)) を用いた。栄養体の培養はPYG培地 (ATCC medium

712) を用いて30℃で行った。なお、ATCC 50370株については平成23年度の本研究で報告済であるが、今回は再試験も兼ね、実験系を少し変更して実施した。

② アcant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 (PBSに一晩浸漬したもの) を用いた。市販MPSとしてエピカコールド、レニューフレッシュ、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cant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）」のいずれかの処理を行い、レンズ表面に残存したアcant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cantアメーバの18S-rDNAを増幅し、別途作製した標準曲線より、アcantアメーバ数を計数した。最終的に「すすぎ」、「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ATCC 50370株で4回、その他の株で2回繰り返した。なお、「こすり」のみの処理では安定した結果が得られなかったため、「すすぎ」と組み合わせ「こすり＋すすぎ」処理とした。

C. 研究結果

① アcantアメーバ(ATCC 50370)に対する擦り洗い試験

ATCC 50370株では「すすぎ」による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、コンプリーダブルモイストでそれぞれ0.65、0.08、0.72、0.37 LOGであった。「こすり＋すすぎ」によるアメーバ除去効果はPBSで1.59 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、コンプリーダブルモイストでそれぞれ1.69、1.43、1.71、1.15 LOGであった。「浸漬」によるアcant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。「こすり＋すすぎ」＋「浸漬」によるアcant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、コンプリーダブルモイストでそれぞれ2.36、1.71、2.20、1.64 LOGであった。

② アcantアメーバ(ATCC 50514株、EC1株、TC2株)に対する擦り洗い試験

ATCC 50514株では「すすぎ」によるアメーバ除去効果はPBSで0.82 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、コンプリーダブルモイストでそれぞれ0.87、0.61、0.92、0.64 LOGであった。「こすり＋すすぎ」によるアメーバ除去効果はPBSで2.47 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、コンプリーダブルモイストでそれぞれ2.66、2.25、2.36、2.31 LOGであった。

EC1株では「すすぎ」によるアメーバ除去効果はPBSで0.61 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、コンプリーダブルモイストでそれぞれ1.04、0.52、0.99、0.88 LOGであった。「こすり＋すすぎ」によるアメーバ除去効果はPBSで1.79 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、コンプリーダブルモイストでそれぞれ1.66、1.70、1.67、1.18 LOGであった。

TC2株では「すすぎ」によるアメーバ除去効果はPBSで0.69 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、コンプリーダブルモイストでそれぞれ0.70、0.03、0.32、0.43 LOGであった。「こすり＋すすぎ」によるアメーバ除去効果はPBSで2.52 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 2.20、2.55、2.32、2.28 LOG であった。

D. 考察

ATCC 50370 株については平成 23 年度研究結果の再現性が得られた。すなわち、「すすぎ」洗浄によるアメーバ除去効果はケア用品ボトルからの 5 秒間の液体噴出量に依存し (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はそれぞれ 3.0、5.1、2.6、3.5、2.8mL)、液体噴出量の低いレニューフレッシュで 0.08LOG と極めて低い除去効果を示した。これはレニューフレッシュのボトル材質が他社の PE より硬い PET を使用していることに起因すると考えられる。

「こすり+すすぎ」洗浄では各種 MPS と対照の PBS で大きな差はなかった。MPS には界面活性剤成分が含まれるため、PBS より有意に高い「こすり」洗浄効果が期待されたが、今回の実験系では検証できなかった。しかし「浸漬」では、PBS のアメーバ除去効果がすべての MPS より 1 ケタ低く、MPS に含まれる界面活性剤および消毒剤成分による除去効果が確認された。

「こすり+すすぎ」+「浸漬」のアメーバ除去効果は 4 種類の MPS で 1.64~2.36 LOG であり、PBS の 1.67 LOG と有意な差がなかった。しかし、今回採用したリアルタイム PCR 法は生死に関係なく残存アメーバ数をカウントしており、実際に生残していたアメーバ数は MPS ではもっと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である。

アメーバ株の比較では、ATCC 50514 株、EC1 株、TC2 株のすべてでレニューフレッシュの「すすぎ」除去効果が低いなど全体的な傾向に差はなかったが、EC1 株では ATCC 50370 株と同様に「こすり+すすぎ」で 2 LOG の除去効果に達するものがなかった。これは EC1 株と ATCC 50370 株のコンタクトレンズ表面への強い接着性に起因している可能性があり、今後の検討が必要である。

今回の実験では 1×10^4 個のアカントアメーバを接種したが、現実的にはより少ない接種数で検討するのが理想と考えられる。 1×10^3 個を接種したときの残存アメーバ数も検討したが、残存アメーバ数が少なく、リアルタイム PCR (SYBR Green 法) で正確な定量ができなかった。今後は感度と特異性の高いリアルタイム PCR (TaqMan-PCR 法) でのアメーバ数の定量が課題である。

E. 結論

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 multipurpose contact lens care solutions on the adhesion of Acanthamoeba to silicone hydrogel contact lenses. *Cornea*. 31(10):1170-5, 2012.

2. Kobayashi T, Mito T, Watanabe N, Suzuki T, Shiraishi A, Ohashi Y. Use of 5-cyano-2,3-ditolyl-tetrazoliumchlorid estaining as an indicator of biocidal activity in a rapid assay for anti-acanthamoeba agents. *J Clin Microbiol*. 2012 May;50(5):1606-12.

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、2009年にCL関連角膜炎全国調査委員会が行った報告において、不良なCLケア、装用方法がアcantアメーバ角膜炎などの危険因子として指摘されている。平成23年度の当分担研究においてもCLケースの細菌汚染が多数に認められることが示され、平成24年度の当分担研究では使用中のSCL消毒剤容器自体から高率に細菌が検出される事が明らかになった。アcantアメーバ感染の前提となる細菌汚染の原因と実態を知るため、一本のSCL消毒剤の使用期間とSCL消毒剤容器汚染の関連、およびSCL消毒剤の平均使用期間を、全国の眼科開業医を受診したSCLユーザーを対象として調査した。

A. 研究目的

平成24年度の当分担研究において、ソフトコンタクトレンズ(SCL)装用者が使用しているSCL消毒剤の内容液、およびノズル(注出口)に高率で細菌汚染が認められることが判明した。この汚染は使用開始後の時間経過に伴って悪化するのか、もしそうであればどの程度の期間使用した時点で問題となるほどの汚染が生ずるかを知る必要がある。また、一般的な使用者が使用開始後のSCL消毒剤をどの程度の期間使用するかも問題である。そこでSCL使用者にSCL消毒剤を配布し、一定期間使用后、およびなくなるまで使用後に回収して汚染状況を調査する事とした。同時に、SCL使用者の性別、

年齢、使用頻度などをアンケート集計し、汚染状況との関連を調査した。

B. 研究方法

SCL消毒剤はもっとも多く使われている多目的用剤(MPS)を対象とする事とし、全国11施設のSCL処方施設において調査を行った。一般的なSCL使用者の実情を知るため、原則として対象は各施設を初診で訪れた者とし、診察時にMPSを1本ずつ渡し、使用後に各施設に返送するよう指示した。処方施設をA群:1週間使用後に返送、B群:2週間使用後に返送、C群:1本なくなるまで使用後に返送、の3群にわけ、各使用者には簡単なアンケート(表1)を渡し

て、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. 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

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、容器ノズル部のぬぐい液から細菌、真菌の培養および簡易定量検査を行った (表 2)。

表 2: 培養検査手順

1. 各 SCL 消毒剤について容器ノズル部をぬぐった液をサンプルとし、血液寒天培地/BTB 寒天培地で 35°C、48 時間培養した。
248 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。
- 3 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

また、アンケート結果を性別、年齢、SCL 使用頻度で分類し、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

平成 24 年 7 月から 25 年 1 月の間に、A 群: 80 例、B 群: 60 例、C 群: 29 例、計 169 例の SCL 消毒剤を収集し検査することが出来た。回収率はそれぞれ 100%、97%、54%であった。

1. 培養検査による細菌、真菌検出率

細菌検出率は A 群: 15%、B 群: 22%、C 群: 24%であった。簡易定量にて(1+)以上、あるいは複数菌種が検出された例は、A 群: 5%、B 群: 3%、C 群: 10%であった。いずれも群間に有意差は認められなかった。

2. 性別、年齢による汚染率の違い

SCL の性別は男性 37 例、女性 128 例 (アンケート記入がないため不明 4 例) であり、汚染例数はそれぞれ 5 例、25 例であった。汚染率に性別による差は認められなかった (χ 二乗検定)。

年齢は 16~63 才 (平均 32 才 \pm 10 才) であり、細菌検出がない群 (33 才 \pm 10 才) と、検出された群 (29 才 \pm 8 才) 間で有意差が認められた

(Welch 両側検定 $P=0.009$)。また、30 才代以上の非検出例 73 例、検出例 10 例に対し 20 才代以下では非検出例 62 例、検出例 20 例と、若年者で検出例が有意に多く (χ 二乗検定 $P=0.040$)、40 才代以上の非検出例 29 例、検出例 1 例に対しても 30 才代以下では非検出例 129 例、検出例 29 例と若年者に有意に検出例が多かった (χ 二乗検定 $P=0.020$)。

3. 使用頻度による汚染率の違い

週 6~7 回使用者の非検出例 122 例、検出例 22 例に対し、週 3~5 回使用者は非検出例 13 例、検出例 7 例と、有意に検出例が多かった (χ 二乗検定 $P=0.030$)。

4. 開封後使用期間と汚染率

SCL 消毒剤がなくなるまで使用させた C 群の平均使用日数は 76 日間±35 日間と長く、最短 15 日間から 177 日間までと個人差が大きかった。使用日数と汚染率の間に相関は認められなかった (ANOVA および Welch 両側検定)。

D. 考察

本研究により、

1. SCL 消毒剤の使用開始後経過日数と、SCL 消毒剤ノズル部の細菌汚染発生率には相関が認められなかった。
2. 一般的な SCL 使用者において、使用している SCL 消毒剤のノズル部は高率の細菌汚染が認められた。
3. SCL 消毒剤ノズル部の汚染は若年者により多く認められた
4. SCL 消毒剤ノズル部の汚染は SCL 使用頻度が少ない群に多く認められた。

以上から、SCL 消毒剤ノズル部の細菌汚染は使用期間に伴って蓄積される性質のものではなく、使用者の操作などによって即時的に発生するものと考えられる。若年者や使用頻度の少ない使用者においては、不適切な操作が行われやすく、そのため汚染率が高くなっている可能性がある。

E. 結論

SCL 消毒剤ノズル部には短期間の使用でも細菌汚染が発生し得る。SCL の清潔なケアと同時に、SCL 消毒剤自体も清潔に取り扱い、ノズル部への不用意な接触などがないよう指導する必要がある。

F. 研究発表 (平成 24 年度)

論文発表

1. 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 119:1111-1119, 2012
2. 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、宮崎大、宮本仁志、矢倉慶子：コンタクトレンズケース内汚染の現状. 日コレ誌 54:31-40, 2012
3. 井上幸次：II. 眼科疾患 5. 角膜感染症. 「診療ガイドライン UP-TO-DATE[2012-2013]」門脇孝、小室一成、宮地良樹監修、p106-116, メジカルビュー社, 東京, 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 115 回日本眼科学会総会 (東京) 5/12-5/15, 2011.
2. 宮崎大、池田欣史、矢倉慶子、川口亜佐子、石倉涼子、井上幸次、水戸毅、白石敦、大橋裕一、檜垣史郎、板橋幹城、福田昌彦、下村嘉一、八木田健司、アカントアメーバ角膜

炎における予後予測因子の多変量解析第 57
回山陰眼科集談会、 第 86 回鳥取大学眼科
研究会 2012/5/13

3. 魚谷瞳(鳥取大学), 稲田耕大, 宮崎大, 井
上幸次感染性角膜炎におけるグラム・ファ
ンギフローラ Y 二重染色の有用性第 57 回
山陰眼科集談会、第 86 回鳥取大学眼科研
究会 2012/5/13

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