

調査への参加を承諾した224施設（表2）である。また、重症のCL関連角膜感染症であっても、通院加療を行った症例は対象としていない。

2. 方法

上記の対象について、表3に概略を挙げた項目について調査を行った。調査結果は参加施設からインターネットを通じてCL関連角膜感染症調査委員会のWebサイトに集積し、視力予後については表4の項目、検出菌の種類については表5の項目との関連について表6の統計学的手法による検討を加えた。初診3ヵ月後の矯正視力が0.3以下にとどまった症例を「視力予後不良例」と定義した。また、市場調査会社「株式会社インテージ」から同時期の日本全国におけるCL使用実態調査結果（表7）を入手し、全国推定使用者数の性別、年齢、使用CL種別の割合とCL関連角膜感染症例の割合とを比較した。統計方法は全国集団を母集団と仮定し、母集団からの感染症例の割合の乖離を2項分布に基づく両側検定によって検討した。

結 果

調査期間内に対象施設から報告された症例は226例であ

表5 検出菌の危険因子として解析した項目

性別
年齢
使用CLの種別
洗浄の良否
こすり洗いの良否
SCL消毒の良否
CLケースを3ヵ月以内に定期交換している
CLケースを6ヵ月以内に定期交換している
定期的を受診している
1日使い捨てSCLを1日で捨てている
2週間交換SCLを2週間で交換している
定期交換SCLを期間内に交換している
各CL使用期間遵守の有無
ケア用品の種別

洗浄、こすり洗い、SCL消毒の良否の定義は表3と同様である

表6 検討項目の統計処理手順

1. 頻度集計
初診3ヵ月後の矯正視力が(0.3)以下であった症例を「視力予後不良例」と定義し、視力予後別の各因子の集計を行い、背景因子項目の分布を明瞭にした。検出菌は「グラム陽性菌」、「グラム陰性桿菌」、「アカントアメーバ」、「その他の菌」の4分類とした
2. 単変量解析
因子の視力予後への影響を単変量ロジスティックモデルで検討
3. 多変量解析
“不明・対象外”が10%以上存在する項目を除外した後、ロジスティック回帰モデルの逐次変数増減法を利用し、最も影響のある組み合わせを検討した

り、このうち両眼例は16例であったが、両眼そろってデータが報告されたのは5例だけであった。残り11例は両眼ともCL関連角膜症を発症してはいたものの、片眼のデータしか報告されなかったため、解析対象は226例231眼となる。全体の集計結果を表8に、視力予後不良例を抽出した集計結果を表9に示す。

これらの症例について、視力予後との関連を表4の因子について解析した結果、30歳代以上、アカントアメーバ検出陽性、ハードCL（以下 HCL）着用、ソフトCL（以下 SCL）消毒不良の症例に、それぞれ視力予後不良例が有意に多い結果となった（表10）。HCL着用者は9例であり、こすり洗いについては、9例中4例は励行、1例は時々実行、2例はほとんど行わず、2例は不明であった。レンズケースを定期的に変換している者は9例中1例のみであり、定期的に眼科を受診している者は3例であった。検出菌の種類と表5の調査項目について、統計学的に有意な相関を示した項目はケア用品種別のみであったが、表8に示したようにケア用品種別については不明例が多く、信頼性のある結果が得られないと考えられたため、データとしては採用しなかった。CL関連角膜感染症症例の性別、年齢、使用CL種別と日本全国のCL推定使用者数（表7）との比較については、表11に示すように、CL関連角膜感染症は男性と10歳代、20歳代の使用者、2週間交換SCLと定期交換SCLの使用者に多く、HCL使用者、1日使い捨てSCL使用者には少ないという結果が得られた。

考 察

統計処理結果に目を通す前に、この調査の限界を知る必要がある。入院が必要となるほど重症のCL関連角膜感染症患者のほとんどは全国1,155箇所（調査開始時）の日本眼科学会専門医制度認定施設のいずれかを受診したと推定されるが、今回の調査に参加したのはその2割足らずの

表7 全国のCL着用推定人口

性別	男性	666万人
	女性	1,200万人
年齢	10歳代	218万人
	20歳代	581万人
	30歳代	600万人
	40歳代	326万人
	50歳代	140万人
CLの種別	ハードCL (HCL)	581万人
	従来型SCL (カラーCL除く)	221万人
	1日使い捨てSCL	660万人
	2週間交換SCL	595万人
	定期交換 (1ヵ月/3ヵ月) SCL	111万人

(株)インテージ コンタクトレンズ&ケア用品使用実態調査2008年度版より

表8 調査項目の集計結果

性別	男性	127
	女性	104
年齢	10歳代以下	67
	20歳代	90
	30歳代以上	74
検出菌種数	検出なし	75
	1種検出	107
	2種検出	24
	3種検出	21
	4種検出	4
グラム陽性菌検出	陽性	47
	陰性	184
グラム陰性桿菌検出	陽性	92
	陰性	139
アcantアメーバ検出	陽性	59
	陰性	172
その他の菌検出	陽性	36
	陰性	195
初診3ヵ月後の矯正視力	1.0以上	85
	0.7~0.9	38
	0.4~0.6	30
	0.1~0.3	18
	0.07~0.09	0
	0.04~0.06	4
	指数弁~0.03	11
	光覚のみ	4
	光覚なし	1
	不明	40
使用CLの種別	1日使い捨てSCL	17
	2週間交換SCL	128
	定期交換SCL	38
	カラーCL	11
	HCL	9
	不明またはその他	28
CL洗浄の良否	良	169
	否	52
	不明または洗浄不要	10
こすり洗いの良否	良	124
	否	97
	不明またはこすり洗い不要	10
SCL消毒の良否	良	139
	否	45
	不明または消毒不要	47
CLケースを3ヵ月以内に定期交換している	良	45
	否	132
	不明	54
CLケースを6ヵ月以内に定期交換している	良	64
	否	113
	不明	54
定期的に受診している	良	93
	否	109
	不明	29
1日使い捨てSCLを1日で捨てている	良	8
	否	9
	不明またはその他のCL	214
2週間交換SCLを2週間で交換している	良	44
	否	69
	不明またはその他のCL	118
定期交換SCLを期間内に交換している	良	25
	否	10
	不明またはその他のCL	196
ケア用品の種別	ロート社製多目的用剤	31
	オプティフリー類*	19
	コンプリート類*	17
	レニュー類*	20
	その他の多目的用剤	19
	製品名不明の多目的用剤	21
	過酸化水素剤	10
	不明	94

*:「オプティ・フリー®」と「オプティ・フリー®プラス」は混同しやすいため、あわせて「オプティフリー類」とした。同様にコンプリート系列の多目的用剤は「コンプリート類」、レニュー系列の多目的用剤は「レニュー類」としてまとめて集計した

表9 視力予後不良例の調査項目集計結果

性別	男性	19
	女性	19
年齢	10歳代以下	9
	20歳代	9
	30歳代以上	20
検出菌種数	検出なし	10
	1種検出	24
	2種検出	2
	3種検出	2
	4種検出	0
グラム陽性菌検出	陽性	4
	陰性	34
グラム陰性桿菌検出	陽性	11
	陰性	27
アcantアメーバ検出	陽性	16
	陰性	22
その他の菌検出	陽性	3
	陰性	35
初診3ヵ月後の矯正視力	1.0以上	0
	0.7~0.9	0
	0.4~0.6	0
	0.1~0.3	18
	0.07~0.09	0
	0.04~0.06	4
	指数弁~0.03	11
	光覚のみ	4
	光覚なし	1
	不明	0
使用CLの種別	1日使い捨てSCL	0
	2週間交換SCL	20
	定期交換SCL	9
	カラーCL	2
	HCL	5
	不明またはその他	2
CL洗浄の良否	良	25
	否	9
	不明または洗浄不要	4
こすり洗いの良否	良	17
	否	18
	不明またはこすり洗い不要	3
SCL消毒の良否	良	14
	否	9
	不明または消毒不要	15
CLケースを3ヵ月以内に定期交換している	良	8
	否	26
	不明	4
CLケースを6ヵ月以内に定期交換している	良	12
	否	22
	不明	4
定期的に受診している	良	15
	否	19
	不明	4
1日使い捨てSCLを1日で捨てている	良	0
	否	0
	不明またはその他のCL	38
2週間交換SCLを2週間で交換している	良	6
	否	11
	不明またはその他のCL	21
定期交換SCLを期間内に交換している	良	3
	否	4
	不明またはその他のCL	31
ケア用品の種別	ロート社製多目的用剤	3
	オプティフリー類*	4
	コンプリート類*	3
	レニュー類*	1
	その他の多目的用剤	6
	製品名不明の多目的用剤	4
	過酸化水素剤	1
	不明	16

*:「オプティ・フリー®」と「オプティ・フリー®プラス」は混同しやすいため、あわせて「オプティフリー類」とした。同様にコンプリート系列の多目的用剤は「コンプリート類」、レニュー系列の多目的用剤は「レニュー類」としてまとめて集計した

表10 初診3ヵ月後の矯正視力が(0.3)以下であった症例を「視力予後不良」と定義した場合の、視力予後と有意な相関が認められた項目

単変量ロジスティック回帰モデル				
項目	結果	オッズ比	95%信頼区間	p 値
年齢	30歳代以上の症例は、20歳代の症例より視力予後不良例が多い	3.46倍	1.44~8.31	p=0.005
アcantアメーバ検出	陽性例は、陰性例より重症視力予後不良例が多い	2.20倍	1.05~4.62	p=0.0369
使用CLの種別	HCL装用症例は、2週間交換SCL装用症例より視力予後不良例が多い	7.33倍	1.62~33.24	p=0.0098
多変量ロジスティック回帰モデル (上記の単変量解析における有意3項目を共変量とした)				
SCL消毒の良否	消毒不良例は、良好例より視力予後不良例が多い	2.89倍	1.06~7.92	p=0.0029

224施設のみである。また、重症であっても外来で治療を行った症例は今回の調査には含まれていない。ただし、不参加施設には重症のCL関連角膜炎患者がほとんど受診しないか、あるいはほかの施設に紹介していたために調査に参加しなかったという可能性も考えられ、その場合は参加施設に症例が濃縮されていることになる。いずれにせよ、今回の調査では全国のCL関連角膜炎重症例の何%を対象とできたかが不明であり、症例の偏りが生じている可能性がある。また、表11に示した全国の推定使用者数との対比においても、今回の各参加施設が対象としている患者群に地方的、あるいは症例的な偏りがあり、正しい評価ができない可能性がある。より正確なデータを得るためには、全眼科施設が参加する大規模な調査が必要となる。今回のような多岐にわたる項目についての全国調査は困難だが、性別、年齢、使用CLの種別程度に絞れば不可能ではないであろう。実際にオーストラリアとニュージーランド全土の全眼科施設を対象とした1年間の調査^{11, 12)}も行われている。

次にデータの信頼性が問題となる。「結果」に記したように、両眼例が16例あったにもかかわらず、両眼そろってデータが報告されたのは5例だけであった。また、表8に示したように「不明」のデータ数が多い。とくに患者からの聴取が主となる「ケア用品の種別」については半数近くが「不明」であり、解析データとして使用するのが不適当となっている。ケア用品は使用者が頻りに種類を替えることもあり、使用している製品の名称を混同していることもよくある。諸外国の報告³⁻¹²⁾でもケア用品について一定の

表11 全国推定使用者数と比較した場合の危険性(2項分布に基づく割合の検定)

有意に関係する因子		CL関連角膜炎の発生	有意性
性別	男性	有意に多い	p<0.0001
年齢	10歳代	有意に多い	p<0.0001
	20歳代	有意に多い	p=0.0014
CLの種別	HCL	有意に少ない	p<0.0001
	1日使い捨てSCL	有意に少ない	p<0.0001
	2週間交換SCL	有意に多い	p<0.0001
	定期交換SCL	有意に多い	p<0.0001

結果を示したものが無いのは、このようなデータ収集上の問題のためであろう。

また、今回は初診3ヵ月後における矯正視力が0.3以下だった者を「視力予後不良例」と定義した。これはWHO(世界保健機関)が視力0.33(6/18)以下を「弱視」と定義していること、我が国でも普通運転免許の取得には片眼視力0.3が必要なこと(片眼が0.3未満の場合、他眼に付加条件が必要)、および今回の症例の例数分布から統計解析時の検出力を考慮して決定した。しかし、これら「視力予後不良例」のなかには、感染症発生以前から矯正視力が不良だった症例や、円錐角膜や不正乱視のようにHCLを装用しないと視力が出ないのに、入院施設で眼鏡のみを用いて矯正された症例などが含まれている可能性もある。このような症例の有無については、今回の調査ではチェックできなかった。

これらの限界を踏まえた上で今回の結果を検討する。表9のように、アcantアメーバ検出例とSCLの消毒不良例には視力予後不良例が多い。これはアcantアメーバ角膜炎の診断、治療が困難であること、消毒不良であれば感染しやすいであろうことから容易に納得できる。しかし、表11で安全性が高いことが示されているHCL使用者や、ほかの年代と比較して危険性が少ない30歳代以上の使用者に、表10のように視力予後不良例が多かったという結果は、一見直感に反している。これは本来危険性が低いはずの年代、CL種別であるにもかかわらず発症するのは、使用者の素因やCLケアに大きな問題があり、このため発症すると重症化しやすいためとも考えられる。HCL装用者については、毎日のこすり洗いはある程度行われていても、レンズケースの定期的交換、定期検査受診が行われておらず、これが感染、眼科受診の遅延につながったとも考えられる。レンズ購入などのために眼科を訪れる機会が多いSCL使用者と異なり、HCL使用者は定期的に眼科を受診することが少ないため、不調時にも直ちに眼科を受診せずに治療開始の時期を逸してしまった可能性も考えられる。前述のようにHCL装用者には眼鏡矯正では矯正視力

が得られない円錐角膜や不正乱視が含まれているため、HCL 装用者の視力予後に不良例が多くみえる可能性もある。2週間を含む定期交換レンズでは、菌の検出されない軽症例が多いことが角膜感染症サーベイランス¹⁾でも示されており、発症頻度と視力予後は必ずしも相関しない可能性がある。CL 関連角膜症による視力低下を判定するためには発症前の視力が必要であるが、実際にはそのようなデータを得ることは難しい。視力予後が不良であった場合、視力低下の原因がCL 関連角膜感染症によるものか否かについて、主治医の判断だけでも得ることができれば、解析精度の改善が望めるかもしれない。今後、調査を継続する際に考慮しなければならない点である。表11に示したCL 関連角膜感染症の危険因子については、角膜潰瘍や角膜浸潤が男性、若年者に多く、HCL、1日使い捨てSCL 使用者に少ないという従来の報告^{4, 9, 10, 12, 13, 18, 22)}とよく一致している。CL を処方し、管理していく上では男性、若年者にとくに注意し、SCL の消毒を励行させるとともに、HCL、1日使い捨てSCL への移行も考えていくべきであろう。同時に、CL 使用者にも処方時、定期検査時にこのようなデータを示して、CL 装用に伴うリスクを自覚させるとともに、より安全な選択肢を提示すべきである。

なお、この調査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」)の助成を受けて行われた。稿を終えるにあたり、コンタクトレンズ&ケア用品使用実態調査2008年度版資料を提供して下さった株式会社インテージと、株式会社インテージとの連絡の労を執っていただいた村岡 卓氏(調査時、ボシユロム・ジャパン(株)に所属)に感謝いたします。

文 献

- 1) 井上幸次, 感染性角膜炎全国サーベイランス・スタディグループ: 感染性角膜炎全国サーベイランス—分離菌・患者背景・治療の現況—. 日眼会誌 110: 961-972, 2006.
- 2) 北川和子: 細菌性角膜炎・真菌性角膜炎とコンタクトレンズ. 日コレ誌 49: 157-162, 2007.
- 3) Schein OD, Glynn RJ, Poggio EC, Seddon JM et al: The relative risk of ulcerative keratitis among users of daily-wear and extended-wear soft contact lenses. A case-control study. N Engl J Med 321: 773-778, 1989.
- 4) Poggio EC, Glynn RJ, Schein OD, Seddon JM et al: The incidence of ulcerative keratitis among users of daily-wear and extended-wear soft contact lenses. N Engl J Med 321: 779-783, 1989.
- 5) Matthews TD, Frazer DG, Minassian DC, Radford CF et al: Risks of keratitis and patterns of use with disposable contact lenses. Arch Ophthalmol 110: 1559-1562, 1992.
- 6) Buehler PO, Shein OD, Stamler JF, Verdier DD et al: The increased risk of ulcerative keratitis among disposable soft contact lens users. Arch Ophthalmol 110: 1555-1558, 1992.
- 7) Shein OD, Buehler PO, Stamler JF, Verdier DD et al: The impact of overnight wear on the risk of contact lens—Associated ulcerative keratitis. Arch Ophthalmol 112: 186-190, 1994.
- 8) Edmunds FR, Comstock TL & Reindel WT: Cumulative clinical results and projected incident rates of microbial keratitis with PureVision silicone hydrogel lenses. ICLC 27: 182-186, 2000.
- 9) McNally JJ, Chalmers RL, McKenney CD & Robirds S: Risk factors for corneal infiltrative events with 30-night continuous wear of silicone hydrogel lenses. Eye & Contact Lens 29: S153-S156, 2003.
- 10) Morgan PB, Efron N, Brennan NA, Hill EA et al: Risk factors for the development of corneal infiltrative events associated with contact lens wear. Invest Ophthalmol Vis Sci 46: 3136-3143, 2005.
- 11) Keay L, Edwards K, Naduvilath T, Forde K et al: Factors affecting the morbidity of contact lens-related microbial keratitis: A population study. Invest Ophthalmol Vis Sci 47: 4302-4308, 2006.
- 12) Stapleton F, Keay L, Edwards K, Naduvilath T et al: The incidence of contact lens-related microbial keratitis in Australia. Ophthalmology 115: 1655-1662, 2008.
- 13) Dart JKG, Radford CF, Minassian D, Verma S et al: Risk factors for microbial keratitis with contemporary contact lenses—A case control study. Ophthalmology 115: 1647-1654, 2008.
- 14) 馬嶋慶直, 野川秀利, 江崎淳次: 高含水率ソフトコンタクトレンズの無水晶体眼に対する extended wear について. 日コレ誌 22: 299-306, 1980.
- 15) 岩崎直樹, 井上 徹, 浜野 孝, 松田 司他: 無水晶体眼に対する高含水率ソフトコンタクトレンズの連続装用による障害について. 日コレ誌 30: 38-43, 1988.
- 16) 脇田まり子, 岸下 仁, 伊東延子, 千葉奈緒子他: 各種コンタクトレンズ装用者にみられる眼障害の頻度について. 日コレ誌 31: 62-67, 1989.
- 17) 濱野 光: 角膜障害からみたコンタクトレンズの現状. 日コレ誌 37: 1-6, 1995.
- 18) 鈴木真貴子, 松野 裕, 鈴木 敬: ディスポーザブルソフトコンタクトレンズ装用者の角膜障害. 日コレ誌 37: 198-203, 1995.
- 19) 濱野 保, 光永サチ子, 小谷撰子, 濱野 孝他: コンタクトレンズ新規装用者における角結膜障害. 日コレ誌 39: 153-158, 1997.
- 20) 渡邊 潔, 前田直之: コンタクトレンズ装用による角膜障害の新しい分類と最近の傾向. 日コレ誌 40: 86-93, 1998.
- 21) 百瀬隆行, 伊東延子, 佐渡一成, 糸井素純他: ワンデーディスポーザブルソフトコンタクトレンズの苦情と障害. 日コレ誌 40: 113-115, 1998.
- 22) 大谷園子, 高橋康造, 村上 晶, 中安清夫: ソフトコンタクトレンズによる眼障害. 日コレ誌 44: 97-102, 2002.
- 23) 田中かつみ, 土至田 宏, 儘田直樹, 金井 淳他: 救急外来を受診したコンタクトレンズによる眼障害例の検討. 日コレ誌 46: 201-204, 2004.
- 24) 稲葉昌丸, 佐野研二, 濱野 孝: コンタクトレンズによる眼科救急の実態. 日コレ誌 49: 84-88, 2007.
- 25) 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. 日本の眼科 80: 693-698, 2009.

(2009年11月11日受付)

|||お知らせ|||

インターネットによるコンタクトレンズ眼障害 アンケート調査の集計結果報告(平成21年度)

日本コンタクトレンズ協議会*

はじめに

コンタクトレンズ(以下CL)装用者の増加に伴って、CLによる眼障害の数も増えている。日本眼科医会がこれまでに実施したアンケート調査¹⁻⁹⁾の結果から、CL使用者の5~10%に眼障害が発生していると推察しているが、これはあくまで本会の会員の医療機関を受診した患者だけを対象として得られたデータであったため、会員以外の医師の診療所を受診した場合や、トラブルが生じて医療機関を受診しなかった場合などの実態については明らかになっていない。そこで、日本眼科医会、日本コンタクトレンズ学会、日本コンタクトレンズ協会の3団体からなる日本コンタクトレンズ協議会は、ホームページ上で一般の方を対象にCL眼障害の調査を行っている¹⁰⁻¹³⁾。この1年間の回答を集計したので報告する。

方 法

日本眼科医会のホームページを通じて、CLの装用が原因と考えられる眼障害を経験したことのある人を対象として調査を行った。なお、本調査には日本コンタクトレンズ学会ならびに日本コンタクトレンズ協会のホームページからリンクできるようにした。

調査期間は平成21年7月5日から平成22年7月4日であった。

調査項目は、性別、年齢(年代別)、CLの休止期間、トラブルのあった目(右、左、両のいずれか)、自覚症状、診断名、CLの種類、CLの購入先、CLの処方施設、CLの装用状況、装用日数、装用時間、取扱説明書の受

け取り、定期検査、CLの洗浄、ソフトコンタクトレンズ(以下SCL)の消毒、SCLの消毒剤、使い捨てSCL・頻回交換SCLの装用方法の遵守、使い捨てSCL・頻回交換SCLの装用日数であった。

結 果

97件の回答があった。各設問の集計結果をパーセントで記す。

1) 性別

男性が22.7%、女性が77.3%であった(図1)。

2) 年 齢

年代別では、10歳代が11.3%、20歳代が39.2%、30歳代が29.9%、40歳代が11.3%、50歳代が7.2%、60歳以上が0%、無回答が1.0%であった(図2)。

3) 休止期間

休止せずが14.4%、3日以内が55.7%、4日以上が29.9%であった(図3)。

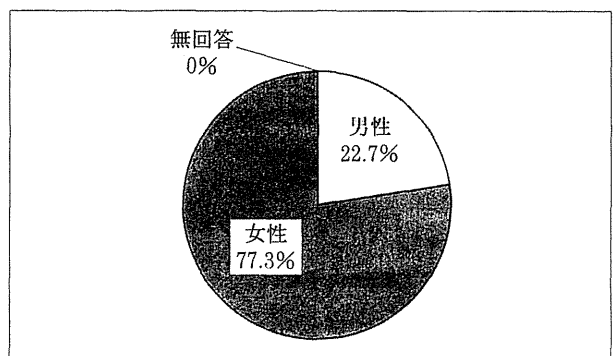


図1 性別

*日本コンタクトレンズ協議会

日本コンタクトレンズ学会

植田 喜一・糸井 素純・大橋 裕一・木下 茂

(社)日本眼科医会

高橋 和博・宇津見義一・山田 昌和・福下 公子・白井正一郎・高野 繁

(社)日本コンタクトレンズ協会

大瀧 守彦・大橋 敏夫・溝口 隆久・早川 豪一・柘植 益郎・田中 英成

4) **トラブルのあった目**

右目が32.0%, 左目が15.5%, 両目が52.6%であった(図4)。

5) **自覚症状(複数回答可)**

右目ならびに左目に生じたトラブルの自覚症状を図5, 6に示す。充血(右目が25.5%, 左目が22.7%, 以下同様), 目の痛み(21.3%, 19.3%)を訴えるものが多く, 視力低下(4.6%, 4.5%), かすみ(8.3%, 8.0%), めやに(13.4%, 13.1%), 乾燥感(11.1%, 14.8%), かゆみ(9.3%, 10.2%), その他(6.5%, 7.4%)であった。

6) **診断名(複数回答可)**

右目ならびに左目の診断名を図7, 8に示す。点状表(人)

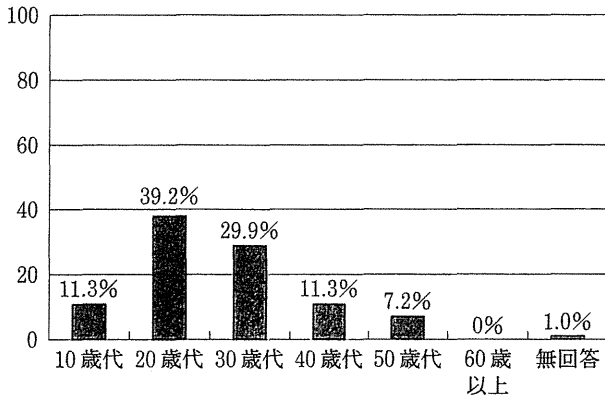


図2 年齢(年代別)

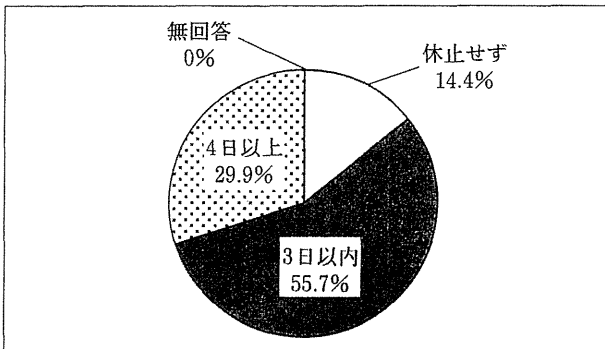


図3 休止期間

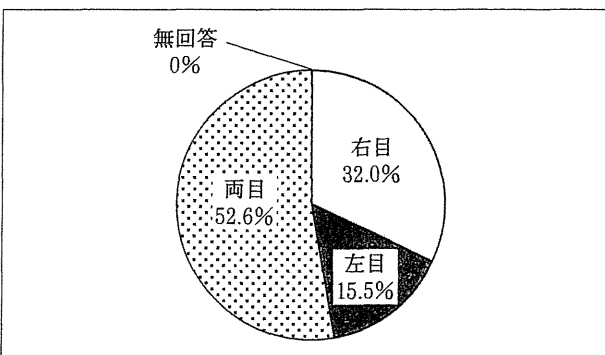


図4 トラブルのあった目

層角膜炎(13.0%, 11.1%), 角膜上皮びらん(角膜上皮剥離を含む)(26.1%, 22.2%), 角膜浸潤(4.3%, 0%), 角膜潰瘍(10.9%, 11.1%), 角膜浮腫(2.2%, 2.8%), 角膜血管新生(2.2%, 0%), 結膜充血(19.6%, 25.0%), 角膜内皮障害(4.3%, 2.8%)で, その他(17.4%, 25.0%)であった。

7) **CLの種類**

ガス透過性レンズを含むハードコンタクトレンズ(以下HCL)が19.6%, 従来型SCLが13.4%, 1日使い捨てSCLが10.3%, 1週間連続装用使い捨てSCLが2.1%, 2週間頻回交換SCLが43.3%, 1~6ヶ月定期交換SCLが6.2%, カラーSCLが1.0%, 度数のないカラーSCLが4.1%であった(図9)。

8) **CLの購入先**

CL診療を主とする診療所に併設する販売店(量販店を含む)が42.3%, 一般病院内または併設する販売店が3.1%, 眼科医療機関に併設する販売店が27.8%, 眼鏡店が10.3%, 通信販売が2.1%, インターネットが7.2%, 薬局が1.0%, その他が6.2%であった(図10)。

9) **CLの処方施設**

大学病院が1.0%, 一般病院(大学病院を除く)が4.1%

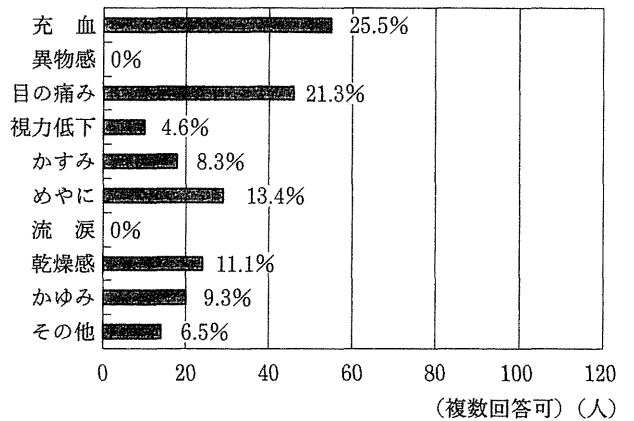


図5 自覚症状(右目)

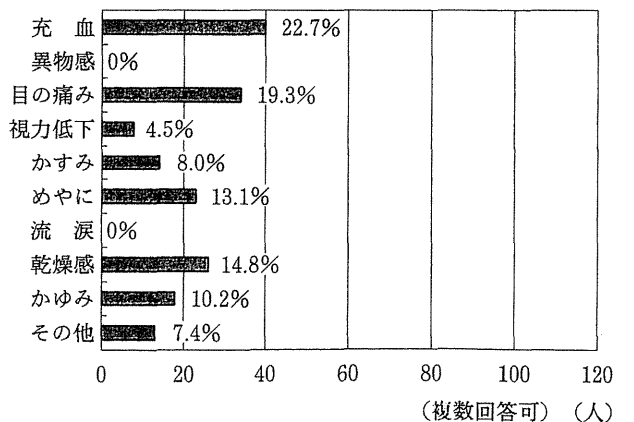


図6 自覚症状(左目)

%, 一般眼科診療所が33.0%, CL診療を主とする診療所が44.3%, 眼鏡店に併設する眼科診療所が4.1%, 医師の処方を受けなかったが11.3%, その他が2.1%であった(図11)。

10) 装用状況

連続装用が8.2%, 終日装用が91.8%であった(図12)。

11) 装用日数

毎日が67.0%, 週6日が9.3%, 週5日が10.3%, 週3~4日が4.1%, 週1~2日が2.1%, 不規則が5.2%, その他が2.1%であった(図13)。

12) 装用時間

1日16時間以上が20.6%, 8~16時間未満が66.0%, 4~8時間未満が7.2%, 4時間未満が2.1%, 不規則が1.0%, その他が3.1%であった(図14)。

13) 取扱説明書の受け取り

受け取ったが86.6%, 受け取らなかったが13.4%であった(図15)。

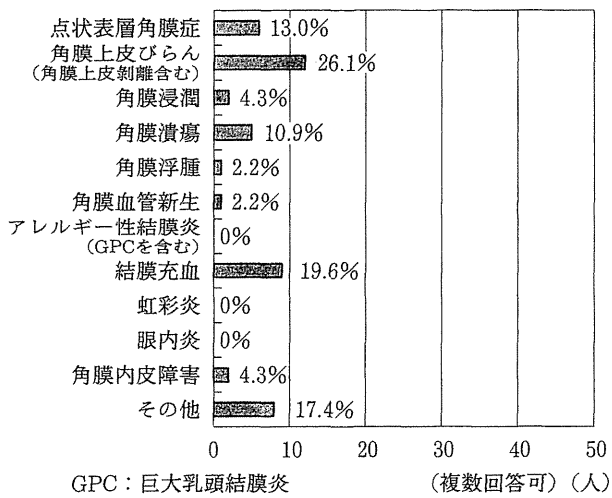


図7 診断名 (右目)

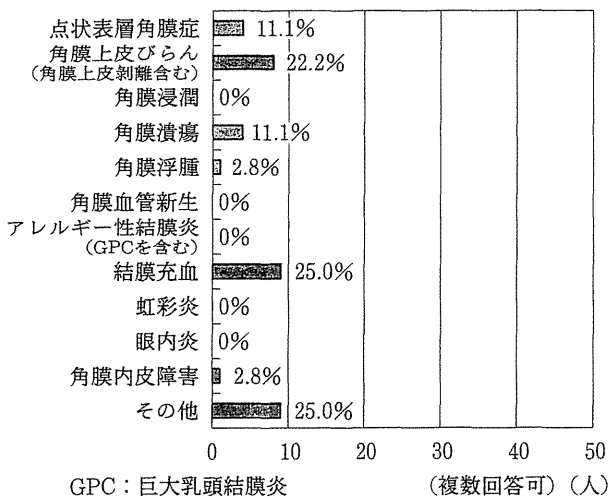


図8 診断名 (左目)

14) 定期検査

1ヶ月に1回が1.0%, 3ヶ月に1回が15.5%, 6ヶ月に1回が18.6%, 年に1回が11.3%, 不定期に受けていたが20.6%, 全く受けていなかったが29.9%, その他が3.1%であった(図16)。

15) CLの洗浄

毎日洗浄していたが71.1%, 週に2~3回洗浄してい

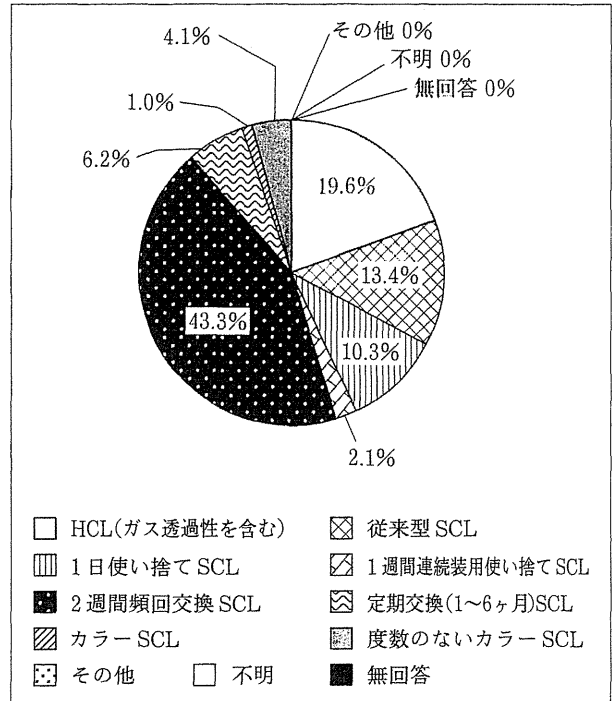


図9 CLの種類

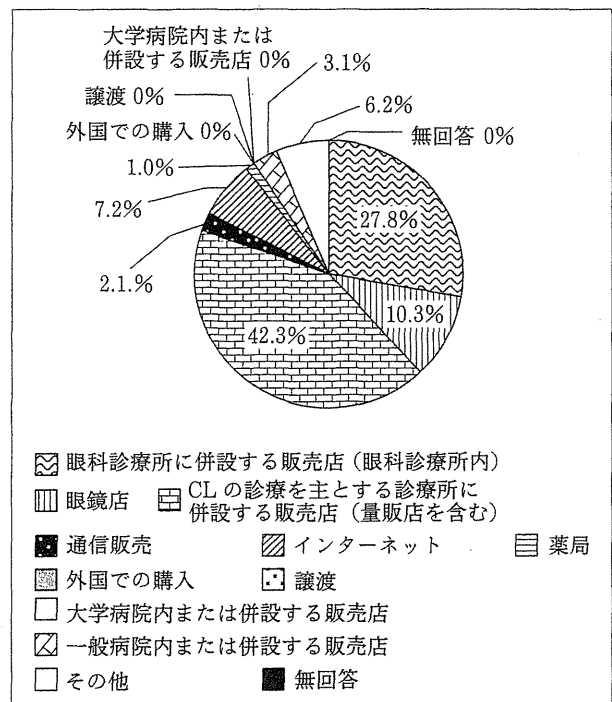


図10 購入先

たが5.2%, 週に1回洗浄していたが2.1%, ほとんど洗浄していなかったが4.1%, 全く洗浄していなかったが10.3%, その他が7.2%であった(図17)。

16) SCLの消毒

毎日消毒していたが42.3%, 週に1回消毒していたが1.0%, 週に2~3回消毒していたが4.1%, 時々消毒し

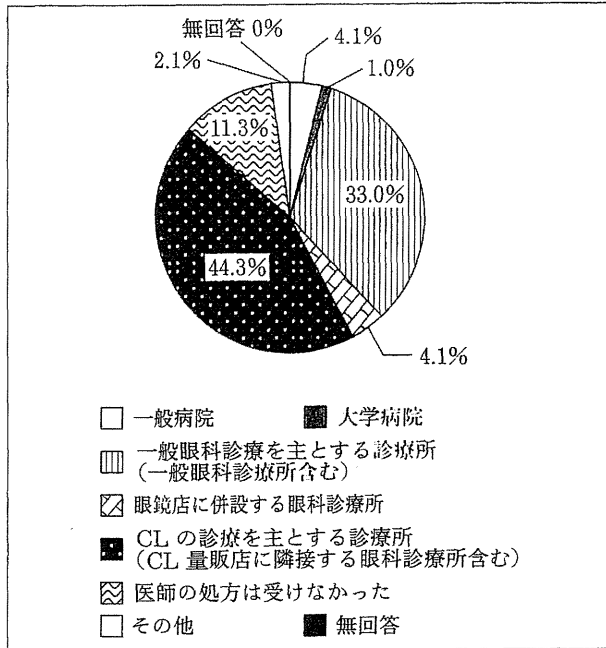


図11 処方施設

ていたが3.1%, ほとんど消毒していなかったが3.1%, 消毒はしていなかったが5.2%, その他が4.1%, 無回答が37.1%であった(図18)。

17) SCLの消毒剤

マルチパーパスソリューション(MPS)が22.5%, 過酸化水素消毒剤が5.6%, 不明が71.8%であった(図19)。

18) 装用方法の遵守 (1日および1週間連続装用

使い捨てSCL・2週間頻回交換SCLについて) 守っていたが46.3%, ほぼ守っていたが20.4%, 時々守っていたが5.6%, 守っていなかったが11.1%, 無回

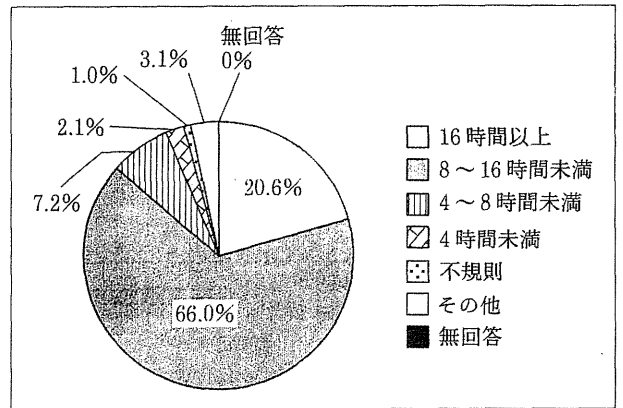


図14 装用時間

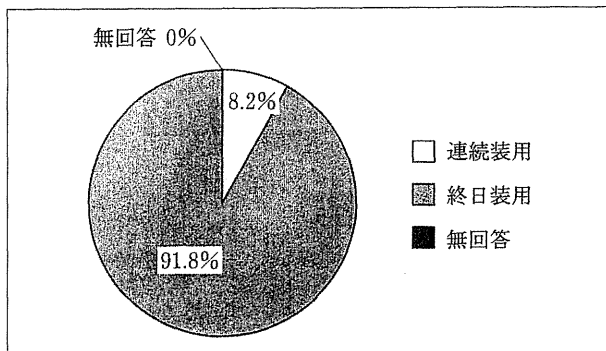


図12 装用状況

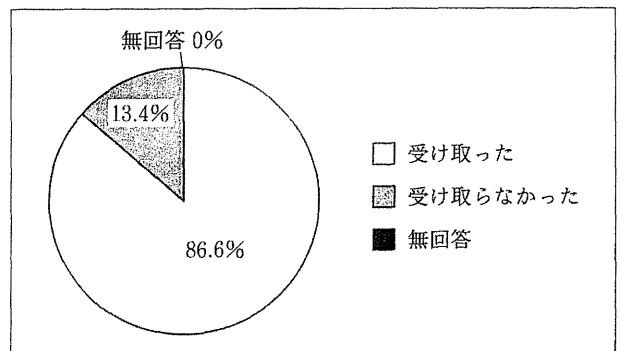


図15 取扱説明書

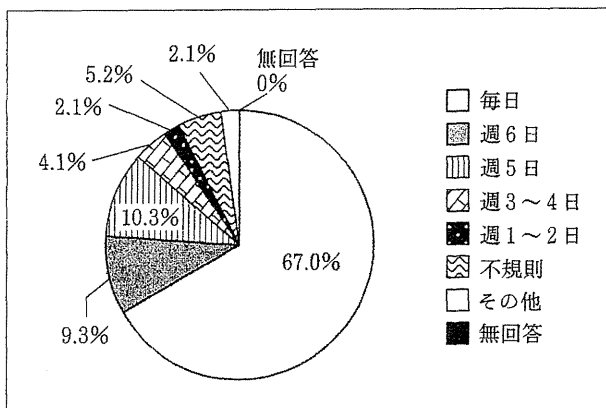


図13 装用日数

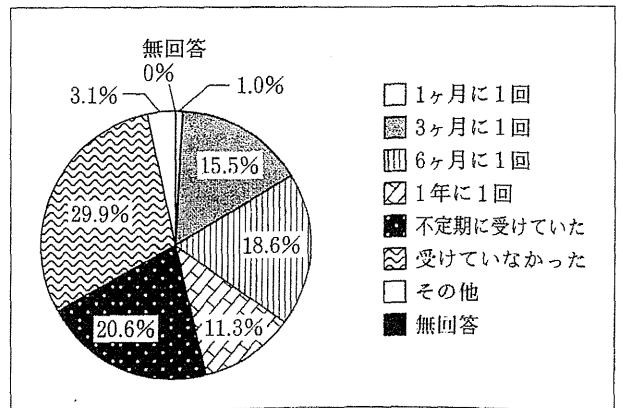


図16 定期検査

答が16.7%であった(図20)。

19) 装用日数(1日および1週間連続装用使い捨て SCL・2週間頻回交換 SCLについて)

1~7日が38.9%, 8~14日が22.2%, 15~30日が9.3%, 31日以上が3.7%, 無回答が25.9%であった(図21)。

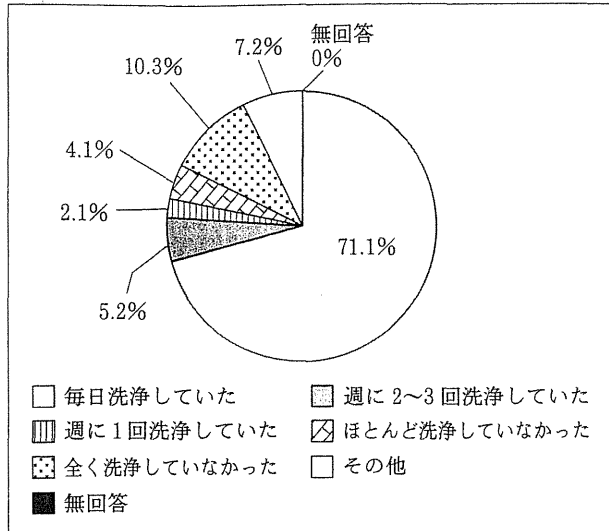


図17 洗浄

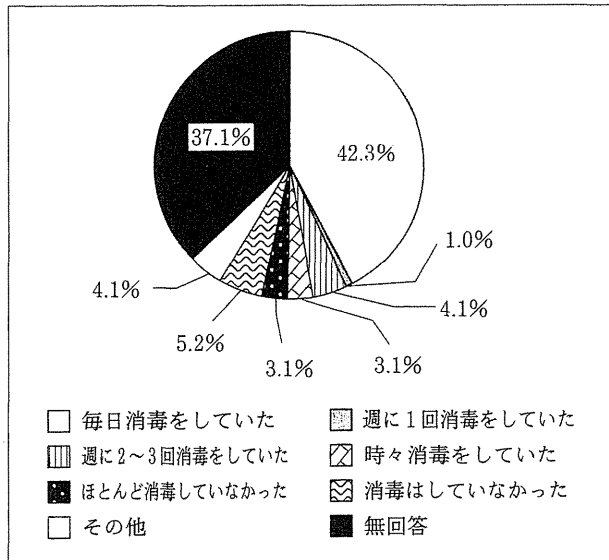


図18 SCLの消毒

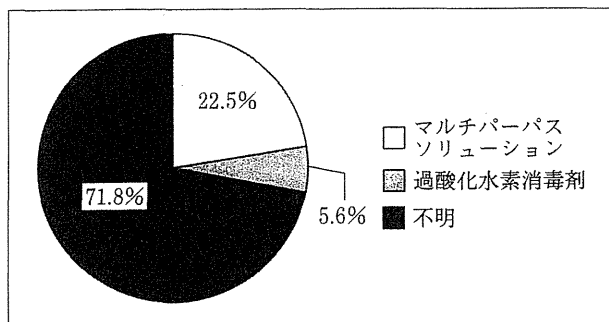


図19 SCLの消毒剤

考 察

これまでの本調査の報告件数を表1に示すが、アンケートに協力いただいた方は、日本眼科医会、日本コンタクトレンズ学会、日本コンタクトレンズ協会のホームページを自ら見たということで、CLへの関心が強いといえる。

CLは両眼に装用する機会が多いので、トラブルを生じるのも両眼であることが多い¹⁰⁻¹³⁾。本調査の結果でも両眼のトラブルが52.6%と半数以上であった。自覚症状としては、充血、目の痛み、乾燥感、かゆみなどが多く、診断名としても結膜充血、角膜上皮びらん(角膜上皮剥

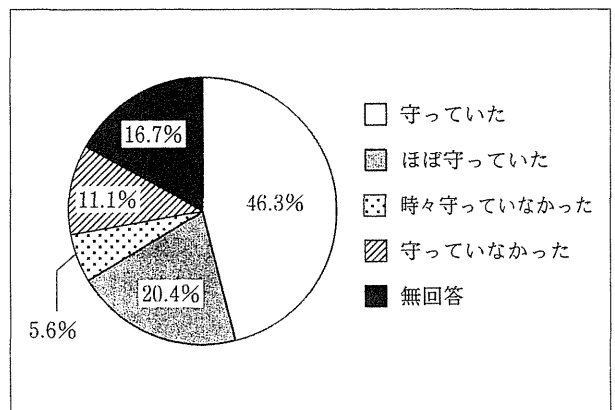


図20 装用方法の遵守

(1日および1週間連続使い捨て SCL, 2週間頻回交換 SCL)

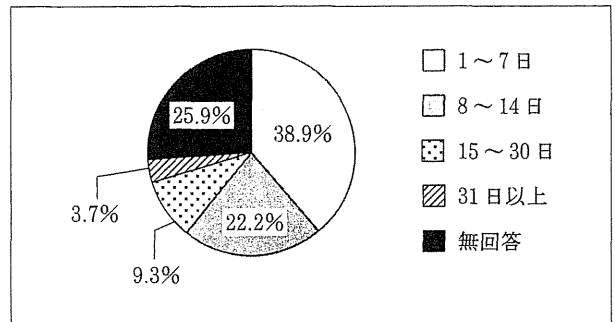


図21 装用日数

(1日および1週間連続使い捨て SCL, 2週間頻回交換 SCL)

表1 眼障害アンケート調査の報告件数

調査期間	報告件数
平成14年1月~平成18年5月31日	330件
平成18年6月20日~平成19年7月4日	203件
平成19年7月5日~平成20年7月4日	137件
平成20年7月5日~平成21年7月4日	141件

離を含む), 点状表層角膜症が多かった。CLの合併症としてもっとも重篤と考えられる角膜潰瘍も10%以上(右眼10.9%, 左眼11.1%)に認められたが, これまでの日本眼科医会の調査結果と同等の割合であった¹⁻⁹⁾。

日本眼科医会が平成20年に9,904名のCL使用者に行ったアンケート調査結果¹⁰⁾によると, これまでにCLの使用を一時中止しなければならないようなトラブルを経験した者は49.9%(1回が19.5%, 2~5回が25.9%, 6回以上が4.5%)で, これらのトラブルのうち, もっともひどいトラブルが良くなるまでに要した日数は4~7日が33.6%ともっとも多く, 2~3日が28.9%, 1週間~1ヶ月が25.2%, 1ヶ月以上が5.2%, 1日が4.3%, 治っていないが0.5%であった。多くのCL使用者がトラブルを経験しており, それも比較的ひどいトラブルであることが明らかになった。CL使用者が考えるトラブルの原因は, 長時間装用したが24.8%, レンズケアが不適切であったが17.0%, CLを入れたまま寝た(連続装用)が13.5%, CLをすぐにはずさなかったが9.2%, 使用期限があるCLを日数を超えて使用したが6.8%, 眼科医に指示された定期検査を受けなかったが2.4%, 添付文書をよく読まなかったが0.3%であった。

この調査結果と今回の調査結果を比較すると, CLの休止期間が4日以上は今回の調査が29.9%と少なかった。CLの装用状況は連続装用が8.2%で, 1日の装用時間は16時間以上が20.6%と, 長時間装用している者が多かった。1日および1週間連続使い捨てSCLや2週間頻回交換SCLの装用方法を守っていたのは46.3%であったことから, CLの使用方法に問題のあることや, 毎日洗浄していたが71.1%, 毎日消毒していたが42.3%であった結果からレンズケアについても問題があることがわかる。

CLの処方を受けていない者は11.3%で, インターネットや通信販売で購入している者は9.3%であった。CLの購入にあたっては必ず眼科専門医の診察を受けて, 信頼のおける販売店で入手するように指導することが大切である。

これまでの調査から, 2週間頻回交換SCLを装用している者でMPSを使用している場合の眼障害例が多いことが指摘されている¹⁰⁾が, 本調査でも2週間頻回交換SCLが43.3%ともっとも多く, SCL消毒についても過酸化水素消毒剤が5.6%に対して, MPSは22.5%と多かった。使用している消毒剤が不明が71.8%であることは問題で, レンズケアに関心がないことを裏づける結果である。

定期検査についても1ヶ月あるいは3ヶ月に1回定期検査を受けているものは16.5%に対して, 全く受けてい

ないものが29.9%であることから, 定期検査を受けていないことも問題であったことがわかる。

日本眼科医会が行った他の調査結果⁶⁾からも, CL使用者のCLの使い方やレンズケア, 定期検査などに問題があることが指摘されているが, あらためて本調査でもこれらの問題が浮き彫りになった。

[文 献]

- 1) 日本眼科医会医療対策部: コンタクトレンズによる眼障害アンケート調査の集計結果報告. 日本の眼科 70: 439-442, 1999.
- 2) 日本眼科医会医療対策部: コンタクトレンズによる眼障害アンケート調査の集計結果報告(第2報). 日本の眼科 71: 1481-1484, 2000.
- 3) 日本眼科医会医療対策部: コンタクトレンズによる眼障害アンケート調査の集計結果報告(平成12年度). 日本の眼科 72: 1341-1344, 2001.
- 4) 日本眼科医会医療対策部: コンタクトレンズによる眼障害アンケート調査の集計結果報告(平成13年度). 日本の眼科 73: 1381-1384, 2002.
- 5) 日本眼科医会医療対策部: コンタクトレンズによる眼障害アンケート調査の集計結果報告(平成14年度). 日本の眼科 75: 219-222, 2004.
- 6) 日本眼科医会医療対策部: コンタクトレンズによる眼障害アンケート調査の集計結果報告(平成18年度). 日本の眼科 78: 1223-1229, 2007.
- 7) 日本眼科医会医療対策部: コンタクトレンズによる眼障害アンケート調査の集計結果報告(平成19年度). 日本の眼科 79: 1165-1170, 2008.
- 8) 日本眼科医会医療対策部: コンタクトレンズによる眼障害アンケート調査の集計結果報告(平成20年度). 日本の眼科 80: 940-946, 2009.
- 9) 日本眼科医会医療対策部: コンタクトレンズによる眼障害アンケート調査の集計結果報告(平成21年度). 日本の眼科 81: 408-412, 2010.
- 10) 糸井素純, 植田喜一, 岡野憲二, 宇津見義一, 吉田博: インターネットによるコンタクトレンズ眼障害アンケート調査. 日コレ誌 50: 111-121, 2008.
- 11) 日本コンタクトレンズ協議会: コンタクトレンズ眼障害アンケート調査の集計結果報告. 日本の眼科 78: 1378-1387, 2007.
- 12) 日本コンタクトレンズ協議会: インターネットによるコンタクトレンズ眼障害アンケート調査の集計結果報告. 日本の眼科 79: 1293-1299, 2008.
- 13) 日本コンタクトレンズ協議会: インターネットによるコンタクトレンズ眼障害アンケート調査の集計結果報告(平成20年度). 日本の眼科 80: 101-107, 2009.
- 14) 日本眼科医会医療対策部: インターネットを利用したコンタクトレンズ使用者の実態調査. 日本の眼科 80: 947-953, 2009.
- 15) 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. 日本の眼科 80: 693-698, 2009.
- 16) 日本コンタクトレンズ協議会: インターネットを利用したコンタクトレンズ装用者のコンプライアンスに関するアンケート調査. 日本の眼科 81: 394-407, 2010.

In Vivo and In Vitro Laser Confocal Microscopy to Diagnose *Acanthamoeba* Keratitis

Atsushi Shiraishi, MD, PhD,*† Toshihiko Uno, MD, PhD,‡ Naoko Oka, MD,‡ Yuko Hara, MD,‡ Masahiko Yamaguchi, MD, PhD,‡ and Yuichi Ohashi, MD, PhD‡§

Purpose: To determine the effectiveness of laser confocal microscopy in identifying *Acanthamoeba* cysts and trophozoites in the cornea of patients with *Acanthamoeba* keratitis (AK) and to evaluate its effectiveness in following AK after treatment.

Methods: The corneas of 9 patients clinically diagnosed with AK were monitored periodically with the Heidelberg Retina Tomograph II-Rostock Cornea Module (HRT II-RCM) to examine for *Acanthamoeba* cysts and trophozoites during the clinical course.

Results: Seven of 9 patients had positive corneal smears, and 5 of 9 patients had positive laboratory cultures. HRT II-RCM demonstrated the presence of highly reflective polygonal shadows with lower reflective borders in the cornea of all patients. In 1 patient, a highly reflective pleomorphic shadow with small less-reflective areas was detected inside the cell. The former finding resembled the image of *Acanthamoeba* cysts in culture as observed by HRT II-RCM, and the latter observation with that of *Acanthamoeba* trophozoites in culture. After treatment, the number of highly reflective inflammatory cells decreased and the number and morphology of the corneal epithelial cells with highly reflective nuclei recovered to normal levels.

Conclusion: These results indicate that in vivo laser confocal microscopy can be a useful method to make a diagnosis and to follow patients with AK.

Key Words: *Acanthamoeba* keratitis, in vivo confocal microscopy, trophozoite

(*Cornea* 2010;29:861–865)

Acanthamoeba keratitis (AK) is an intractable sight-threatening infection of the cornea seen predominantly in contact lens (CL) wearers. The incidence of AK has been increasing in the past few decades with the widespread use of CLs.¹ The problems encountered in the patients with AK

include the difficulty in making a correct diagnosis at the early stage and the lack of effective medications. The early clinical signs of AK are subepithelial infiltrates, pseudodendritic keratitis, and radial neurokeratitis, but AK is often misdiagnosed as herpetic keratitis or fungal keratitis. This then leads to a delay in initiating appropriate treatments. In addition, the effectiveness of isolating *Acanthamoeba* in cultures has been reported to be between 30% and 60%,^{2,3} and it required 1–2 weeks to obtain the results from the laboratory. To make a proper or tentative diagnosis of AK as rapidly as possible, examination by confocal microscopy has been enthusiastically conducted in the past decade.^{4–8} However, it has been somewhat difficult to differentiate the *Acanthamoeba* cysts from other cell populations because of the resolution limitation. The Heidelberg Retina Tomograph II-Rostock Cornea Module (HRT II-RCM) is a relatively new confocal microscope with high resolution.

The purpose of this study was to determine whether the HRT II-RCM could be helpful in detecting *Acanthamoeba* cysts and trophozoites in patients with AK. In addition, we examined whether the HRT II-RCM can be helpful in following the clinical response to the treatment.

MATERIALS AND METHODS

An informed consent for the examination was obtained from all subjects, and this study was approved by Institutional Review Board of Ehime University. The procedures used conform to the tenets of the Declaration of Helsinki.

Nine patients clinically diagnosed with AK were examined with the HRT II-RCM (Heidelberg Engineering, Heidelberg, Germany). The HRT II-RCM was manipulated in the xyz axes to observe the entire cornea. After the confocal microscopic examination was completed, the corneal epithelium was scraped. A part of the sample was stained using Fungiflora Y staining (Biomate, Tokyo, Japan),⁹ and the rest of the sample was cultured on nonnutrient *Escherichia coli* agar. After AK was diagnosed, in vivo HRT II-RCM examinations were performed every week to assess the changes in the morphology of AK. In addition, to validate the in vivo findings, in vitro images of cultured *Acanthamoeba* cysts and trophozoites were obtained with the HRT II-RCM and compared with the images obtained in vivo.

RESULTS

The clinical profiles of the patients are summarized in Table 1. All 9 patients (5 men and 4 women; mean age: 32.0

Received for publication August 3, 2009; revision received October 20, 2009; accepted November 1, 2009.

From the Departments of *Ophthalmology and Regenerative Medicine; †Cell Growth and Tumor Regulation; ‡Ophthalmology; and §Infectious Diseases, Ehime University Graduate School of Medicine, Shitsukawa, Toon, Ehime, Japan.

Financial support: None.

Reprints: Atsushi Shiraishi, Department of Ophthalmology and Regenerative Medicine, Ehime University Graduate School of Medicine, Shitsukawa, Toon, Ehime 791-0295, Japan (e-mail: shiraia@m.ehime-u.ac.jp).

Copyright © 2010 by Lippincott Williams & Wilkins

TABLE 1. Clinical Details of Each Patient

Case Number	Age	Sex	BCVA Before Treatment (Wk)	CL	Duration Before Diagnosis (Wk)	Immunosuppressive Treatment Before Diagnosis	Culture	Histopathological Analysis
1	26	M	20/40	FRSCL	3	—	—	+
2	58	F	6/120	HCL	15	SS	+	+
3	25	F	20/25	FRSCL	2	—	—	—
4	22	M	20/50	FRSCL	4	TS	—	—
5	37	M	20/125	FRSCL	12	TS	—	+
6	24	M	20/40	FRSCL	3	—	+	+
7	25	F	20/40	FRSCL	3	TS	+	+
8	35	M	20/32	DSCL	3	—	+	+
9	18	F	20/600	FRSCL	2	TS	+	+

Case Number	HRT II-RCM Cyst	Clinical Signs					Treatment	BCVA After Treatment	Follow-up Periods (Mo)
		Dendriform Epitheliopathy	Subepithelial Infiltration	Radial Keratoneuritis	Ring Infiltrate				
1	+	+	+	+	—	CH, FC, MC	20/16	22	
2	+	—	—	—	+	CH, VC	20/20	12	
3	+	+	+	+	—	CH, VC	20/16	9	
4	+	+	+	+	—	CH, VC	20/16	7	
5	+	+	+	+	—	CH, VC	20/50	12	
6	+	—	+	+	—	CH, VC	20/16	8	
7	+	—	+	+	—	CH, VC	20/16	8	
8	+	+	+	+	—	CH, VC	20/20	8	
9	+	+	+	+	—	CH, VC	20/25	3	

BCVA, best-corrected visual acuity; CH, 0.05% chlorhexidine; DSCL, disposable soft CL; FC, 0.2% fluconazole; FRSCL, frequent replacement soft CL; HCL, hard CL; MC, 0.1% miconazole; SS, systemic steroid; TS, topical steroid; VC, 1% voriconazole.

years; and range 18–58 years) were CL wearers and presented with unilateral severe ocular pain and blurred vision. All patients were referred to us because of uncontrollable corneal infection. The average duration of the symptoms before visiting our hospital was 5–6 weeks with a range of 2–15 weeks. One patient was treated with 0.05% chlorhexidine, 0.2% fluconazole, and 0.1% miconazole eyedrops every hour and, 8 of 9 patients were treated with 0.05% chlorhexidine and 1% voriconazole eyedrops every hour. Corneal epithelial scraping was performed once or twice a week in all patients during the hospitalization at the Ehime University Hospital.

Slit-lamp examinations showed a ring-shaped corneal infiltrate in 1 case (Table 1), dendriform epitheliopathy in 6 of 9 cases, subepithelial infiltration in 8 of 9 cases, and radial keratoneuritis in 8 of 9 cases (Table 1). In all cases, the HRT II-RCM examinations of the cornea showed highly reflective polygonally shaped spots surrounded by a lower reflective area of 15–25 μm (Figs. 1C–E). These spots were assumed to be *Acanthamoeba* cysts by the morphological characteristics and the size.^{10,11} Images resembling *Acanthamoeba* trophozoites were detected in vivo by HRT II-RCM on the cornea of case 2 (Fig. 1H).

The corneal epithelia were scraped for histopathological and cultural analyses. Fungiflora Y staining of corneal scraping revealed *Acanthamoeba* organisms in 7 of 9 cases, and 5 of 9 cases were positive by culture.

To confirm that the images obtained by confocal microscopy in vivo were *Acanthamoeba* cysts or trophozoites, we examined the surface of the culture plate by HRT II-RCM

in which *Acanthamoeba* cysts and trophozoites isolated from case 2 were grown. The *Acanthamoeba* cysts on the culture plates are shown in Figure 1A. The HRT II-RCM images of the cysts can be seen as highly reflective polygonal spots surrounded by a lower reflective area (Fig. 1B). *Acanthamoeba* trophozoites were detected on the culture plates by light microscopy, and they could be seen to be moving. The trails where *E. coli* had disappeared by being phagocytized by the *Acanthamoeba*, trophozoites were also visible (Fig. 1F, winding arrow). The HRT II-RCM images of the *Acanthamoeba* trophozoites on the culture plates were of highly reflective pleomorphic organisms with acanthopodia (arrowhead) and a small low-reflective internal area (Fig. 1G). This low-reflective area probably is the nucleus, and the highly reflective area inside the nucleus is presumably the karyosome (Fig. 1G). Trails were also discovered next to the *Acanthamoeba* trophozoites (Fig. 1G, winding arrow). Similar images of *Acanthamoeba* cysts and trophozoites were detected in vivo.

HRT II-RCM examinations were performed during the clinical course in all cases. Representative slit-lamp photographs and HRT II-RCM images at the level of the basal cell layer and the upper stromal layer during the clinical course of case 4 are shown in Figure 2. Although both histopathological examinations and cultures were negative, this case was diagnosed with AK because of typical clinical signs of AK, namely, dendriform epitheliopathy, epithelial and subepithelial infiltrates, and radial keratoneuritis (Fig. 2A). A photograph of the *Acanthamoeba* cysts obtained by HRT II-RCM at the initial examination is shown in Figures 1E, 2E, and 2I. These

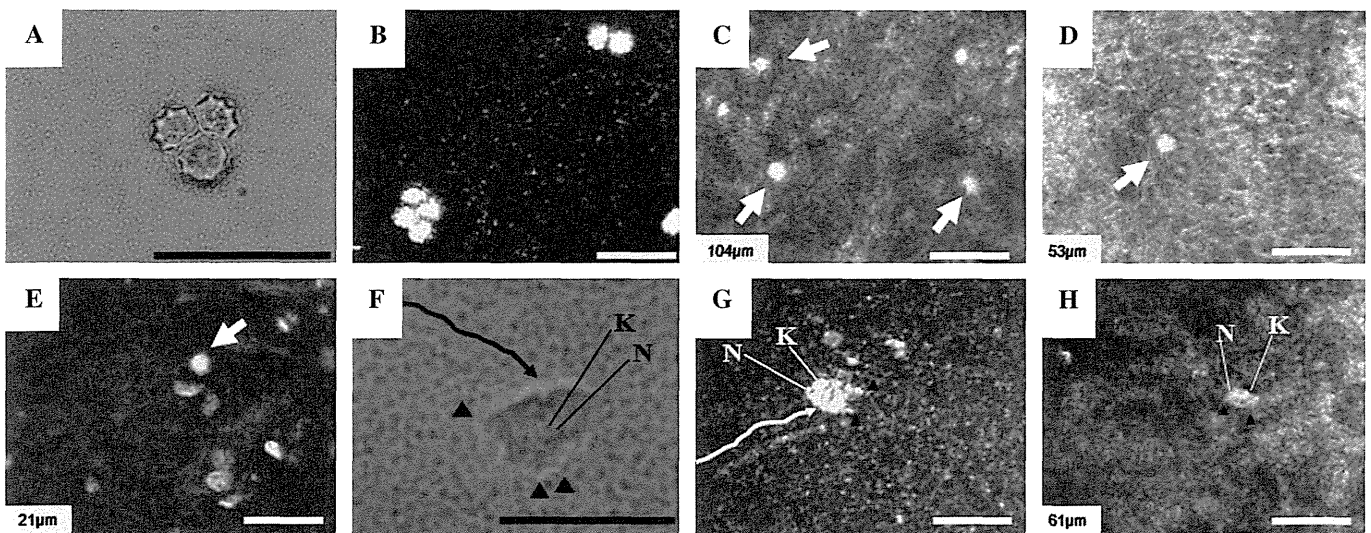


FIGURE 1. Images of *Acanthamoeba* cysts in vivo and in vitro. A, Light microscopic observation of cultured *Acanthamoeba* cysts isolated from case 2. B, HRT II-RCM image of cultured *Acanthamoeba* cysts showing highly reflective polygonally shaped cysts surrounded by a lower reflective area. In vivo HRT II-RCM images of *Acanthamoeba* cysts (arrows) of case 2 (C), case 3 (D), and case 4 (E). F, Light microscopic observation of cultured *Acanthamoeba* trophozoites isolated from case 2 showing acanthopodia (arrowhead), nucleus (N), karyosome (K), and trails (winding arrow). G, HRT II-RCM image of cultured *Acanthamoeba* trophozoites showing highly reflective pleomorphic form with acanthopodia (arrowhead) and small low-reflective internal area representing the nucleus (N). The highly reflective area inside the nucleus was probably the karyosome (K). Trails of the trophozoites can also be seen (winding arrow). H, In vivo HRT II-RCM images of *Acanthamoeba* trophozoite in case 2 showing acanthopodia (arrowhead), nucleus (N), and karyosome (K). The depth at which each of the HRT II-RCM images of C, D, E, and H were taken is indicated on the bottom left corner. All bars = 50 μm .

HRT II-RCM images show many highly reflective inflammatory cells in the epithelium and stroma (Figs. 2E, I). Two weeks after the beginning of treatment, the dendriform epitheliopathy was not detected and the epithelial and subepithelial opacities and radial keratoneuritis were reduced in slit-lamp examinations (Fig. 2B).

These findings indicated a considerable improvement in the inflammatory response. The HRT II-RCM images also showed that the number of inflammatory cells was reduced, although many inflammatory cells and Langerhans cells were still present. In addition, *Acanthamoeba* cysts were still detected in the basal cell layer of the epithelium (Fig. 2F). The density of basal epithelial cells was reduced, and the cells had highly reflected nuclei (Fig. 2F). In the stroma, the number of inflammatory cells had decreased, but many inflammatory cells were still present (Fig. 2J). Therefore, the treatment regime was kept for 2 more weeks. Four weeks after the initial treatment, radial keratoneuritis and dendriform epitheliopathy were not observed but subepithelial opacities were still present by slit-lamp examination (Fig. 2C). The HRT II-RCM examination showed that the number of inflammatory cells and Langerhans cells had decreased and the normal reflective pattern of the basal epithelial cells had returned (Fig. 2G). As a result of the improvements, the frequency of eyedrops was reduced to 6 times per day and the patient was discharged. The patient returned 4 weeks later, slit-lamp and HRT II-RCM examinations showed fewer inflammatory and Langerhans cells, and the density and reflection of the basal epithelial cells were normal (Fig. 2H).

In the stroma, a decrease in the number of inflammatory cells was detected during the clinical course; after 4 weeks, highly reflective nuclei were not observed inside the keratocytes (Figs. 2I–K). Eight weeks after beginning the treatment, nonuniform keratocytes without highly reflective nuclei were detected (Fig. 2L). The degree and duration of inflammation in each case varied, but the overall findings were consistent in all cases.

DISCUSSION

In vivo confocal microscopy was recently introduced, and it was found to overcome the clinical and microbiological difficulties in diagnosing AK.^{4–6,12,13} Parmar et al³ reported that *Acanthamoeba* cysts/trophozoites were identified by in vivo confocal microscopy in 54 of 63 cases of clinically diagnosed AK in a 10-year study. We used the newly developed confocal microscope HRT II-RCM to search for *Acanthamoeba* cysts and trophozoites in eyes diagnosed with AK. Our results showed that it was possible to detect *Acanthamoeba* cysts in all cases, including cases 3 and 4 in which both light microscopy and cultures of corneal scrapings were negative for *Acanthamoebae*.

We also detected *Acanthamoeba* trophozoites in vivo in 1 patient. In addition, we were able to detect *Acanthamoeba* cysts and trophozoites on the culture plates by confocal microscopy in this patient. The in vitro HRT II-RCM images were very helpful in identifying the images of *Acanthamoeba* cysts obtained by in vivo confocal microscopic examination. The polygonally shaped *Acanthamoeba* cysts were clearly

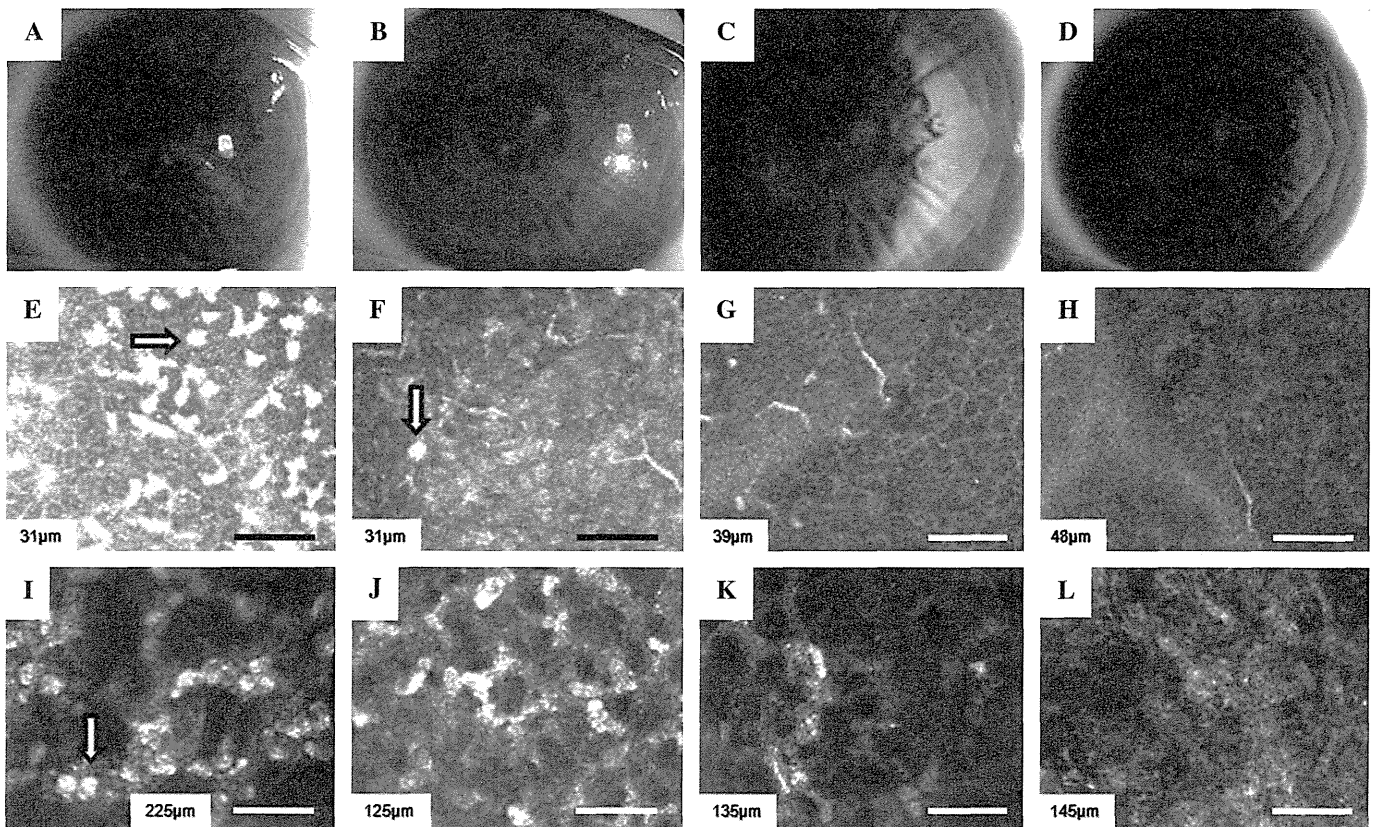


FIGURE 2. Slit-lamp photographs (A–D) and HRT II-RCM images of basal cell layer of corneal epithelium (E–H) and upper layer of stroma (I–L) during clinical course in case 4 (A, E, and I: first examination; B, F, and J: 2 weeks after treatment; C, G, and K: 4 weeks after treatment; D, H, and L: 8 weeks after treatment). E–H, At the first examination, highly reflective numerous inflammatory cells and *Acanthamoeba* cysts (arrow) can be seen in the epithelium. At 2 weeks after treatment, number was decreased but still many inflammatory cells and Langerhans cells can be seen and *Acanthamoeba* cysts (arrow) were still detected. Basal epithelial cells can be seen at lower density with highly reflective nuclei. At 4 weeks, the number of inflammatory cells and Langerhans cells was reduced. At 8 weeks, fewer inflammatory cells and Langerhans cells were present and basal epithelial cells were detected at normal density and reflection. I–L, At the first examination, many highly reflective inflammatory cells and *Acanthamoeba* cysts (arrow) can be seen in the stroma, and the number of inflammatory cells is reduced during the clinical course. After 4 weeks, highly reflective nuclei were not observed inside the keratocytes, and 8 weeks after treatment, nonuniform keratocytes without highly reflective nuclei can be seen. The depth at which all of the HRT II-RCM images were taken is indicated on the bottom left corner. All bars = 50 μm.

detected by HRT II-RCM in vitro (Fig. 1B) and appeared very similar to the images obtained in vivo (Figs. 1C–E). All *Acanthamoeba* cysts detected in vivo and in vitro were polygonally shaped and were surrounded by a lower reflective area of 15–25 μm. These morphological findings are in good agreement with the microbiological findings.^{10,11}

We also found that the HRT II-RCM images of *Acanthamoeba* trophozoites on the culture plates had shown highly reflective pleomorphic forms with acanthopodia. It was also possible to differentiate the nuclei and karyosomes inside the *Acanthamoeba* trophozoites not only in vitro but also in vivo in the HRT II-RCM images (Figs. 1G, H). Many investigators have presented images and descriptions of *Acanthamoeba* cysts obtained by in vivo confocal microscopy; however, they were not able to demonstrate either the polygonally shaped cysts or the pleomorphic forms of the trophozoites because of the limited resolution. HRT II-RCM images of the *Acanthamoeba* cysts have been published, and the improved resolution has made it possible to obtain high-

resolution images of *Acanthamoeba* cysts.¹³ However, the HRT II-RCM images were still in black and white. Thus, it was still difficult to differentiate *Acanthamoeba* cysts from inflammatory cells because their sizes were similar and they both were highly reflective. In addition, it was not easy to find *Acanthamoeba* cysts and trophozoites in the corneal scrapings because *Acanthamoeba* cysts and trophozoites may not be abundant in the corneal epithelium of eyes with AK. Thus, a better understanding of the morphological characteristics is necessary to recognize *Acanthamoeba* cyst and trophozoites by in vivo confocal microscopy.

The HRT II-RCM is a noninvasive and repeatable diagnostic tool that can be used to follow the clinical course and morphological changes of AK (Fig. 2). However, it is still difficult to state that there is a complete absence of *Acanthamoeba* cysts during the clinical course because of the small field of view and low density of cysts. HRT II-RCM examinations can determine the density of inflammatory cells and Langerhans cells and the morphology of epithelial cells and

keratocytes. Thus, it is possible to determine the effectiveness of the treatment at any time. In fact, we did change the treatment in some of the cases because the HRT II-RCM and the slit-lamp images, and the changes led to successful treatments in all 9 cases of AK (Table 1).

In conclusion, the newly developed in vivo confocal microscope, HRT II-RCM, with improved resolution can be used to obtain high-resolution images of *Acanthamoeba* cysts and trophozoites in vivo. These images resembled very closely the images observed by the HRT II-RCM of *Acanthamoeba* cysts and trophozoites in culture. These findings with the HRT II-RCM will help in the diagnosis of AK, and the noninvasive repeated assessments should make this instrument a powerful tool for following the clinical course of AK.

REFERENCES

1. Thebpatiphat N, Hammersmith KM, Rocha FN, et al. *Acanthamoeba* keratitis: a parasite on the rise. *Cornea*. 2007;26:701–706.
2. Bacon AS, Frazer DG, Dart JK, et al. A review of 72 consecutive cases of *Acanthamoeba* keratitis, 1984–1992. *Eye*. 1993;7:719–725.
3. Parmar DN, Awwad ST, Petroll WM, et al. Tandem scanning confocal corneal microscopy in the diagnosis of suspected *Acanthamoeba* keratitis. *Ophthalmology*. 2006;113:538–547.
4. Auran JD, Starr MB, Koester CJ, et al. In vivo scanning slit confocal microscopy of *Acanthamoeba* keratitis. A case report. *Cornea*. 1994;13:183–185.
5. Cavanagh HD, Petroll WM, Alizadeh H, et al. Clinical and diagnostic use of in vivo confocal microscopy in patients with corneal disease. *Ophthalmology*. 1993;100:1444–1454.
6. Winchester K, Mathers WD, Sutphin JE, et al. Diagnosis of *Acanthamoeba* keratitis in vivo with confocal microscopy. *Cornea*. 1995;14:10–17.
7. Kaufman SC, Musch DC, Belin MW, et al. Confocal microscopy: a report by the American Academy of Ophthalmology. *Ophthalmology*. 2004;111:396–406.
8. Mathers WD, Nelson SE, Lane JL, et al. Confirmation of confocal microscopy diagnosis of *Acanthamoeba* keratitis using polymerase chain reaction analysis. *Arch Ophthalmol*. 2000;118:178–183.
9. Inoue T, Asari S, Tahara K, et al. Utility of Fungiflora Y stain in rapid diagnosis of *Acanthamoeba* keratitis. *Br J Ophthalmol*. 1999;83:632–633.
10. Clarke DW, Niederkorn JY. The pathophysiology of *Acanthamoeba* keratitis. *Trends Parasitol*. 2006;22:175–180.
11. Khan NA. Pathogenesis of *Acanthamoeba* infections. *Microb Pathog*. 2003;34:277–285.
12. Pfister DR, Cameron JD, Krachmer JH, et al. Confocal microscopy findings of *Acanthamoeba* keratitis. *Am J Ophthalmol*. 1996;121:119–128.
13. Kobayashi A, Ishibashi Y, Oikawa Y, et al. In vivo and ex vivo laser confocal microscopy findings in patients with early-stage *Acanthamoeba* keratitis. *Cornea*. 2008;27:439–445.

Effectiveness of In Vivo Confocal Microscopy in Detecting Filamentous Fungi During Clinical Course of Fungal Keratitis

Yuki Takezawa, MD,* Atsushi Shiraishi, MD, PhD,†‡ Eriko Noda, MD,* Yuko Hara, MD,* Masahiko Yamaguchi, MD, PhD,* Toshihiko Uno, MD, PhD,* and Yuichi Ohashi, MD, PhD*§

Purpose: To determine the effectiveness of laser confocal microscopy in detecting filamentous fungi in the cornea of patients with fungal keratitis (FK) and in evaluating the effectiveness of the treatment.

Methods: The corneas of 6 patients clinically diagnosed with FK were examined with the Heidelberg Retina Tomograph II-Rostock Cornea Module (HRT II-RCM). Three of these patients were also monitored periodically with the HRT II-RCM after antifungal treatment.

Results: The HRT II-RCM examination showed interlocking and branching, white, septated, hyphae-like lines in the cornea of all patients. All 6 patients had positive corneal smears and/or laboratory cultures. Three patients were monitored with HRT II-RCM after antifungal treatment. One patient, whose initial smear was negative, was diagnosed by HRT II-RCM before the positive culture results. In another case, the epithelial regeneration was impaired even 3 weeks after the initial treatment and HRT II-RCM revealed a mass of hyphae in the corneal ulcerated lesion. These findings indicated the necessity of surgical debridement. After the surgical debridement, the corneal epithelial defect was healed. HRT II-RCM was able to detect the morphological changes of hyphae after antifungal treatment and helped in the treatment modifications during the clinical course in all 3 patients.

Conclusions: These results indicate that HRT II-RCM can be used to diagnose FK and to monitor the effect of therapy on FK.

Key Words: fungal infection, keratitis, in vivo confocal microscopy, cornea

(*Cornea* 2010;29:1346–1352)

Received for publication October 6, 2009; revision received November 19, 2009; accepted November 26, 2009.

From the *Departments of Ophthalmology; †Ophthalmology and Regenerative Medicine; ‡Cell Growth and Tumor Regulation; and §Infectious Diseases, Ehime University Graduate School of Medicine, Shitsukawa, Toon, Ehime, Japan.

Financial support: None.

Reprints: Atsushi Shiraishi, Department of Ophthalmology and Regenerative Medicine, Ehime University Graduate School of Medicine, Shitsukawa, Toon, Ehime 791-0295, Japan (e-mail: shiraia@m.ehime-u.ac.jp).

Copyright © 2010 by Lippincott Williams & Wilkins

Fungal keratitis (FK) is a vision-threatening corneal disease and is still a difficult disease to diagnose and treat. The most common microorganisms that cause FK are *Fusarium solani* and other *Fusarium* sp. and *Aspergillus* sp.^{1–3} The infections are usually caused by a prior ocular injury with organic contamination. A correct diagnosis and the prevention of a decrease of visual acuity are challenging clinical problems of eyes with FK.

Although the classical clinical signs of FK, including dry white cotton-wool infiltrates with feathery edges, are helpful for a diagnosis, these signs may not be present in all cases. Corneal smears and cultures are the standard diagnostic methods for infectious keratitis including fungal infections. However, it takes several days to weeks to obtain the results of fungal cultures, and the results could be negative in some cases such as those with deep infiltrates.

Confocal microscopy has been used to try to make a diagnosis of FK as early as possible, and the results to date are good.^{4–7} The Heidelberg Retina Tomograph II-Rostock Cornea Module (HRT II-RCM) is a relatively new confocal microscope with high resolution, and a growing number of studies has reported on its effectiveness in investigating infectious corneal diseases, for example, *Acanthamoeba* keratitis and FK.^{8–11}

At present, slit-lamp biomicroscopy is used to diagnose FK and also to follow the clinical course after treatment. However, it is difficult to judge whether the treatment is effective or when the antifungal therapy could be tapered or terminated by only a slit-lamp examination.

One of the advantages of confocal microscopy is that it is noninvasive, and it can be repeatedly performed to follow the corneal disease during its clinical course. It can be used along with slit-lamp examinations. The purpose of this study was to determine whether the HRT II-RCM could help in detecting fungal filaments in patients with FK and whether it can be used to follow the clinical course after antifungal treatment.

MATERIALS AND METHODS

An informed consent for the examination was obtained from all subjects, and this study was approved by Institutional Review Board of Ehime University. The procedures used conformed to the tenets of the Declaration of Helsinki.¹²

Six patients clinically suspected of having FK were examined with the HRT II-RCM (Heidelberg Engineering, Heidelberg, Germany). The HRT II-RCM was moved in the x , y , and z axes to observe the entire cornea. After the confocal microscopic examination, patients underwent laboratory investigations including a direct microscopic evaluation of corneal smears and cultures of corneal scrapings. After a FK was diagnosed, in vivo HRT II-RCM examinations were performed every week to assess the changes in the morphology of the FK in 3 of the 6 patients.

RESULTS

The clinical profiles of the patients are summarized in Table 1. All 6 patients (3 men and 3 women; mean age: 62.7 years; range: 33–81 years) were referred to us because of uncontrollable corneal infections.

Slit-lamp examinations showed focal stromal infiltrates in 5 cases and infiltrates into the entire cornea in 1 case (case 4) (Table 1). In all cases, the HRT II-RCM examinations of the cornea showed a mass of highly reflective, interlocking and branching, white lines in the area of the infiltrates (Figs. 1–4). These hyphae-like structures were about 3–5 μm wide and hundreds of micrometer long. The filaments were assumed to be filamentous fungal hyphae by the morphological characteristics and size. The corneal smears revealed filamentous fungi in 5 of 6 cases, and 5 of 6 cases were positive by culture (Table 1).

HRT II-RCM examinations were performed after the antifungal treatment in 3 cases (case 1–3). Unfortunately, we were not able to perform follow-up examinations by HRT II-RCM on the other 3 cases because 1 case had a therapeutic penetrating keratoplasty (case 4) and 2 cases were followed in other hospitals after our diagnosis of FK (case 5 and 6).

We present the findings in the 3 cases that were followed by HRT II-RCM.

Case 1

The patient was a 33-year-old man who was a soft contact lens wearer and visited a private ophthalmological clinic because of unilateral irritation and blurred vision on October 31, 2008. He was referred to the Ehime University

Hospital on the same day. On the initial examination, his best-corrected visual acuity was 20/16 OD and 20/1000 OS. Slit-lamp examination of the left eye revealed a grayish stromal infiltrate with indistinct margins and stromal edema. The corneal smears were negative. We diagnosed the patient with bacterial keratitis and treated him with antibacterial eyedrops. Four days later, the corneal infiltration worsened (Fig. 1A) and he was examined with the HRT II-RCM. The HRT II-RCM examination showed highly reflective, hyphae-like, interlocking and branching white lines in the area of the infiltrates (Fig. 1B). Therefore, we suspected FK and changed the therapy to antifungal drugs on November 4, 2008. The laboratory culture results were returned 4 days later with the presence of *Penicillium* sp. on November 8, 2008. The corneal infiltrate and edema was reduced at 7 days after beginning the antifungal treatment (Fig. 1C). The HRT II-RCM images at 7 days after antifungal treatment showed a decrease in the density of the hyphae (Fig. 1D), which indicated that the treatment was effective. Seventeen days after antifungal treatment, slit-lamp microscopy showed a resolution of the infiltrates (Fig. 1E) and HRT II-RCM images showed no hyphae (Fig. 1F). The treatment was tapered thereafter, and the patient has had no recurrence.

Case 2

The patient was an 80-year-old man who felt dust particles blow into his right eye during farm work on January 6, 2007. He visited a private ophthalmological clinic on January 9, 2007 because his right eye felt irritated and his vision was blurred. He was referred to the Ehime University Hospital on January 11, 2007 because of a severe corneal infection.

On the initial examination, his best-corrected visual acuity was 20/1000 OD and 20/16 OS. Slit-lamp examination of the right eye revealed a white cotton-wool stromal infiltrate with feathery edges (Fig. 2A). Examination of the cornea with the HRT II-RCM showed a mass of interlocking and branching white lines in the area of the infiltrate (Fig. 2B). The corneal smears showed filamentous fungi (Fig. 2C), and antifungal treatment was begun. One week later, slit-lamp examination showed very little change in the corneal stromal infiltrate (Fig. 2D). However, the HRT II-RCM images showed a distinct

TABLE 1. Clinical Details of Each Patient

Case Number	Age	Sex	BCVA Before Treatment	Risk Factor	Diagnosis			Organism	Treatment	BCVA After Treatment
					Smear	Culture	HRT II-RCM			
1	33	M	20/1000	FRSCL	(-)	(+)	(+)	<i>Penicillium</i> sp.	VC, PM, GFLX	20/20
2	60	M	20/1000	DM, trauma with vegetative	(+)	(-)	(+)	Filamentous fungi	MC, VC, PM, GFLX	20/20
3	81	F	20/25	Trauma with vegetative	(+)	(+)	(+)	<i>Fusarium</i> sp.	VC, PM, GFLX, SD	20/25
4	62	F	HM	Trauma with vegetative	(+)	(+)	(+)	<i>Fusarium</i> sp.	VC, PM, GFLX, PKP (2 times)	20/25
5	81	F	20/2000	Trauma with vegetative	(+)	(+)	(+)	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	VC, PM, LVFX	20/25
6	59	M	20/300	RA, immunosuppressive drugs	(+)	(+)	(+)	<i>Penicillium</i> sp. <i>Fusarium</i> sp.	VC, PM, GFLX	20/50

BCVA, best-corrected visual acuity; DM, diabetes mellitus; FC, 0.2% fluconazole; FRSCL, frequent replacement soft contact lens; GFLX, gatifloxacin; HM, hand motions; LVFX, levofloxacin; MC, 0.1% miconazole; PKP, penetrating keratoplasty; PM, pimaricin eye ointment; RA, rheumatoid arthritis; SD, surgical debridement; VC, 1% voriconazole.

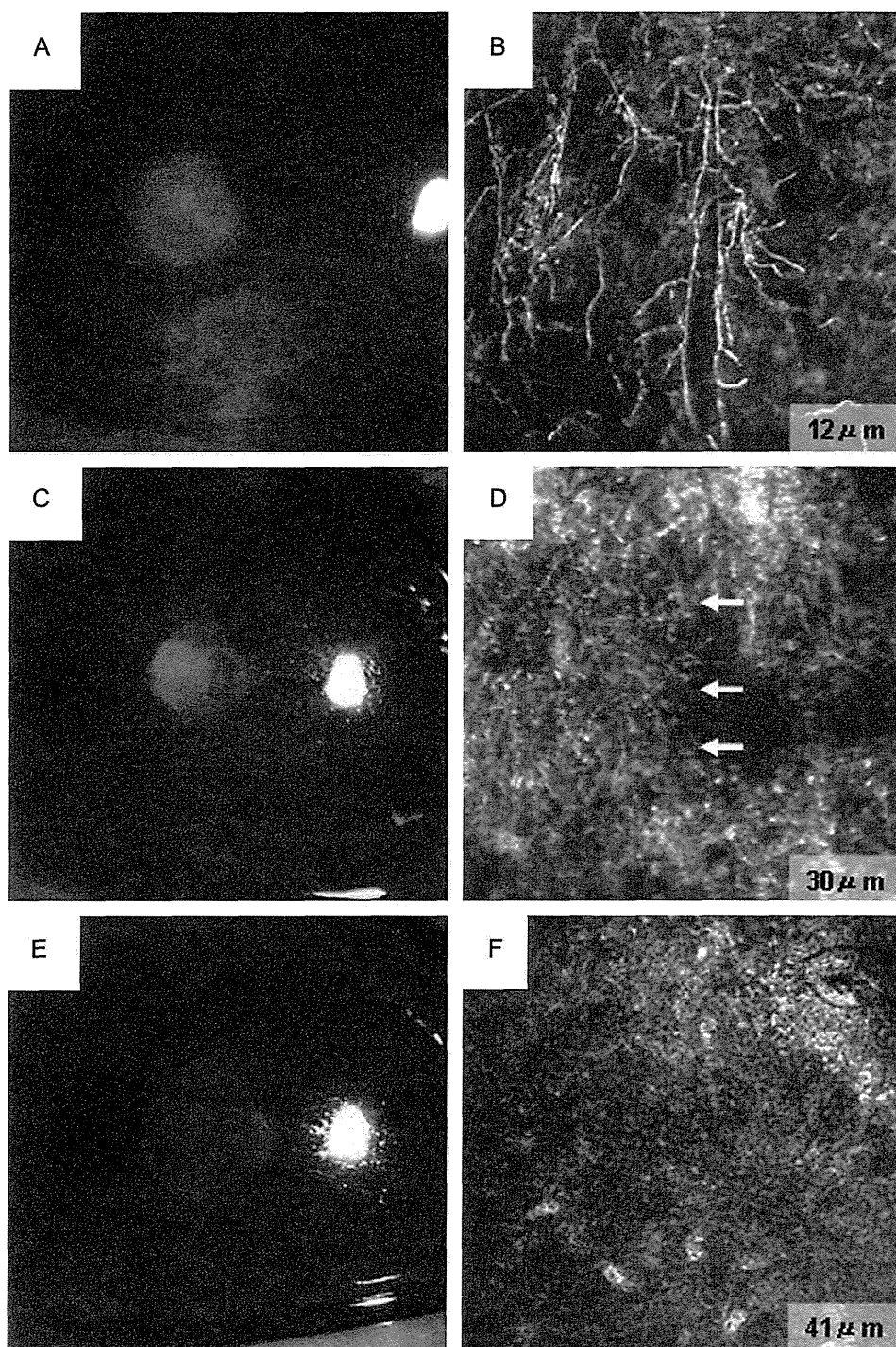


FIGURE 1. Observations of the clinical course of FK in case 1. A, Slit-lamp photograph of the left eye showing a grayish stromal infiltrate with indistinct margins and stromal edema. B, HRT II-RCM image of the area of the infiltrates showing highly reflective, hyphae-like, interlocking and branching, white lines. C, Slit-lamp photograph 7 days after antifungal treatment showing a reduction of the corneal infiltrate and edema. D, HRT II-RCM image of the area of the infiltrates at 7 days after antifungal treatment showing a decrease in the density of hyphae (arrows). E, Slit-lamp photograph 7 days after antifungal treatment showing resolved corneal infiltrate. F, HRT II-RCM image of the area of the infiltrates at 17 days after initial treatment showing no hyphae. The depth at which all of the HRT II-RCM images were taken is indicated on the bottom right corner.

decrease in the density of the hyphae indicating that the antifungal treatment was effective (Fig. 2E). Although the improvement of corneal infiltrate was slow, the HRT II-RCM images recorded 2 weeks after the beginning of the treatment revealed a further decrease in the density of the hyphae (Fig. 2F). HRT II-RCM examinations were performed periodically, and the treatment was tapered after the disappearance of the hyphae.

Case 3

The patient was an 81-year-old woman who had been diagnosed with bacterial keratitis or herpetic keratitis in her right eye and was treated for these conditions at another hospital for 2 months. She was referred to the Ehime University Hospital on June 9, 2009 because of uncontrollable corneal infection.

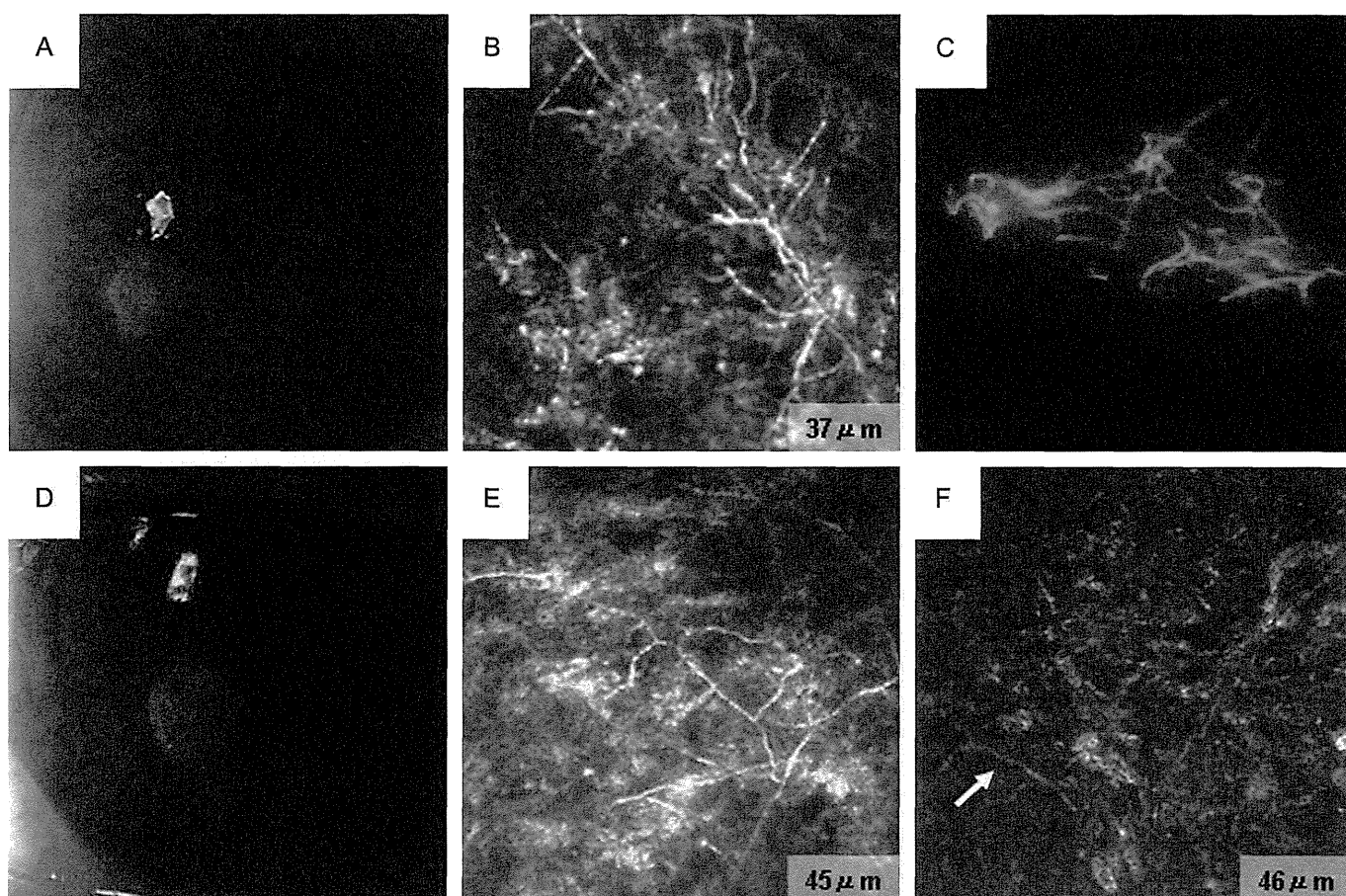


FIGURE 2. Observations of the clinical course of FK in case 2. A, Slit-lamp photograph of the right eye showing a white cotton-wool stromal infiltrate with feathery edges. B, HRT II-RCM image of the area of the infiltrates showing highly reflective, hyphae-like, interlocking and branching, white lines. C, Light microscopic observation of smear stained with Fungi flora Y showing filamentous fungi. D, Slit-lamp photograph of the right eye at 7 days after initial treatment still showing a white cotton-wool stromal infiltrate with feathery edges with little change from initial examination. E, HRT II-RCM image of the area of the infiltrates at 7 days after the initial antifungal treatment showing a decrease in the density of the hyphae. F, HRT II-RCM image of the area of the infiltrates at 14 days after the initial treatment showing a decrease in the density of hyphae (arrow). The depth at which all of the HRT II-RCM images were taken is indicated on the bottom right corner.

On the initial examination, her best-corrected visual acuity was 20/25 OD and 20/16 OS. Slit-lamp examination of the right eye revealed a white stromal infiltrate with a dry texture and feathery edges (Fig. 3A). Examination of the cornea with the HRT II-RCM showed a mass of interlocking and branching white lines in the area of the infiltrate (Fig. 3B). The corneal smears showed filamentous fungi (Fig. 3C), and antifungal treatment was started. HRT II-RCM examinations were performed weekly thereafter. Although there was a decrease in the density of hyphae at the borders of the infiltrate, the regeneration of the epithelium was delayed even 3 weeks after beginning the treatment (Fig. 3D). HRT II-RCM examinations of the corneal ulcerated lesion revealed many hyphae 3 weeks after beginning the treatment (Fig. 3E). Therefore, a surgical debridement was performed at 3 and 5 weeks after the initial treatment. The debrided tissues were examined histochemically, and many hyphae were seen in the necrotic tissues (Fig. 3F). After the surgical debridement, the

regeneration of the epithelium was accelerated, and at 7 weeks after the initial treatment, the corneal epithelial defect was healed and hyphae were not detected by HRT II-RCM examinations.

DISCUSSION

In vivo confocal microscopy was recently introduced and found to overcome the clinical and microbiological difficulties in diagnosing FK.^{4-8,13} We used a new confocal microscope, HRT II-RCM, to search for hyphae in 6 eyes diagnosed with FK. Our examinations showed hyphae in all 6 cases, and the presence of fungi was confirmed by positive corneal smears in 5 of the 6 cases and the presence of hyphae in cultures of the cornea in 5 of the 6 cases. The high rate of detection of hyphae by HRT II-RCM is comparable to that reported by Kanavi et al⁷ who reported that hyphae-like structures were identified by in vivo confocal microscopy

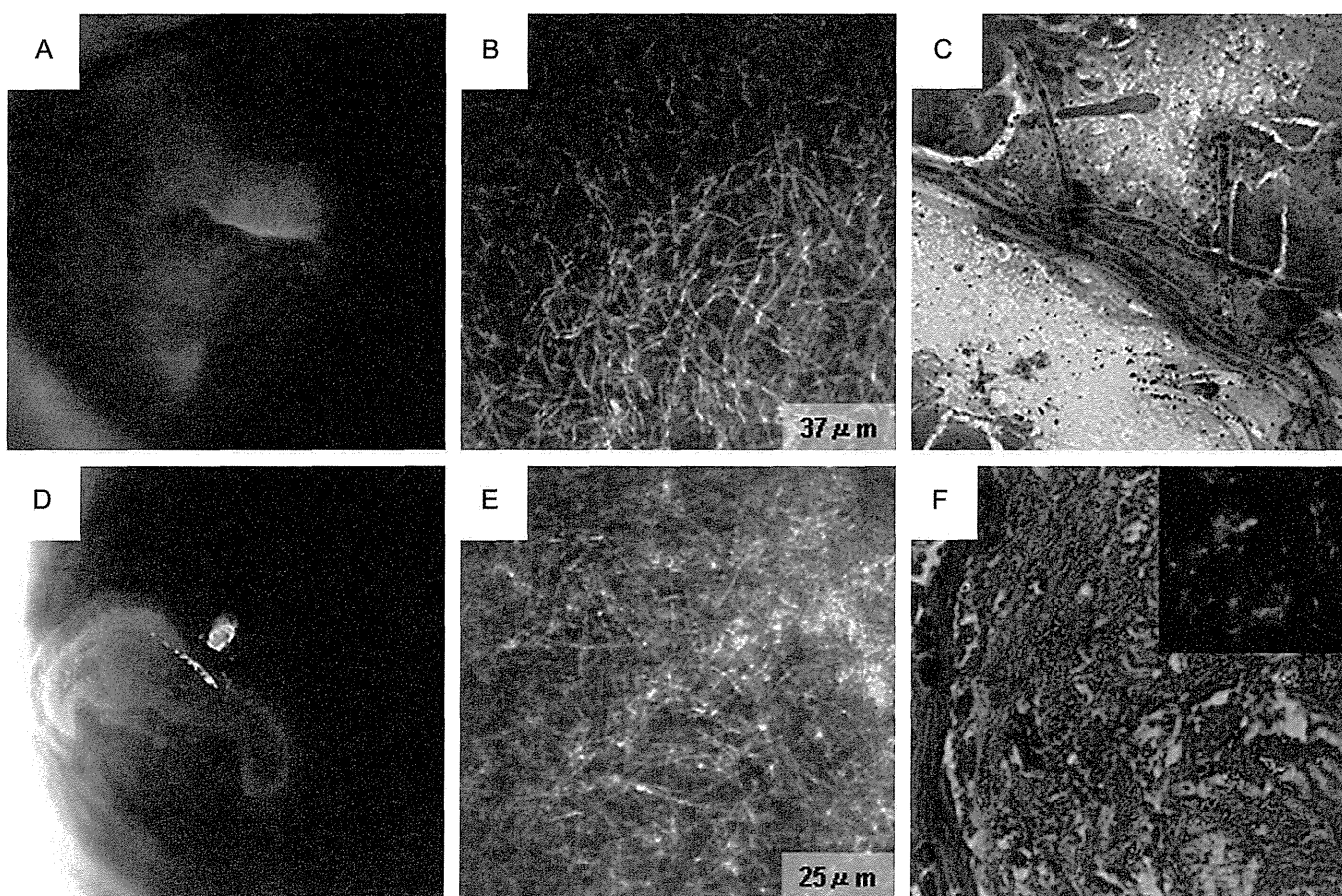


FIGURE 3. Observations of the clinical course of FK in case 3. A, Slit-lamp photograph of the right eye showing a white stromal infiltrate with a dry texture and feathery edges. B, HRT II-RCM image of the area of the infiltrates showing highly reflective, hyphae-like, interlocking and branching, white lines. C, Light microscopic observation of smear with Giemsa staining showing filamentous fungi. D, Slit-lamp photograph of the right eye showing a large epithelial defect with deposited tissues at ulcerated lesion at 3 weeks after the initial treatment. E, HRT II-RCM image of the corneal ulcerated lesion at 3 weeks after the initial treatment showing a mass of hyphae. F, Histochemical examination of debrided tissues showing many hyphae in the necrotic tissues. The inserted photograph in right above shows filamentous fungi stained with Fungi flora Y. The depth at which all of the HRT II-RCM images were taken is indicated on the bottom right corner.

(confoscan 3.0; Nidek Technology) in 27 of 28 cases of clinically diagnosed FK. The HRT II-RCM images obtained in our study were morphologically similar to the HRT II-RCM images of *F. solani* and *Aspergillus fumigatus*.⁸ These findings demonstrated the usefulness of HRT II-RCM for early diagnosis of FK.⁸ Our HRT II-RCM examinations detected hyphae in the case 1, which had been treated as bacterial keratitis because the corneal smear was negative for fungi. Disorganized collagen bundles can be seen in the corneal stroma during the healing stage of keratitis. Although the collagen bundles were also detected as highly reflective lines, they did not appear to be interlocking or branching. Thus, the filamentous fungal hyphae can be easily differentiated from collagen bundles by the morphological characteristics.

In addition to diagnosing FK, we found that HRT II-RCM was valuable in following the clinical course and documenting the morphological changes of the FK after antifungal treatments.^{13,14} Earlier models of the confocal microscope, for example, Confoscan 2.0 (Nidek) used by Shi

et al and the Confoscan 3.0 (Nidek) used by Miller et al, were able to detect hyphae, but the images of the hyphae after treatment were not clear because of the lower resolution of these models. On the other hand, the HRT II-RCM can clearly detect the changes of hyphae during the clinical resolution of FK as shown in this study. Thus, HRT II-RCM examination is more reliable for showing that such hyphae are decreasing in density.

FK often responds slowly over a period of weeks to antifungal therapy; therefore, the changes in the clinical signs may not be detected by slit-lamp examinations.^{2,3} In fact, little change was found by slit-lamp microscopy 1 week after initial treatment in case 2, but the HRT II-RCM images clearly showed a decrease in the density of hyphae. Thus, the HRT II-RCM images were helpful in judging the effectiveness of the treatment, and the treatment regimen was continued thereafter.

FK occasionally requires surgical debridement to remove the infectious agents, necrotic tissue, and other debris that may hinder the regeneration of the epithelium.¹⁻³