

B

	Range	MIC ₈₀	MIC ₉₀
MFLX	≤0.06~128	32	32
GFLX	≤0.06~64	16	32
TFLX	≤0.06~16<	8	16
LVFX	≤0.06~128<	64	128
NFLX	0.5~64<	32	64<
MCR	≤0.06~128<	1	128
CMX	≤0.06~2	0.25	0.25
EM	≤0.06~128<	128	128<
CP	≤0.06~64	32	64
VCM	0.125~128<	0.5	1

図 6 *Corynebacterium* spp. 87 株に対する累積発育阻止率曲線(A)と MIC(B).

◆◆◆: MFLX (モキシフロキサシン), ■: GFLX (ガチフロキサシン), ▲: TFLX (トスフロキサシン), ▲: LVFX (レボフロキサシン), * : NFLX (ノルフロキサシン), ●: MCR (マイクロノマイシン硫酸塩), □: CMX (セフメノキシム塩酸塩), ○: EM (エリスロマイシン), ◆: CP (クロラムフェニコール), ◆◆◆: VCM (バンコマイシン).

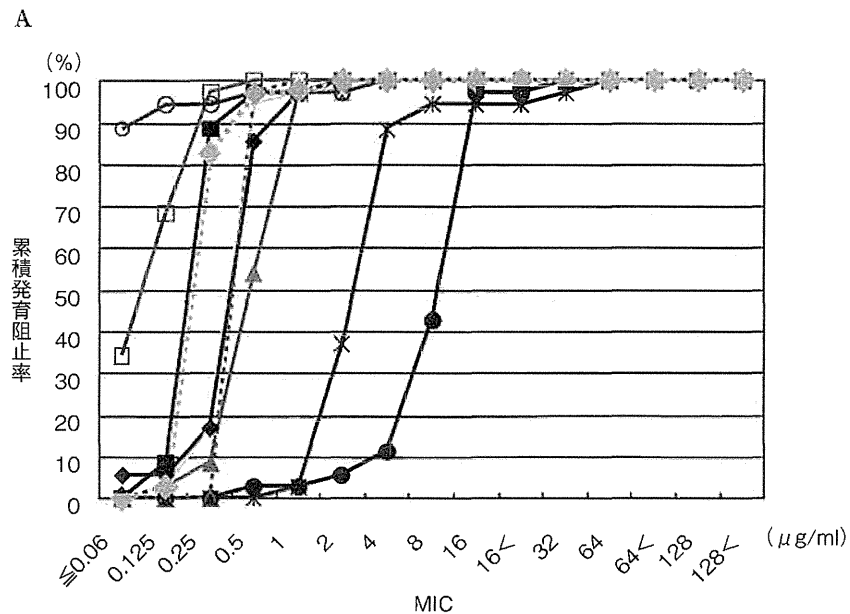
MIC: minimum inhibitory concentration.

あったが、フルオロキノロン系、VCM、リファンピシンには耐性はなかったと報告している。

インフルエンザ菌に関してはフルオロキノロン系薬剤がきわめて高い感受性を示した(図 5)。これまでもフルオロキノロン系薬剤のインフルエンザ菌に対する MIC₉₀ は 0.06 μg/ml 以下と報告されている¹¹⁾。インフルエンザ菌は近年、各種 β-ラクタム系抗菌薬に対する耐性化が問題となっている³⁾が、フルオロキノロン系薬剤にはほとんど耐性傾向はみられていない。

アクネ菌では EM が最も良好な感受性を示し、CMX が次であった。他方 MCR は、嫌気性菌がアミノ配糖体薬に耐性であるとの原則どおり、他剤より明らかに低感受性を示した。全般にフルオロキノロン系薬剤は EM、

CMX に次ぐ良好な感受性がみられた(図 7)。また Smith ら¹³⁾によれば、最近の β-ラクタム系薬剤とフルオロキノロン系薬剤などについて、眼科分離株に対する感受性を検討しているが、ともに良好な感受性であると報告している。今回調べた薬剤中では EM が最も感受性が良好であったが、他領域ではアクネ菌に対して何が高感受性であろうか。皮膚科からの報告¹⁴⁾では EM、アンピシリン、CLDM、ミノサイクリン(MINO)、ナジフロキサシン、セファレキシン、ドキシサクリン、オフロキサシン、TC について比較した結果、EM が感受性で最も優れ、MINO が耐性化率 0 で優れていたとしている。したがって、アクネ菌の治療では EM が第一選択剤としてよいと思われる。



B

	Range	MIC ₅₀	MIC ₉₀
MFLX	0.125~2	0.25	0.5
GFLX	0.125~2	0.25	0.5
TFLX	0.125~4	1	1
LVFX	0.125~4	0.5	0.5
NFLX	1~64	4	8
MCR	0.5~32	16	16
CMX	≤0.06~0.5	0.25	0.25
EM	≤0.06~4	≤0.06	0.125
CP	≤0.06~2	0.5	1
VCM	0.5~1	0.5	0.5

図 7 *Propionibacterium acnes* 35 株に対する累積発育阻止率曲線(A)と MIC(B).

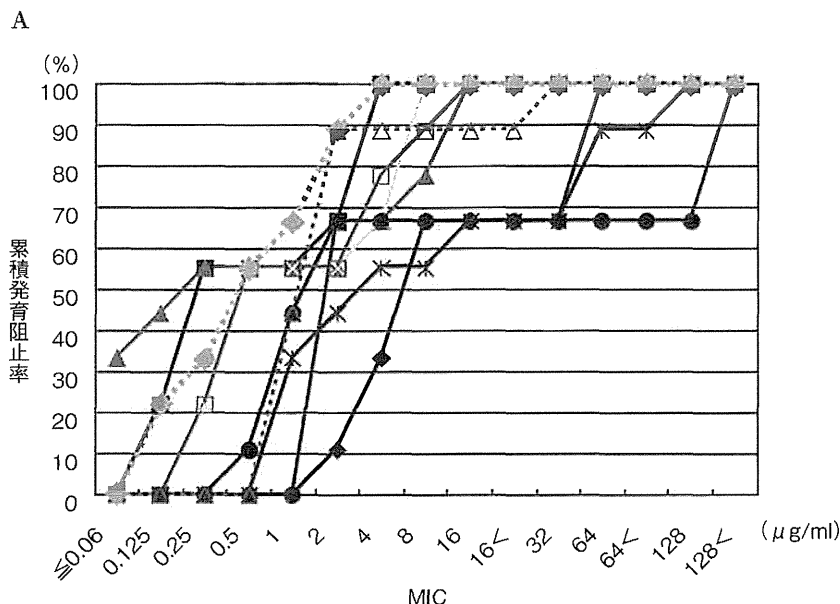
◆◆: MFLX(モキシフロキサシン), ■■: GFLX(ガチフロキサシン), ▲▲: TFLX(トスフロキサシン), ◆◆: LVFX(レボフロキサシン), *:* : NFLX(ノルフロキサシン), ●●: MCR(マイクロノマイシン硫酸塩), □□: CMX(セフメノキシム塩酸塩), ○○: EM(エリスロマイシン), ◆◆: CP(クロラムフェニコール), ◆◆: VCM(バンコマイシン).

MIC: minimum inhibitory concentration.

コリネバクテリウムは最近、角膜感染症の起炎菌となること¹⁵⁾¹⁶⁾や菌自体が結石を生じる事例¹⁷⁾なども報告されてきている。本菌は従来考えられてきたような単なる常在の雑菌ではなくて、今回の起炎菌判定からも起炎菌として前眼部・外眼部感染症と関係していることがさらに明らかとなった。本菌の MIC₉₀は、CMX で 0.25 µg/ml、フルオロキノロン系薬剤で 16~128 µg/ml と報告されている¹¹⁾が、本研究でも、CMX の MIC₉₀が 0.25 µg/ml と高い感受性が得られ、フルオロキノロン系薬剤で 16~128 µg/ml と耐性傾向がみられたのは同様の傾向であった(図 6)。最近、Eguchi ら¹⁸⁾により本菌の菌種による病原性の差やキノロン耐性機構に関する分子生物学的解析の詳細が報告されている。一方、MCR も本研究

ではコリネバクテリウムに良好な感受性を示した。したがって、本菌にはセフェム系の CMX や、MCR などのアミノ配糖体系が有力選択肢の一つとなるだろうと考えられる。

米国での Ocular Tracking Resistance in U.S. Today (TRUST)¹⁹⁾の 2008 年版では、眼科分離株 *S. aureus* 197 株、*S. pneumoniae* 809 株、*H. influenzae* 388 株について調べたシプロフロキサシン(CFLX)、GFLX、LVFX、MFLX、PC、アジスロマイシン、トブラマイシン、トリメトプリム、ポリミキシン B に対する感受性検査結果が報告されている。フルオロキノロン群では各薬剤とも MSSA、MRSA に対し同傾向で、MSSA の感受性が 79.9%~81.1%、MRSA では 15.2% である。*S. pn-*



B

	Range	MIC ₅₀	MIC ₉₀
MFLX	0.125~4	2	4
GFLX	0.125~4	4	4
TFLX	≤0.06~16	16	16
LVFX	0.125~8	8	8
NFLX	1~128	64	128
MCR	0.5~128<	128<	128<
CMX	0.25~16	8	16
EM	2~128<	128<	128<
CP	2~64	64	64
VCM	1~32	2	32

図 8 *Staphylococcus epidermidis* 9 株に対する累積発育阻止率曲線(A)と MIC(B).

◆◆：MFLX(モキシフロキサシン), ■■：GFLX(ガチフロキサシン), ▲▲：TFLX(トスフロキサシン), □□：LVFX(レボフロキサシン), ※※：NFLX(ノルフロキサシン), ●●：MCR(マイクロマイシン硫酸塩), ▢▢：CMX(セフメノキシム塩酸塩), ○○：EM(エリスロマイシン), ◆◆：CP(クロラムフェニコール), ▲▲：VCM(バンコマイシン).

MIC : minimum inhibitory concentration.

eumoniae は GFLX, LVFX, MFLX に対し 100% の株が感受性で, CFLX のみ 89.8% と低い. *H. influenzae* はトリメトプリムを唯一例外として, その他では 100% の感受性がみられている. この結果をみると, 今回の我々のデータと共通して用いた GFLX, LVFX, MFLX に関して日米比較すると MSSA, MRSA, *S. pneumoniae*, *H. influenzae* とも同傾向の感受性と考えられる.

前眼部・外眼部感染症では起炎菌を同定する以前に抗菌薬の投与を開始する, いわゆる empiric therapy が一般的である. 実際の臨床では, 感染部位や年齢, あるいは季節によっても起炎菌の傾向が異なることを考慮して抗菌薬を選択しているが, 安易なパターン化した処方を行ったり, 感受性の低下した薬剤を長期使用したり

することが耐性化につながる可能性があるため, 今後は抗菌薬の適正な選択とその用法, 用量を守ることがきわめて重要と考えられる.

一般論として, 抗菌力の弱い薬剤を長期投与すると耐性菌が生じやすいことから, できるだけ投与期間は必要最低限にすることが合理的である²⁰⁾. また突然変異抑制濃度(mutant prevention concentration : MPC)の低い抗菌薬, つまり強い抗菌力のものが耐性化を抑えられられるため²¹⁾, これらを総合して抗菌薬の投与目的を益最大, 不利益最小にするためには, 短期・強力戦略(short and strong strategy)は意味あると考えられる. その前提として, 今回の第一報, 第二報調査のように, 起炎菌と薬剤感受性の最新動向を定期的に把握・分析し, 抗菌

薬の合理的使用を図ることが重要であると考えられる。

眼感染症薬剤感受性スタディグループ

安里良盛(医療法人水晶会安里眼科), 阿部 徹(阿部眼科), 生駒尚秀(いこま眼科医院), 井上 康(医療法人眼科康誠会井上眼科), 井上幸次(鳥取大学医学部視覚病態学), 魚谷 純(魚谷眼科医院), 江口秀一郎(江口眼科病院), 大橋 勉(医療法人社団大橋眼科), 大橋秀行(大橋眼科), 大橋裕一(愛媛大学医学部眼科), 岡本茂樹(医療法人幸友会岡本眼科クリニック), 岡本 豊(一般財団法人阪大微生物病研究会臨床検査部), 木村 亘(医療法人社団ひかり会木村眼科内科病院), 坂本雅子(一般財団法人阪大微生物病研究会臨床検査部), 佐々木香(出田眼科病院), 庄司 純(庄司眼科医院), 中川 尚(医療法人社団馨風会徳島診療所), 秦野 寛(ルミネはたの眼科), 稗田 牧(バプテスト眼科クリニック), 松本治恵(松本眼科), 宮田和典(医療法人明和会宮田眼科病院), 安間哲史(安間眼科)

利益相反: 井上幸次(カテゴリー F: 参天製薬), 大橋裕一(カテゴリー F: 参天製薬), 下村嘉一(カテゴリー F: 参天製薬), 眼感染症薬剤感受性スタディグループ(カテゴリー F: 日本アルコン)

文 献

- 1) 紺野昌俊, 生方公子, 高橋洋子, 佐々木有宇子, 川上小夜子: 本邦で分離されたゲンタマイシン耐性黄色ブドウ球菌について. 第1編 臨床検査材料からのゲンタマイシン耐性菌の分離頻度と薬剤感受性ならびにファージ型について. *Chemotherapy* 30: 86—95, 1982.
- 2) 小栗豊子, 三澤成毅, 猪狩 淳: 臨床材料から分離した肺炎球菌(*Streptococcus pneumoniae*)に対する経口β-ラクタム系薬の抗菌力について. *日化療会誌* 43: 531—538, 1995.
- 3) Powell M, Yeo SF, Seymour A, Yuan M, Williams JD: Antimicrobial resistance in *Haemophilus influenzae* from England and Scotland in 1991. *J Antimicrob Chemother* 29: 547—554, 1992.
- 4) 大橋秀行: 高齢者の結膜嚢内 MRSA 保菌者と MRSA 結膜炎. *あたらしい眼科* 17: 191—195, 2000.
- 5) 米良明子, 大庭啓介, 雨宮次生: 白内障術後の MRSA 眼内炎の臨床経過—治癒例と非治癒例の比較. *臨眼* 53: 1979—1984, 1999.
- 6) 森田邦彦: PK/PD からみた抗菌薬適正使用の実際. *月刊薬事* 45—51, 2004.
- 7) 小笠原康雄, 大野公一, 播野俊江, 船原弘子, 後藤千栄, 長崎信浩, 他: 病棟薬剤師による「抗菌薬 PK/PD チェックシート」を活用した抗菌薬適正使用への取り組み. *環境感染誌* 123: 112—123, 2008.
- 8) 坂本雅子, 弘田和枝: 外眼部感染症 1378 症例における検出菌分布. *医学検査* 52: 247—252, 2003.
- 9) 青山繁樹, 下田幸紀, 北川和子, 佐々木一之: 外眼部分離菌とその薬剤感受性(1994 年～1996 年). *眼科* 41: 1149—1155, 1999.
- 10) Major JC Jr, Engelbert M, Flynn HW Jr, Miller D, Smiddy WE, Davis JL: *Staphylococcus aureus* endophthalmitis: antibiotic susceptibilities, methicillin resistance, and clinical outcomes. *Am J Ophthalmol* 149: 278—283, 2010.
- 11) 渡邊雅一, 石塚啓司, 池元敏雄: モキシフロキサシン点眼液(ベガモックス™点眼液 0.5%)の薬理学的特性および臨床効果. *日薬理誌* 129: 375—385, 2007.
- 12) Thornsberry C, Ogilvie PT, Holley HP Jr, Sahm DF: Survey of susceptibilities of *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, and *Moraxella catarrhalis* isolates to 26 antimicrobial agents: a prospective U. S. study. *Antimicrob Agents Chemother* 43: 2612—2623, 1999.
- 13) Smith MA, Alperstein P, France K, Vellozzi EM, Isenberg HD: Susceptibility testing of *Propionibacterium acnes* comparing agar dilution with E test. *J Clin Microbiol* 34: 1024—1026, 1996.
- 14) Kurokawa I, Nishijima S, Kawabata S: Antimicrobial susceptibility of *Propionibacterium acnes* isolated from acne vulgaris. *Eur J Dermatol* 9: 25—28, 1999.
- 15) 稲田耕大, 前田郁世, 池田欣史, 宮崎 大, 井上幸次, 江口 洋, 他: コリネバクテリウムが起炎菌と考えられた感染性角膜炎の 1 例. *あたらしい眼科* 26: 1105—1107, 2007.
- 16) Suzuki T, Iihara H, Uno T, Hara Y, Ohkusu K, Hata H, et al: Suture-related keratitis caused by *Corynebacterium macginleyi*. *J Clin Microbiol* 45: 3833—3836, 2007.
- 17) Mihara E, Shimizu M, Touge C, Inoue Y: Case of a large, movable bacterial concretion with biofilm formation on the ocular surface. *Cornea* 23: 513—515, 2004.
- 18) Eguchi H, Kuwahara T, Miyamoto T, Nakayama-Imaohji H, Ichimura M, Hayashi T, et al: High-level fluoroquinolone resistance in ophthalmic clinical isolates belonging to the species *Corynebacterium macginleyi*. *J Clin Microbiol* 46: 527—532, 2008.
- 19) Asbell PA, Colby KA, Deng S, McDonnell P, Meisler DM, Raizman MB, et al: Ocular TRUST: nationwide antimicrobial susceptibility patterns in ocular isolates. *Am J Ophthalmol* 145: 951—958, 2008.
- 20) 「抗菌薬使用のガイドライン」作成委員会: I-2 抗菌薬選択の注意事項. 日本感染症学会, 日本化学療法学会(編): 抗菌薬使用のガイドライン. 協和企画, 東京, 6—9, 2005.
- 21) 戸塚恭一: 体内動態からみた抗菌薬の特徴と使い方. *診断と治療* 90: 2147—2151, 2002.

細菌性結膜炎における検出菌・薬剤感受性に関する 5 年間の動向調査 (多施設共同研究)

小早川信一郎*¹ 井上幸次*² 大橋裕一*³ 下村嘉一*⁴ 臼井正彦*⁵
COI 細菌性結膜炎検出菌スタディグループ

*¹ 東邦大学医療センター大森病院眼科 *² 鳥取大学医学部視覚病態学 *³ 愛媛大学大学院医学系研究科視機能外科学
*⁴ 近畿大学医学部眼科学教室 *⁵ 東京医科大学

Five-Year Trend Survey in Japan (Multicenter Study) of Bacterial Conjunctivitis
Isolates and Their Drug Sensitivity

Shinichiro Kobayakawa¹⁾, Yoshitsugu Inoue²⁾, Yuichi Ohashi³⁾, Yoshikazu Shimomura⁴⁾, Masahiko Usui⁵⁾ and
Core-Network of Ocular Infection Study Group of Isolate from Bacterial Conjunctivitis in Japan

¹⁾ Department of Ophthalmology, Toho University Omori Medical Center, ²⁾ Department of Ophthalmology and Visual Science, Faculty of Medicine, Tottori University, ³⁾ Department of Ophthalmology, Ehime University School of Medicine, ⁴⁾ Department of Ophthalmology, Kinki University Faculty of Medicine, ⁵⁾ Tokyo Medical University

わが国における細菌性結膜炎の検出菌と薬剤感受性の現状を把握するため、2004年11月から2009年12月までの5年間、全国27施設を受診し、その臨床所見から細菌性結膜炎と診断された症例615例を対象に、結膜から検体を採取後、阪大微生物病研究会に送付して培養を行い、症例背景(年齢、地域、受診施設など)、検出菌種、薬剤感受性についてその経年変化を検討した。症例背景では、調査年による大きな差はみられず、年齢においては高齢者が多数を占めた(65歳以上45.9%)。全被験者615例より検体採取が可能であり、1,156株の細菌が検出された。検出菌の内訳は、*Staphylococcus epidermidis* 19.3%、*Propionibacterium acnes* 14.4%、*Streptococcus* spp. 13.0%、*Staphylococcus aureus* 10.8%などで、調査期間を通じてグラム陽性菌が約60%、グラム陰性菌が約20~25%、嫌気性菌が約15~20%検出され、地域にかかわらず同様の傾向を示した。薬剤感受性は累積発育阻止率曲線で比較した場合、全菌種を合わせるとレボフロキサシン(LVFX)と塩酸セフメノキシム(CMX)の感受性が高かった。菌種別のLVFXに対する薬剤感受性では、*S. aureus* (MSSA [メチシリン感受性黄色ブドウ球菌])と*P. acnes*は高い感受性を示したが、*Corynebacterium* spp.に対する感受性は低かった。薬剤感受性は5年間を通じて大きな変化を認めなかった。

To investigate the current tendency in Japan regarding bacterial conjunctivitis cases and the drug sensitivity of the isolated bacteria, conjunctival swabs were taken from patients with suspected bacterial conjunctivitis at 27 institutions nationwide between November 2004 and December 2009. The swabbed samples were sent to the Research Institute of Microbial Diseases at Osaka University, where we investigated patient background (e.g. age, area, institution), isolated bacterial strains and drug sensitivity during that period. There were no significant changes in background throughout the survey period. Aged patients accounted for a large portion of the cases (45.9% of the patients were over 65 years old). Swabs were collected from 615 patients, and 1,156 bacterial strains were collected. Of those strains, 19.3% were *Staphylococcus epidermidis*, 14.4% were *Propionibacterium acnes*, 13.0% were *Streptococcus* spp. and 10.8% were *Staphylococcus aureus*. Of the strains found during the survey period, approximately 60% were gram-positive, 20-25% were gram-negative and 15-20% were anaerobic, regardless of area. When drug sensitivity was compared using cumulative growth inhibition curves, those strains showed high sensitivity to levofloxacin (LVFX) and cefmenoxime (CMX), overall. *S. aureus* (MSSA [methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus*]) and *P. acnes* showed high sensitivity to LVFX; however, *Corynebacterium* spp. showed low sensitivity. There were no significant changes in drug sensitivity throughout the 5-year period.

(Atarashii Ganka (Journal of the Eye) 28(5) : 679~687, 2011)

〔別刷請求先〕 小早川信一郎 : 〒143-8541 東京都大田区大森西7-5-23 東邦大学医療センター大森病院眼科
Reprint requests : Shinichiro Kobayakawa, M.D., Department of Ophthalmology, Toho University Omori Medical Center, 7-5-23 Omori-Nishi, Ota-ku, Tokyo 143-8541, JAPAN

Key words : 多施設共同研究, 細菌性結膜炎, 検出菌, 薬剤感受性. multicenter study, bacterial conjunctivitis, bacterial isolates, drug sensitivity.

はじめに

細菌性結膜炎に対する抗菌薬の選択・投与方法は、起炎菌を検出したうえでその細菌に最も感受性のある薬剤を選択することである。しかし日常臨床では、患者の苦痛の早期軽減や社会生活への影響を考慮して、起炎菌の検出を待たずに治療を行う場合がほとんどであり、起炎菌の同定を行う前に汎用されている抗菌点眼薬を処方するのが現状である。一方、細菌の抗菌薬感受性には経年変化が認められること、近年メチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (MRSA) などの耐性菌による感染症の拡大に伴い、耐性菌対策が必須であることから、日常臨床における抗菌薬選択の重要性は高く、細菌性結膜炎の起炎菌の動向を把握しておくことは意義あることと思われる。

そこで、筆者ら Core-Network of Ocular Infection (COI) のメンバーは、多施設における細菌性結膜炎の検出菌の動向と薬剤感受性の現状を把握し、今後の抗菌薬投与の指標となる有益な情報を得るために、新たな共同研究組織である COI 細菌性結膜炎検出菌スタディグループを組織した。そして、2004 年 11 月より 2009 年までの 5 年間、全国 27 施設を受診し、その臨床所見から細菌性結膜炎と診断された症例 615 例を対象に、結膜から検体を採取して同一施設で培養を実施し、症例背景 (年齢, 地域, 受診施設), 検出菌種, 薬剤感受性について検討を行った。

初年度の結果についてはすでに報告した¹⁾が、今回、5 年間の予定調査期間を終了したので、その結果を報告する。

I 対象および方法

対象は、全国の約 27 施設 (大橋眼科 [北海道], くるさき眼科 [新潟県], 栃尾郷病院 [新潟県], 阿部眼科 [秋田県], 東京医科大学 [東京都], 東京医科大学八王子医療センター [東京都], 東邦大学 [東京都], とだ眼科 [埼玉県], 鹿嶋眼科クリニック [茨城県], いずみ記念病院 [東京都], 上沼田クリニック [東京都], ルミネはたの眼科 [神奈川県], 稲田登戸病院 [神奈川県], いこま眼科医院 [石川県], パプテスト眼科クリニック [京都府], 大橋眼科 [大阪府], 岡本眼科クリニック [愛媛県], 愛媛大学 [愛媛県], 鷹の子病院 [愛媛県], 町田病院 [高知県], 魚谷眼科医院 [鳥取県], 大分県立病院 [大分県], 新別府病院 [大分県], NTT 西日本九州病院 [熊本県], 熊本赤十字病院 [熊本県], 熊本大学 [熊本県], 中頭病院 [沖縄県], ただし、研究参加年数が 4 年以下の施設も含む。) を、初年度 (第 1 回: 2004 年 11 月, 第 2 回: 2005 年 2 月, 第 3 回: 2005 年 5 月, 第 4 回: 2005 年 8

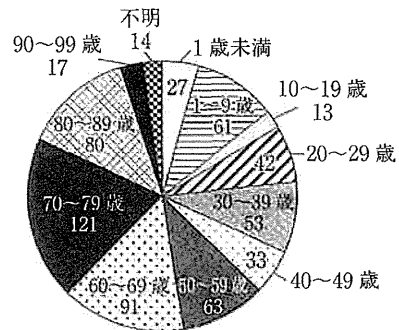


図 1 症例の年齢分布 (期間合計)

月), 2 年度 (第 5 回: 2006 年 2 月, 第 6 回: 2006 年 11 月), 3 年度 (第 7 回: 2007 年 11 月), 4 年度 (第 8 回: 2008 年 11 月, 第 9 回: 2009 年 2 月), 5 年度 (第 10 回: 2009 年 11 月~12 月) の各調査期間に受診し、その臨床所見から細菌性結膜炎と診断された患者である。

症例総数は 615 例 (男性 266 例, 女性 344 例, 不明 5 例) で、年齢は生後 0~99 歳 (平均年齢 52.2 歳) で、年齢不明を除き 50.2% (309 名) が 60 歳以上であった (図 1)。また、7.2% (44 例) がコンタクトレンズ (CL) を装着していた。

患者から同意を得た後、症状の重いほうの片眼の結膜を擦過して採取した検体を、輸送用培地「AMIES CARBON」を用いて阪大微生物病研究会 (阪大微研) に送付し、好気・嫌気培養を行い、細菌の分離・同定を行った。そして、検出菌、地域別の検出菌、施設別の検出菌、年齢別の検出菌、季節別の検出菌、CL 装用の有無による検出菌のそれぞれの内訳を検討した。また、検出菌に対して日本化学療法学会の標準法により、レボフロキサシン (LVFX), ミクロノマイシン (MCR), エリスロマイシン (EM), クロラムフェニコール (CP), スルベニシリンナトリウム (SBPC), 塩酸セフトキシム (CMX) の 6 剤の最小発育阻止濃度 (MIC) を測定し、その結果を累積発育阻止率曲線で表した。なお、調査期間中、MCR の製造中止に伴い、4 年度からはトブラマイシン (TOB) に変更した。さらに、今回の研究では、結膜炎以外の外眼部疾患を有する症例および参加施設を受診前に抗菌薬が投与されていた症例は除外した。

II 結果

1. 細菌分離率

全症例 615 例のなかで細菌が分離されたのは 587 例 (細菌陽性率 95.4%) であり、男性 263 例, 女性 319 例で、年齢は生後 0~99 歳 (平均年齢 52.2 歳) であった。

2. 検出菌の種類と頻度

細菌が分離された587例から1,156株の細菌が検出された(1症例当たり1~8株)。初年度から5年度までのすべての検出菌のうち最も多かったのは、*Staphylococcus epidermidis* (*S. epidermidis*) 223株(19.3%)、ついで *Propionibacterium acnes* (*P. acnes*) 166株(14.4%)、*Streptococcus* spp. 150株(13.0%)、*Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) 125株(10.8%)、*Corynebacterium* spp. 122株(10.6%)、*Haemophilus influenzae* 53株(4.6%)、*Moraxella* spp. 40株(3.5%)であった(図2)。*S. aureus* 125株中、メチシリン感受性黄色ブドウ球菌(MSSA)が99株、メチシリン耐性黄色ブドウ球菌(MRSA)が26株であった。嫌気性菌は178株で、そのうちの169株が *Propionibacterium* spp. であった。グラム陽性菌が全体の63.6%を占めていた。経年変化では、初年度は、検体総数が429株で *S. epidermidis* が102株(23.7%)と最も高頻度に検出され、ついで *S. aureus* 66株(15.4%)、*Streptococcus* spp. 59株(13.8%)、*P. acnes* 40株(9.3%)の順であった。2年度から5年度までは *P. acnes*

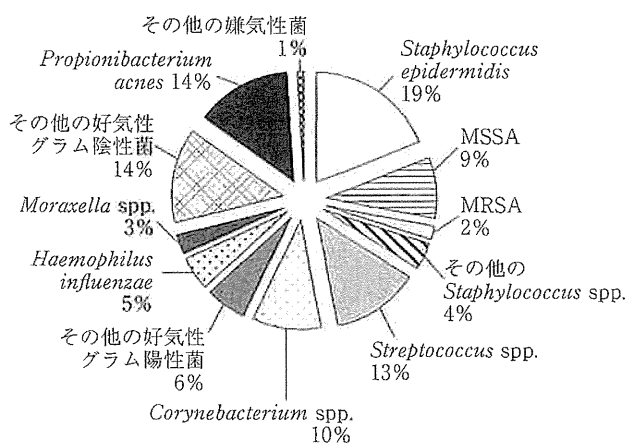


図2 検出菌の種類 (期間合計)

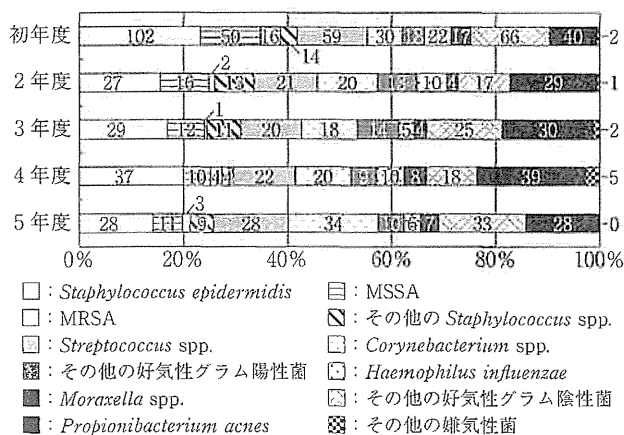


図3 検出菌の経年変化 (主要菌種別)

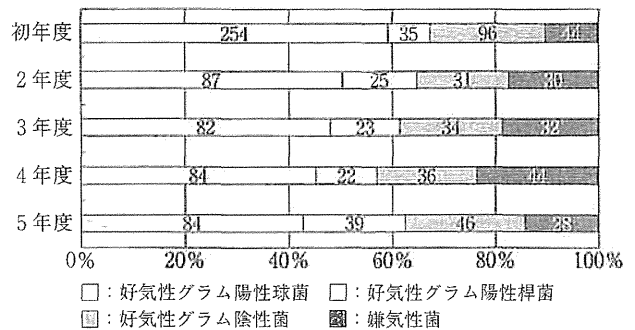


図4 検出菌の内訳・経年変化 (グラム染色別)

が最も多く、次いで *S. epidermidis* の順であったが、5年間を通して大きな傾向の変化は認められなかった(図3)。

グラム染色別の検出菌の内訳・経年変化については、初年度、グラム陽性球菌が59.2% (254株)と最多であったが、2年度50.2% (87株)、3年度47.9% (82株)、4年度45.1% (84株)、5年度42.6% (84株)と、初年度から5年度まで検出菌の約50%はグラム陽性球菌で占められていた(図4)。グラム陽性球菌は5年間を通して最も多く検出されていたものの、経年的には検出比率が減少した。

3. 地域別の検出菌内訳・経年変化 (グラム染色別)

地域別(北海道・東北、関東、中部、関西、中国・四国、九州・沖縄)検出菌の内訳・経年変化は、グラム陽性球菌が地域・年度を問わず高頻度であった。

初年度は、関西地域でグラム陰性菌が少なく、関西・関東で嫌気性菌の比率がやや高かった。しかし、2年度以降は地域間で参加施設の偏り(施設数、施設のタイプ)が生じたために、地域によってはばらつきがみられたものの、全体的な検出菌の頻度については、経年、地域的に大きな差は認められなかった(図5)。

4. 施設別の検出菌内訳・経年変化 (グラム染色別)

全症例615例の施設別内訳は、大学病院57例、総合病院127例、眼科クリニック431例であった。施設別の検出菌内訳・経年変化は、5年間を通じ、眼科クリニック、総合病院ではグラム陽性球菌の割合が突出していた。大学病院では、検体数が少ないため、各検出菌の頻度に大きなばらつきがみられ、一定の傾向を得ることはできなかった(図6)。

5. 年齢別の検出菌内訳・経年変化 (グラム染色別)

全症例615例中の年齢別内訳をみると、65歳以上は282例(45.9%)であり、細菌性結膜炎の半数を高年齢者が占めた。各年代(14歳以下、15~64歳、65歳以上)における検出菌の内訳・経年変化をみると、各年代を通じてグラム陽性球菌が最も高頻度であり、5年間を通してその傾向は変わらなかったものの、15歳以上の年代ではグラム陽性球菌の割合が経年的に減少しており、特に3年度以降ではその検出比率は半数を切っていた(図7)。

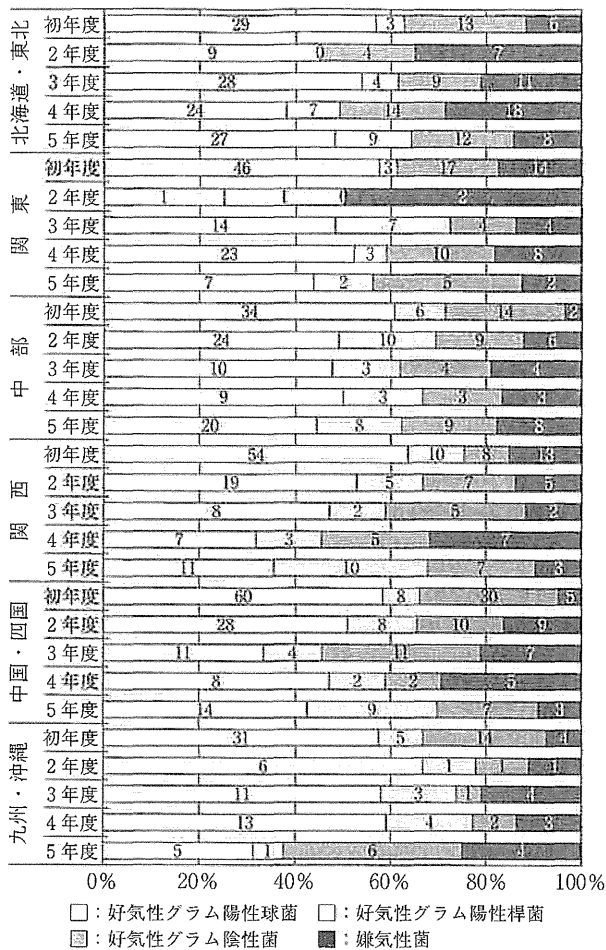


図5 地域別検出菌の内訳・経年変化(グラム染色別)

6. 季節別の検出菌内訳・経年変化

初年度に季節を4回に分けて行った調査では、2月にグラム陽性桿菌が少なく、嫌気性菌が多かった。冬期に多いとされる *Haemophilus influenzae* であるが、11月に6株、2月に6株、5月に6株、8月に4株検出されており、季節による大きな変化はみられなかった。なお、こうした初年度の結果¹⁾を受け、2年度以降では季節別の比較は行わなかった(図8)。

7. CL装用の有無との関連性

CLは88.5%が装用しておらず、装用者は7.2%にとどまった。CL装用の有無でグラム陽性菌と陰性菌の比率に大きな差はなかったが、CL装用者にグラム陽性桿菌が少なく、嫌気性菌が多い傾向を認めた(図9)。

8. 薬剤感受性

結膜炎由来臨床分類種である全検出菌1,156株(全菌種:初年度429株,2年度173株,3年度171株,4年度186株,5年度197株)に対するLVFX, MCR, TOB, EM, CP, SBPC, CMXの抗菌力を、累積発育阻止率曲線で示した(図10)。

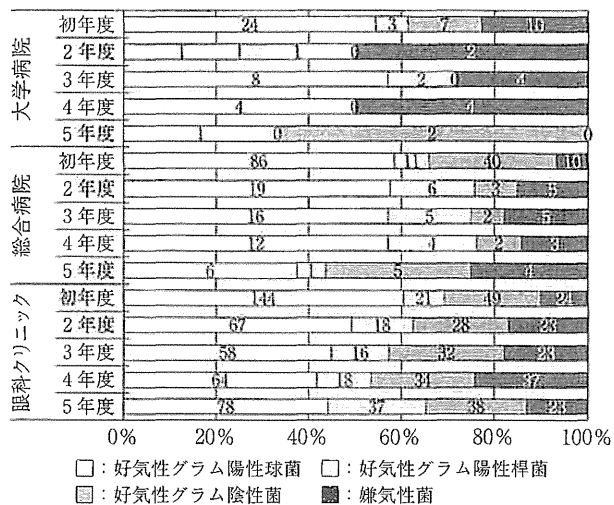


図6 施設別(眼科クリニック, 総合病院, 大学病院)検出菌の内訳・経年変化

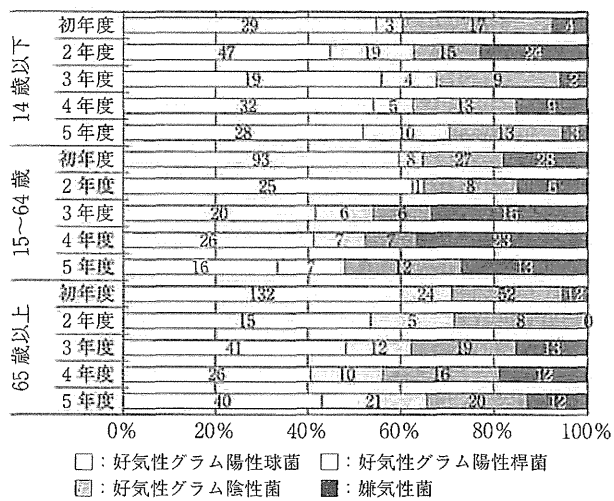


図7 年齢別の内訳・経年変化(グラム染色別)

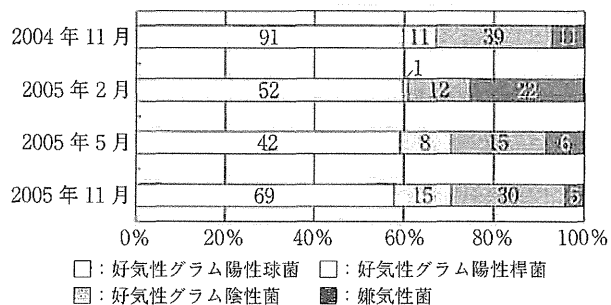


図8 季節別の検出菌内訳・経年変化(グラム染色別)

全体としてのMIC₈₀, MIC₉₀はLVFX, CMXがその他の薬剤と比べて低い値となっており、結膜炎の主要な起炎菌に対する高い感受性が認められた。

全検出菌に対する各薬剤の抗菌力の経年変化を、累積発育

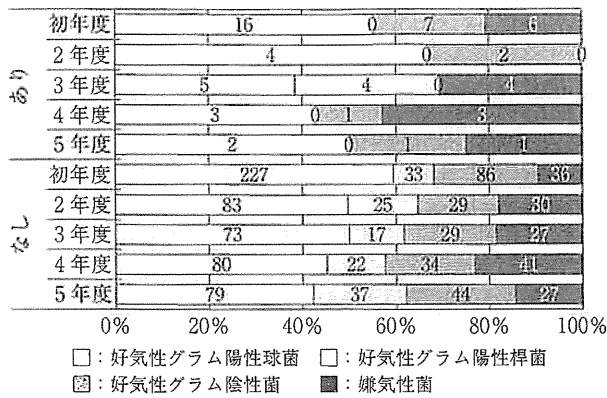


図9 CL装用の有無による検出菌内訳・経年変化(グラム染色別)

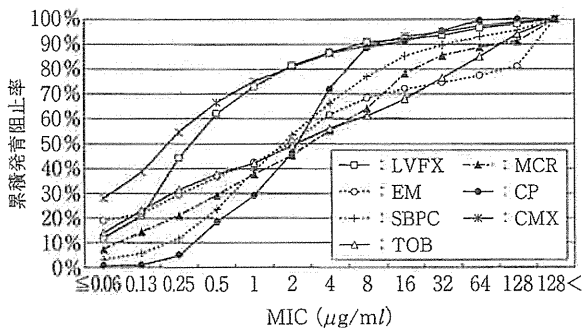


図10 全検出菌1,156株に対する全薬剤の累積発育阻止率曲線

阻止率曲線で示した(図11~17)。

LVFXは5年間の調査期間で大きな変化はなく、累積発育阻止率曲線はほぼ同じパターンを描いた(図11)。MIC₈₀、MIC₉₀は低値を示しており、全検出菌に対する高い感受性が認められた。

MCR(初年度~4年度)およびTOB(4~5年度)は5年間の調査期間で大きな変化はなく、累積発育阻止率曲線はほぼ同じパターンを描いた(図12~13)。

EM、CP、SBPCについても5年間の調査期間で大きな変化はなく、累積発育阻止率曲線はほぼ同じパターンであった(図14~16)。

CMXは5年間の調査期間で大きな変化はなく、累積発育阻止率曲線はほぼ同じパターンを描いた(図17)。MIC₈₀、MIC₉₀は低値を示しており、全検出菌に対する高い感受性が認められた。

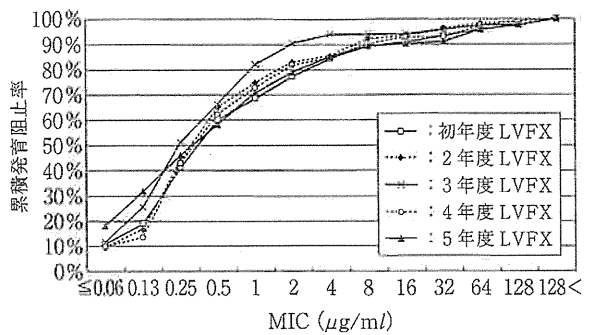


図11 全検出菌1,156株に対するLVFXの累積発育阻止率曲線(全菌種:初年度429株,2年度173株,3年度171株,4年度186株,5年度197株)

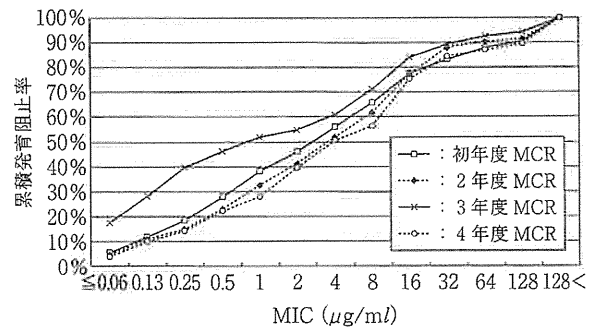


図12 全検出菌959株に対するMCRの累積発育阻止率曲線(全菌種:初年度429株,2年度173株,3年度171株,4年度186株)

つぎに、細菌性結膜炎に対して最も広く使用されているLVFXの主要検出菌に対する抗菌力について、累積発育阻止率曲線で示した(図18~22)。

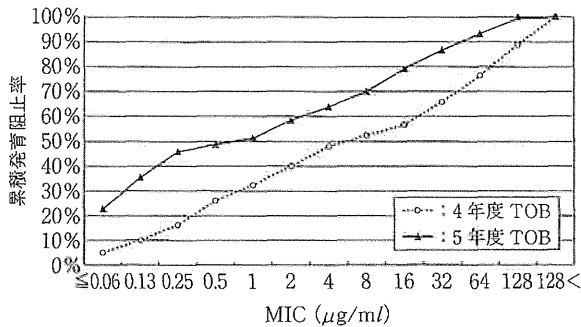
S. epidermidis 221株(初年度100株,2年度27株,3年度29株,4年度37株,5年度28株)では、年度間にて多少の変動は認められるものの、LVFXは*S. epidermidis*に対する高い感受性を5年間を通して維持していた(図18)。

P. acnes 166株(初年度40株,2年度29株,3年度30株,4年度39株,5年度28株)および*S. aureus* (MSSA) 101株(初年度50株,2年度16株,3年度12株,4年度10株,

5年度11株)では、5年間を通して左に強くシフトした同様の曲線を描いており、*P. acnes* および MSSA に対する LVFX のきわめて高い感受性が示された (図 19, 20)。

Streptococcus spp. 150 株 (初年度 59 株, 2 年度 21 株, 3 年度 20 株, 4 年度 22 株, 5 年度 28 株) は, 曲線が左にシフトしており, *Streptococcus* spp. に対する LVFX の高い感受性が示された (図 21)。

Corynebacterium spp. 118 株 (初年度 30 株, 2 年度 20 株, 3 年度 18 株, 4 年度 20 株, 5 年度 30 株) では, LVFX の感受性は低かったものの 5 年間の変化はほとんど認められず, LVFX に対する耐性化は進行していないと考えられた (図 22)。

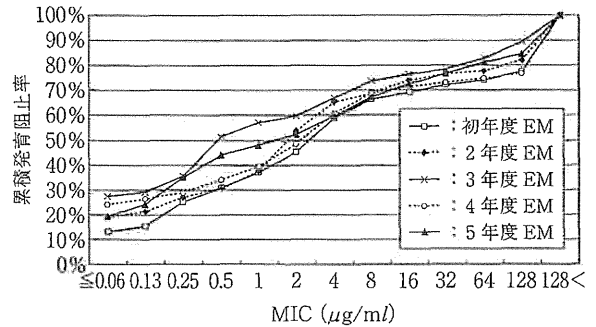


	Range	MIC ₈₀	MIC ₉₀
4 年度	≤0.06~128<	128	128<
5 年度	≤0.06~128<	32	64

図 13 全検出菌 383 株に対する TOB の累積発育阻止率曲線 (全菌種: 4 年度 186 株, 5 年度 197 株)

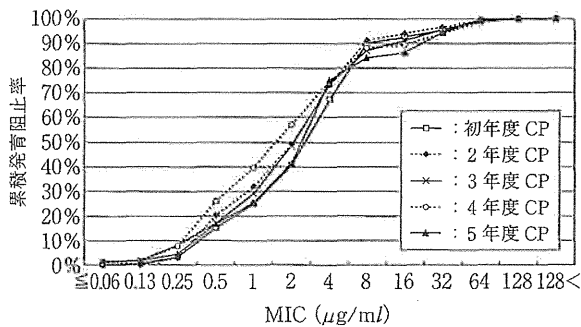
III 考 按

細菌性結膜炎は, 眼感染症のなかで最も高頻度に発症する疾患であるが, 日常診療で結膜炎症例の起炎菌を確定することは困難である。今回のスタディは 5 年間にわたる全国多施設による細菌性結膜炎の細菌の検出状況と薬剤感受性の検討であり, 2007 年の本スタディグループの報告¹⁾に引き続き, 細菌性結膜炎の現状把握と今後の適切な治療薬選択につながる臨床上有用な情報と考えられる。眼感染症における多施設



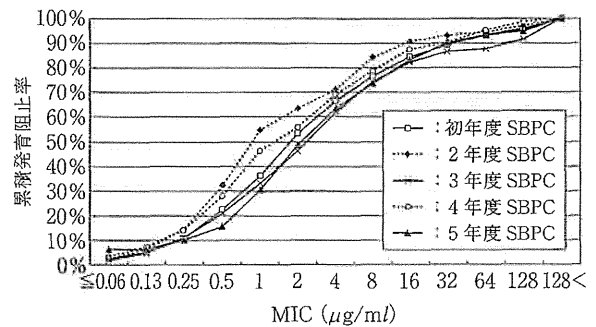
	Range	MIC ₈₀	MIC ₉₀
初年度	≤0.06~128<	128<	128<
2 年度	≤0.06~128<	128	128
3 年度	≤0.06~128<	64	128
4 年度	≤0.06~128<	128<	128<
5 年度	≤0.06~128<	64	128

図 14 全検出菌 1,156 株に対する EM の累積発育阻止率曲線 (全菌種: 初年度 429 株, 2 年度 173 株, 3 年度 171 株, 4 年度 186 株, 5 年度 197 株)



	Range	MIC ₈₀	MIC ₉₀
初年度	0.25~64	8	8
2 年度	0.25~128	8	8
3 年度	≤0.06~128	8	16
4 年度	≤0.06~128	8	32
5 年度	≤0.06~128	8	32

図 15 全検出菌 1,156 株に対する CP の累積発育阻止率曲線 (全菌種: 初年度 429 株, 2 年度 173 株, 3 年度 171 株, 4 年度 186 株, 5 年度 197 株)



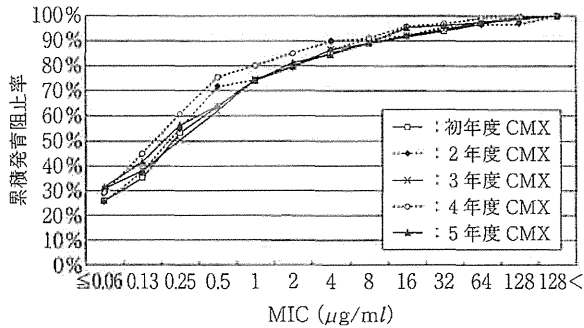
	Range	MIC ₈₀	MIC ₉₀
初年度	≤0.06~128<	16	64
2 年度	≤0.06~128<	8	16
3 年度	≤0.06~128<	16	128
4 年度	≤0.06~128<	16	32
5 年度	≤0.06~128<	16	32

図 16 全検出菌 1,156 株に対する SBPC の累積発育阻止率曲線 (全菌種: 初年度 429 株, 2 年度 173 株, 3 年度 171 株, 4 年度 186 株, 5 年度 197 株)

スタディとしては、眼感染症学会による感染性角膜炎サーベイランス^{2,3)}があり、感染性角膜炎診療ガイドライン⁴⁾の礎となった。本スタディは同一の全国多施設において5年間細菌性結膜炎の動向を観察した結果であり、意義深いものと考えられる。

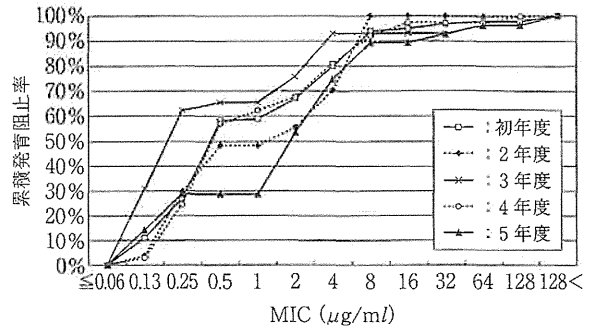
まず5年間にわたる細菌性結膜炎の細菌の検出状況についてであるが、起炎菌の累積頻度は、*S. epidermidis* (19.3%)、*P. acnes* (14.5%)、*Streptococcus* spp. (13.0%)、*S. aureus* (10.8%)、*Corynebacterium* spp. (10.5%)、*Haemophilus*

influenzae (4.6%)、*Moraxella* spp. (2.7%)であり、*S. aureus*ではMSSAが79%、MRSAが21%であった。西澤らは検出菌データの多いものから順に、*S. epidermidis*、*S. aureus*、*Streptococcus* spp.、*Propionibacterium* spp.、*Corynebacterium* spp.、*Haemophilus influenzae*とレビューしている^{1,5-10)}が、本スタディとほぼ同様の結果を示しており、わが国における細菌性結膜炎の検出菌はこれら7菌種が4分の3を占めているものと推測される。また、細菌性結膜炎は世代により検出菌と臨床経過が異なり、小児では*Haemophilus*



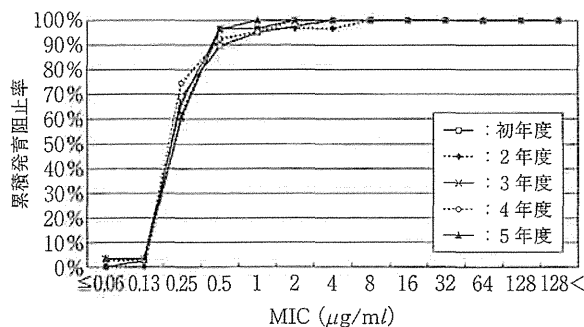
	Range	MIC ₈₀	MIC ₉₀
初年度	≤0.06~128<	2	16
2年度	≤0.06~128<	4	8
3年度	≤0.06~128<	2	16
4年度	≤0.06~128<	1	4
5年度	≤0.06~128<	2	16

図 17 全検出菌 1,156 株に対する CMX の累積発育阻止率曲線 (全菌種: 初年度 429 株, 2年度 173 株, 3年度 171 株, 4年度 186 株, 5年度 197 株)



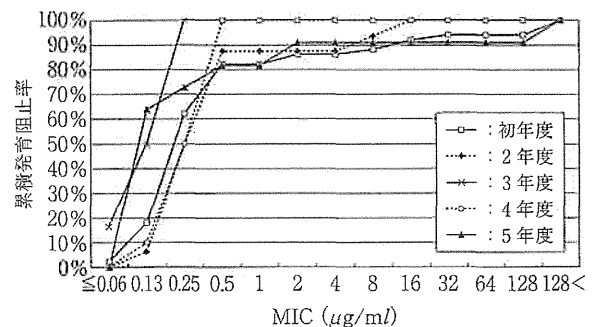
	Range	MIC ₈₀	MIC ₉₀
初年度	0.13~128<	4	8
2年度	0.13~8	8	8
3年度	0.13~128<	4	4
4年度	0.13~128	4	8
5年度	0.13~128<	8	32

図 18 *S. epidermidis* 221 株に対する LVFX の累積発育阻止率曲線 (初年度 100 株, 2年度 27 株, 3年度 29 株, 4年度 37 株, 5年度 28 株)



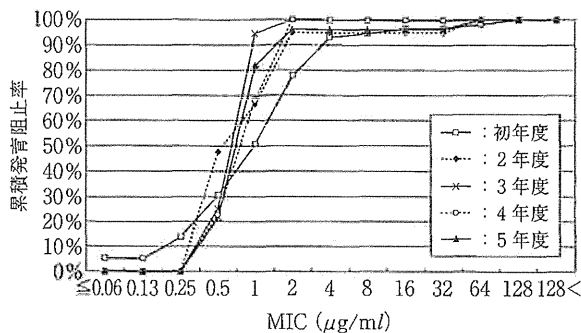
	Range	MIC ₈₀	MIC ₉₀
初年度	0.13~4	0.5	0.5
2年度	0.25~8	0.5	0.5
3年度	≤0.06~2	0.5	0.5
4年度	≤0.06~2	0.5	0.5
5年度	≤0.06~1	0.5	0.5

図 19 *P. acnes* 166 株に対する LVFX の累積発育阻止率曲線 (初年度 40 株, 2年度 29 株, 3年度 30 株, 4年度 39 株, 5年度 28 株)



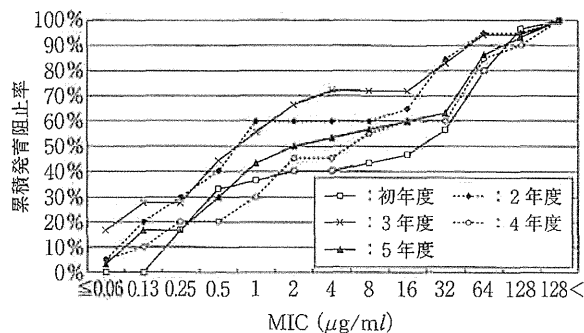
	Range	MIC ₈₀	MIC ₉₀
初年度	≤0.06~128<	0.5	16
2年度	0.13~16	0.5	8
3年度	≤0.06~0.25	0.25	0.25
4年度	0.13~0.5	0.5	0.5
5年度	0.13~128<	0.5	2

図 20 *S. aureus* (MSSA) 99 株に対する LVFX の累積発育阻止率曲線 (初年度 50 株, 2年度 16 株, 3年度 12 株, 4年度 10 株, 5年度 11 株)



	Range	MIC ₈₀	MIC ₉₀
初年度	≤0.06~128	4	4
2年度	0.5~64	2	2
3年度	0.5~2	1	1
4年度	0.5~2	2	2
5年度	0.5~64	1	2

図 21 *Streptococcus* spp. 150 株に対する LVFX の累積発育阻止率曲線 (初年度 59 株, 2 年度 21 株, 3 年度 20 株, 4 年度 22 株, 5 年度 28 株)



	Range	MIC ₈₀	MIC ₉₀
初年度	0.13~128<	64	128
2年度	≤0.06~128<	32	64
3年度	≤0.06~128<	32	64
4年度	≤0.06~128<	64	128
5年度	≤0.06~128<	64	128

図 22 *Corynebacterium* spp. 118 株に対する LVFX の累積発育阻止率曲線 (初年度 30 株, 2 年度 20 株, 3 年度 18 株, 4 年度 20 株, 5 年度 30 株)

influenzae や, *S. pneumoniae* が多く, 高齢者では *S. aureus* や *Corynebacterium* spp. が多くとされる⁵⁾. 本スタディでも, 14 歳以下では初年度にグラム陰性菌が 32% を占め, その約半数が *Haemophilus influenzae* であったが, その後経年的にグラム陰性菌の割合は減少した. また, 各年代を通じてグラム陽性球菌が最も高頻度であり, 5 年間を通してその傾向はかわらなかったものの, 15 歳以上の年代ではグラム陽性球菌の割合が経年的に減少していた. つぎに検出菌における地域差については, 経年変化や地域別に一定の傾向はみられなかった. 施設別では, 眼科クリニック, 総合病院ではグラム陽性球菌の割合が多く, 大学病院では嫌気性菌が多いものの, 各検出菌の頻度に大きなばらつきがみられ, 一定の傾向はなかった. CL 装用の有無については, 88.5% が装用しておらず, 装用者は 7.2% にとどまり, CL 装用の有無でグラム陽性菌と陰性菌の比率に大きな差はなかった. 以上より, 2007 年の報告と同様, 今日の細菌性結膜炎の主要検出菌は, *S. epidermidis*, *S. aureus*, *Streptococcus* spp., *Corynebacterium* spp., *Haemophilus* spp. と推察された.

全検出菌に対する薬剤感受性 (MIC₈₀, MIC₉₀) は, LVFX, CMX がその他の薬剤と比べて低い値となっており, 結膜炎の主要な起炎菌に対する高い感受性が認められた. また, この 5 年間の調査期間中に, 細菌性結膜炎の主要検出菌に対する薬剤感受性に大きな変化がみられなかったことから, 急速な菌の変化, 耐性化の進行は生じていないと考えられた. 本来, 細菌性結膜炎に対する抗菌薬の選択, 投与方法は, 起炎菌を検出したうえで検出された細菌に対する最も抗菌力の強い薬剤を選択し使用することに尽きるが, 日常臨床では, 患

者苦痛の軽減, quality of life (QOL) 低下の防止, 感染拡大の阻止, 病態の遷延化・難治化の阻止を治療の要点とし, 起炎菌の検出を待たずに早期治療開始の必要性が迫られる. これらの事情を考慮すると, 広域の抗菌スペクトルを示し, 他の抗菌点眼薬と比較して高い感受性から, 細菌性結膜炎の日常診療において LVFX, CMX を第一選択としてよいと思われる.

以上のように, 今回の 5 年間にわたる調査により, 細菌性結膜炎の検出菌の急速な変化や耐性化は進行していないことが明らかとなったが, 初年度の報告の考按で示したごとく, 多剤耐性菌の出現や菌交代現象の要因としてあげられている抗菌薬の過剰投与や広域スペクトルを有する薬剤の濫用の弊害を常に念頭に置き, 上記のような広域抗菌点眼薬の投与は必要最低限にとどめるべきであると考え.

COI 細菌性結膜炎検出菌スタディグループ (50 音順)———

注記: 所属が眼科の場合は部門を省略, 所属は調査参加当時のもの
 青木功喜 (大橋眼科/札幌), 浅利誠志 (大阪大学医学部附属病院感染制御部), 阿部達也 (くろさき眼科), 阿部 徹 (阿部眼科), 有賀俊英 (札幌社会保険総合病院), 生駒尚秀 (いこま眼科医院), 稲森由美子 (横浜市立大学), 井上幸次 (鳥取大学), 魚谷 純 (魚谷眼科医院), 薄井紀夫 (総合新川橋病院), 臼井正彦 (東京医科大学), 内尾英一 (福岡大学), 宇野敏彦 (愛媛大学), 卜部公章 (町田病院), 大橋 勉 (大橋眼科/札幌), 大橋秀行 (大橋眼科/大阪), 大橋裕一 (愛媛大学), 岡本茂樹 (岡本眼科クリニック), 奥村直毅 (京都府立医科大学), 亀井里実 (バプテスト眼科クリニック), 亀井裕子 (東京女子医科大学東医療センター), 川崎尚美 (岡本眼科

クリニック), 岸本里栄子(大橋眼科/札幌), 北川和子(金沢医科大学), 木村 格(岡本眼科クリニック), 久志雅和(中頭病院), 小鹿聡美(東京医科大学), 小嶋健太郎(京都府立医科大学), 古城美奈(バプテスト眼科クリニック), 小早川信一郎(東邦大学医療センター大森病院), 坂本雅子(阪大微生物病研究会), 渋谷 翠(東京医科大学), 島袋あゆみ(琉球大学), 下村嘉一(近畿大学), 白石 敦(愛媛大学), 鈴木崇(愛媛大学), 外園千恵(京都府立医科大学), 瀧田忠介(大分県立病院), 田中康一郎(鹿嶋眼科クリニック), 田中裕子(愛媛大学), 中井義典(バプテスト眼科クリニック), 中川尚(徳島診療所), 中村行宏(NTT西日本九州病院), 西崎暁子(バプテスト眼科クリニック), 橋田正継(町田病院), 橋本直子(岡本眼科クリニック), 秦野 寛(ルミネはたの眼科), 原 祐子(愛媛大学), 檜垣史郎(近畿大学), 東原尚代(京都府立医科大学), 平野澄江(岡本眼科クリニック), 福田正道(金沢医科大学), 松本光希(NTT西日本九州病院), 松本治恵(松本眼科), 箕田 宏(とだ眼科), 宮嶋聖也(熊本赤十字病院), 宮本仁志(愛媛大学医学部附属病院診療支援部), 山口昌彦(愛媛大学), 山崎哲哉(町田病院), 横井克俊(東京医科大学)

文 献

- 1) 松本治恵, 井上幸次, 大橋裕一ほか: 多施設共同による細菌性結膜炎における検出菌動向調査. あたらしい眼科 24: 647-654, 2007
- 2) 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. 日眼会誌 110: 961-972, 2006
- 3) 砂田淳子, 上田安希子, 井上幸次ほか: 感染性角膜炎全国サーベイランス分離菌における薬剤感受性と市販点眼薬の postantibiotic effect の比較. 日眼会誌 110: 973-983, 2006
- 4) 井上幸次, 大橋裕一, 浅利誠志ほか: 感染性角膜炎診療ガイドライン作成委員会: 感染性角膜炎診療ガイドライン. 日眼会誌 111: 769-809, 2007
- 5) 西澤きよみ, 秦野 寛: わが国の細菌性結膜炎の起炎菌は? あたらしい眼科 26(臨増): 65-68, 2009
- 6) 宮尾益也, 本山まり子, 坂上富士男ほか: 新潟大学眼感染症クリニックでの10年間の検出菌. 臨眼 45: 969-973, 1991
- 7) 松井法子, 松井孝治, 尾上 聡ほか: 細菌性結膜炎の検出菌についての検討. 臨眼 59: 559-563, 2005
- 8) 堀 武志, 秦野 寛: 急性細菌性結膜炎の疫学. あたらしい眼科 6: 81-84, 1989
- 9) 西原 勝, 井上慎三, 松村香代子: 細菌性結膜炎における検出菌の年齢分布. あたらしい眼科 7: 1039-1042, 1990
- 10) 秋葉真理子, 秋葉 純: 乳幼児細菌性結膜炎の検出菌と薬剤感受性の検討. あたらしい眼科 18: 929-931, 2001

* * *

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 —近畿大学医学部眼科学教室¹, アイアイ眼科医院² 宮本裕子^{1,2}, 下村嘉一¹

はじめに

自分が使用しているコンタクトレンズ（以下 CL）名やケア用品の名前を知らないユーザーが非常に多い。処方時に CL 名やケア用品の説明を受けているはずである。初めて CL を処方するときに処方者は一連のケア方法を説明するが、その後ユーザーがどこまで最初のケア方法を正しく守っているのか疑問の残るところである。はじめのころはユーザーも慎重で、指導された CL ケアを遵守しているが、慣れてくると気持ちの上で過信してしまいがちになり、正しいケア方法が守られていない場合が散見される。2009年12月に発表された国民生活センターの報告のなかで、頻回交換ソフト CL（以下 SCL）使用者の実態調査の結果をみると、CL ケアの前に毎回石けんで手洗いをしていなかった人が65.5%もあるということが明らかになっている。更に、多目的用剤（以下 MPS）使用者のなかでこすり洗いを毎回しないという人が49.6%で、2/3の人は SCL のレンズケースを3カ月以内に交換していなかったことがわかった。CL ケアの基本的注意点として、「レンズを取り扱う前は必ず石けんで手指を洗う」、「こすり洗いをする」、「レンズケースは1.5～3カ月に一度は新しいものと交換する」の三点が挙げられるが、この基本的注意点を遵守していない人は遵守した人に比較して、緑膿菌やアカントアメーバの検出率が高いという結果も出ている。正しいケアができていないことが明らかになっており、CL ケアの基本的注意点が遵守されていないほど、緑膿菌やアカ

ントアメーバの感染の機会が増えてしまうことが考えられる。

CL ケアの指導と定期検査

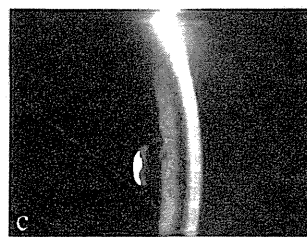
CL の取り扱いに慣れてくるとケアに対する気配りが減り、手抜きケアとなってしまう。そういった意味でも定期検査は重要で、来院時に正しいケアができているかどうかを確認する必要がある。ところが、昨今はインターネットでの購入が非常に増えているように感じる。医師の診察を受けるようにという記載はあるが、実際はデータを自分で入力すれば、いとも簡単に購入できてしまう。インターネット上には様々なおしゃれ用カラー CL が氾濫している。洋服やアクセサリと同じ雑品のごとく販売されている。先日も、友人が韓国サイトで購入したおしゃれ用カラー CL をもらって装用し、合併症を来してから初めて眼科受診した例を経験した。ケアについて聞くと MPS は使っていたが、指導を受けていないためレンズを浸け置くだけであった。同じような例として、水道水で洗浄し、MPS に浸けて置いて使用していたという例もあった。処方せんがなくても前回と同じであれば販売するという販売店（もあると聞く）やインターネットでの購入を続けていると、正しいケアができていないかどうかの確認ができず、眼疾患の早期発見が遅れてしまう。図 1a～d は19歳、女性。6～7年前に初めて CL の処方を受け、その後、定期検査は全く受けず、ネットで購入を続けていた。1カ月交換の SCL を使用していたとのことであるが、レンズ名は



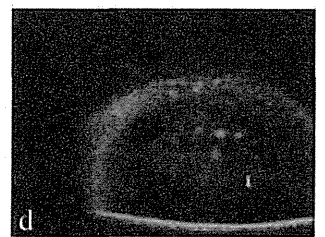
a 角膜上方からの新生血管の侵入と角膜浸潤



b 多数の角膜浸潤と角膜瘢痕



c 角膜全周から強い新生血管の侵入



d 多数のフルオレセイン染色

図1 定期検査を受けずに放置されていた症例

わからない（どうやって購入していたのか疑問である）とのことである。ケアについては、こすり洗いは行っていたが、軽く数回のみで、石けんでの手洗いは行っていなかった。自分でも調子の悪いときはあったが装用を続けていたとのことである。今回初めて、診察を希望して来院した。多数の角膜浸潤と角膜混濁および全周にわたる強い新生血管の侵入を認めていた。ケアについて指導を受けていても、次第にケアがおろそかになるというのに、雑品を購入するかのごとくネットなどで購入し、CLケアの重要性について知識のないままCLを使用し、定期検査を受けずにいると、本例のように眼疾患が存在していても気が付かないままで過ごしている場合がある。

更に、定期検査の受診率が悪いのはハードCL（以下HCL）使用者である。レンズの破損、紛失など何かなければ受診しないユーザーが非常に多いように思われる。たとえどのようなCLであっても、定期検査を受け、眼合併症の有無やCLの状態を観察するだけではなく、正しいケアを続けて行っているかをチェックすることが重要である。感染症のことを考えればできるだけ微生物に対する効果の高いケア用品を選択し、それを正しく使うよう指導しなければならぬ。更には、CL関連角膜感染症の原因となる

環境菌による影響を考えると、ケアを行っている場所、洗面所などの水回りを清潔に保つことにも注意を払うよう指導が必要になってくる。先日の第54回日本コンタクトレンズ学会では、レンズやケア用品を保存する温度についても議論されていた。近年はHCLに対しても除菌効果の期待できるケア用品が出ている。市販でケア用品を購入する際には、一番低価格のものを選択する機会が多いということを目にするが、できるだけ微生物に対する効果の高いケア用品を購入し、正しい方法でケアを行うようにユーザーを指導するべきであると考えられる。

おわりに

処方する側も多忙ななか、CLについての説明とケア用品の特徴やケアの方法を説明し理解されたと思っていても、ユーザーはそのとき安く販売されているケア用品を購入する。その上にケアが手抜きになり、やがて気が緩んだころに角膜感染症が忍び寄る。処方医は正しいケアの指導と定期検査の重要性（ネットで購入を続けることの危険性）を常に心にとどめ、それをユーザーに啓発していかなければならない。

Utility of Real-Time Polymerase Chain Reaction in Diagnosing and Treating *Acanthamoeba* Keratitis

Motoki Itahashi, MD, PhD,* Shiro Higaki, MD, PhD,† Masahiko Fukuda, MD, PhD,† Hiroshi Mishima, MD, PhD,* and Yoshikazu Shimomura, MD, PhD†

Purpose: Using real-time polymerase chain reaction (PCR), we detected *Acanthamoeba* and monitored the changes in *Acanthamoeba* DNA copy number over the treatment course in patients suspected of *Acanthamoeba* keratitis (AK).

Methods: Subjects were 6 patients (average age, 26.2 years) suspected of AK at the Kinki University Outpatient Clinic. For detection of *Acanthamoeba*, patients' corneal scrapings were collected for smear analysis, culture, and real-time PCR. After the diagnosis of AK was confirmed, treatment was initiated based on the quantitative result of the real-time PCR.

Results: Both the smear and culture were positive for *Acanthamoeba* in 4 cases and negative in 2 cases (agreement in 3 cases and disagreement in 2 cases). By real-time PCR, all 6 cases were positive for *Acanthamoeba* with an average DNA copy number of $4.8 \pm 9.1 \times 10^3$ copies per sample. We further monitored the variation in the *Acanthamoeba* DNA copy number over the treatment course and successfully treated all the patients. DNA copy number provided a parallel with other clinical features of AK.

Conclusions: Real-time PCR can be a useful method for a rapid and precise diagnosis of AK. Moreover, utility of the *Acanthamoeba* DNA copy number obtained by real-time PCR can help ophthalmologists in making the best treatment decision.

Key Words: *Acanthamoeba*, keratitis, real-time PCR, culture, detection and quantification of pathogens

(*Cornea* 2011;30:1233–1237)

Acanthamoeba keratitis (AK) is a potentially blinding disease that is often misdiagnosed and does not respond well to treatment. Because of the delayed diagnosis and improper treatment, patients with AK are often left with loss of vision caused by corneal opacity.¹ Furthermore, Centers for Disease Control and Prevention of the United States reported

that cases of AK have overwhelmingly increased in recent years, especially among contact lens users.² Therefore, a method that enables a quick and accurate diagnosis of AK is indispensable.

Smear examination and culture using patients' corneal scraping are the conventional diagnostic methods to detect *Acanthamoeba*.^{3–5} However, culture faces challenging problems such as a long turnaround time, and results of smear examination largely depend on the laboratory technician's skill. Besides smears and cultures, polymerase chain reaction (PCR)^{6–9} and confocal microscopy¹⁰ have been increasingly used for the detection of *Acanthamoeba*, but they cannot quantitate the pathogens.

Several studies have reported the quantification of *Acanthamoeba* using real-time PCR.^{11–14} Thompson et al¹³ validated 2 real-time PCR methods (the Rivière and Qvarnstrom assays) for the confirmation of AK by laboratory diagnosis. They also compared both assays with a battery of positive and negative samples and further validated real-time PCR for clinical application with a subset of true-positive and true-negative samples. Kandori et al¹⁴ reported 2 cases of AK successfully diagnosed only by real-time PCR. In their 2 cases, culture and microscopic examination yielded a negative result and could not grow any pathogens. Although they used real-time PCR to qualitatively detect *Acanthamoeba* DNA, the quantitative results of the real-time PCR were not indicated or used for the diagnosis or treatment of AK in their study.

In this study, we performed real-time PCR to detect and quantitate *Acanthamoeba* in patients' corneal scrapings. To our knowledge, this is the first real-time PCR report that not only detects *Acanthamoeba* but also quantitates the *Acanthamoeba* DNA copy number. By monitoring the *Acanthamoeba* DNA copy number over the treatment course, we achieved excellent treatment outcomes in all 6 patients and reported 2 cases here.

PATIENTS AND METHODS

Subjects and Sample Collection

Subjects were 6 patients (4 men and 2 women; age range: 22 to 32 years; average: 26.2 years) suspected of AK based on the clinical signs presented at the Kinki University Outpatient Clinic between June 2008 and September 2009. All patients gave their informed consent to real-time PCR with their corneal scrapings.

For sample collection, the subject was under local anesthesia with 0.4% oxybuprocaine eyedrops, and an eye

Received for publication May 21, 2010; revision received September 21, 2010; accepted September 26, 2010.

From the *Department of Ophthalmology, Kinki University School of Medicine, Nara Hospital, Nara, Japan; and †Department of Ophthalmology, Kinki University School of Medicine, Osaka-Sayama, Japan.

The authors declare no financial disclosures or conflicts of interest.

Reprints: Shiro Higaki, Department of Ophthalmology, Kinki University School of Medicine, 377-2 Ohno-Higashi, Osaka-Sayama 589-8511, Japan (e-mail: higaki@ganka.med.kindai.ac.jp).

Copyright © 2011 by Lippincott Williams & Wilkins

speculum was inserted before sampling. Corneal scrapings were collected for culture, smear examination, and real-time PCR. We used a stainless rounded blade (Feather disposable scalpel number 15; Feather Safety Razor, Co, Ltd, Gifu, Japan) to scrape the lesion (Fig. 1). A small amount of sample (about 5–10 μg) was collected and placed in 500 μL of saline solution immediately. The samples were kept at 2°C to 5°C until further processing. Real-time PCR was performed within 2 days after the sample was collected to determine the DNA copy number. All sterile precautions were taken to avoid contamination during the sample collection.

Microscopy and Culture

Corneal scrapings were cultured on blood agar medium (Nissui Pharmaceutical, Co, Ltd, Tokyo, Japan), chocolate agar medium (Biomérieux Japan, Tokyo, Japan), glucose agar medium (Biomérieux Japan), or nutrient agar medium (Nissui Pharmaceutical, Co, Ltd) supplied with *Escherichia coli* and were subjected to smear analysis with Fungiflora Y stain or direct microscopic examination.

Real-Time PCR

From the corneal scrapings collected for real-time PCR, DNA was extracted using EXTARGEN2 (Tosoh, Tokyo, Japan). The PCR assay used TaqMan probe, and the primers and probe were designed against *Acanthamoeba* 18S ribosomal RNA.¹² The primers were (forward) CCCAGATCGTTTACCGTGAA and (reverse) TAAATATTAATgCCCCCAACTATCC, and the probe was CTGCCACCGAATACATAGCATGG. The PCR assay was conducted on an ABI PRISM 2000 Sequence Detector, and the cycling settings were 40 cycles of 95°C for 10 seconds, 95°C for 5 seconds, and 60°C for 30 seconds. The assay was completed in about 2 hours. A positive control plasmid was used to construct a standard curve of the threshold cycle (C_t) values with a linear range from 1.0×10^1 to 1.0×10^6 copies. Relative copy number was also calculated by the standard curve (Fig. 2). We quantitated *Acanthamoeba* and

monitored the *Acanthamoeba* DNA copy number for both detection and treatment of AK.

RESULTS

All 6 subjects were soft contact lens (SCL) users and were observed with radial keratoneuritis (Table 1), which is one of the pathognomonic clinical features of AK.

The smear and culture both showed positive results in 4 cases (case numbers 1, 3, 4, and 6 for smear and case numbers 2, 3, 4, and 6 for culture; Table 1). By real-time PCR, all 6 patients were positive for *Acanthamoeba* with an average DNA copy number of $4.8 \pm 9.1 \times 10^3$ copies per sample and a maximum of 2.5×10^4 copies per sample (Table 1).

CASE REPORTS

Case 1

The patient was a 27-year-old man, who used replacement 30-day SCLs and suffered from eye pain in the middle of May 2008. On June 2, superficial punctate keratitis and conjunctival injection were initially observed in both eyes. Corneal edema was also seen in the left eye, and the patient had difficulty opening his right eye because of severe pain (Fig. 3). Culture of the patient's discharge was positive for *Corynebacterium* sp. On June 16, the smear result of the corneal scraping from the left eye was positive for *Acanthamoeba* (Fig. 4). Real-time PCR also detected *Acanthamoeba* with 2.5×10^4 copies of DNA per sample. With the patient's consent, we also performed real-time PCR on the contact lens solution sample (about 1.0 mL) collected from the lens case. A positive result with 4.3×10^3 copies of DNA per sample was obtained.

Based on the real-time PCR results, treatment for *Acanthamoeba* was started with 0.05% chlorhexidine eyedrops 8 times per day, 0.03% miconazole eyedrops 8 times per day, and 0.5% levofloxacin eyedrops 4 times per day. Corneal scraping for real-time PCR was performed twice a week on the left eye during the treatment course.

The patient's symptoms were improved. The eye pain was gone, and the corneal inflammation and edema were alleviated.

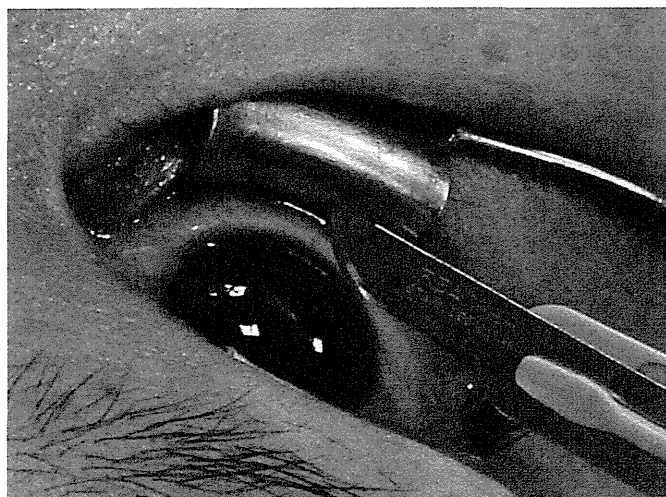


FIGURE 1. Photograph showing the setting for corneal scraping.

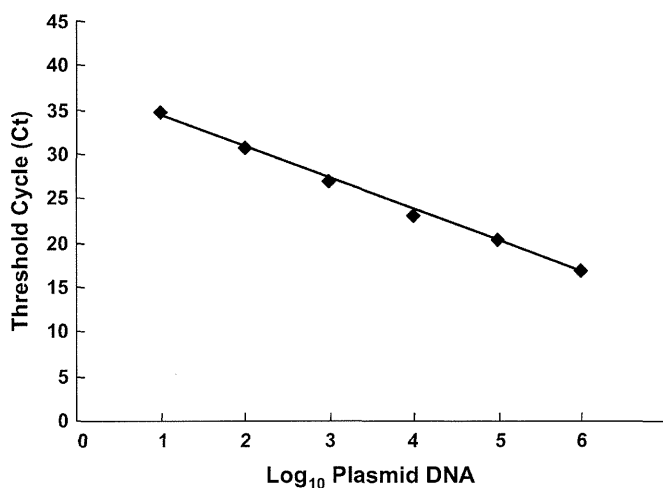


FIGURE 2. C_t values derived from the real-time PCR were compared with a positive control plasmid with a linear range from 1.0×10^1 to 1.0×10^6 copies.

TABLE 1. Patient Characteristics and Results for the Detection and Quantification of *Acanthamoeba*

Case Number	Age (yr)	Sex	Radial Keratoneuritis	Types of CLs Used	Smear Result	Culture Result	Maximum DNA Copy Number
1	27	M	+	30-day SCL	Positive	Negative	2.5×10^4
2	29	M	+	1-day SCL*	Negative	Positive	1.1×10^2
3	22	M	+	2-week SCL	Positive	Positive	2.8×10^2
4	24	M	+	30-day SCL	Positive	Positive	1.1×10^3
5	23	F	+	2-week SCL	Negative	Negative	1.8×10^3
6	32	F	+	2-week SCL	Positive	Positive	6.1×10^2

*The 1-day SCLs used by the patient in case 2 were actually stored in CL solution and used for 3–4 days.
+, Presence of radial keratoneuritis; CL, contact lens.

Overall, the *Acanthamoeba* DNA copy number declined over the treatment course (Fig. 5), and finally, no *Acanthamoeba* was detected 35 days after the treatment was initiated.

Case 2

The patient was a 29-year-old man, who often used 1-day SCLs for about 3 days. In January 2009, he experienced pain and conjunctival injection in the left eye when he wore the lenses (Fig. 6). He was treated with topical medications at another clinic but the symptoms did not improve. The patient visited our clinic on January 22 and presented with corneal opacity and conjunctival injection in the left eye. No causative pathogens were confirmed by culture. Based on the clinical findings, we suspected *Acanthamoeba* and started treatment with 0.2% fluconazole, 0.03% miconazole, and 0.05% chlorhexidine eyedrops. On February 13, culture and real-time PCR using the corneal scrapings were performed, and both the methods were positive for *Acanthamoeba*. *Acanthamoeba* DNA of 1.1×10^2 copies per sample was obtained by real-time PCR.

Based on the positive results, 0.05% chlorhexidine eyedrops 8 times per day, 0.03% miconazole eyedrops 8 times per day, and 0.5% levofloxacin eyedrops 4 times per day were started. Like case 1, corneal scraping for real-time PCR was performed on the left eye twice a week during the treatment course. In time, the patient's symptoms were improved. The pain was gone, and the corneal inflammation and edema were eased. The *Acanthamoeba* DNA copy number also declined over the treatment period in this case, and finally, absence of *Acanthamoeba* was confirmed 38 days after the initiation of the medical treatment (Fig. 7).

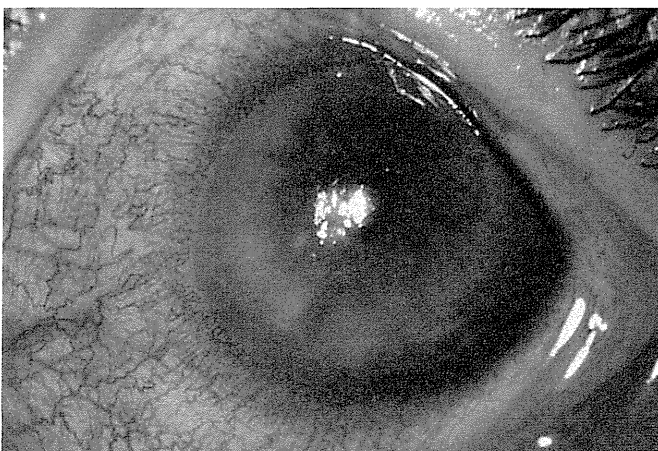


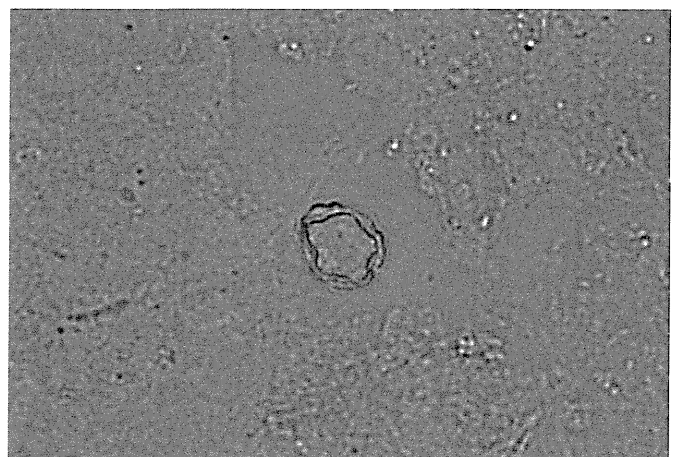
FIGURE 3. Photograph of the left eye of the patient in case 1 taken before treatment. Corneal opacity and edema were observed in the left eye.

DISCUSSION

Our current results clearly demonstrate that real-time PCR could be a useful supplemental method to the conventional smear and culture techniques for a more rapid and accurate diagnosis of AK. Particularly, the DNA copy number obtained by real-time PCR could serve as a good index of treatment outcomes and a guide to a better antiamoebic regimen (Figs. 5, 7).

Unlike PCR that uses agarose gel electrophoresis for the preparation and analysis of DNA, real-time PCR can quantitate DNA at the site of the corneal scraping. By monitoring the DNA copy number, an accurate diagnosis and a tailored antiamoebic regimen can be achieved in the early stage of the disease, and if necessary, the treatment modality can be modified accordingly during the course. Even at the end of the treatment, *Acanthamoeba* DNA copy number can help identify the presence or absence of *Acanthamoeba*. All these clinical judgments can be facilitated by quantitative real-time PCR result.

The primers and probe used in this study have been clinically validated by Thompson et al¹³ for the laboratory diagnosis of AK. Although Kandori et al¹⁴ reported 2 cases of AK diagnosed only by real-time PCR, they only used this



×400

FIGURE 4. Photograph of the smear result taken on June 16, 2008. *Acanthamoeba* was detected by smear examination using the corneal scraping from the left eye.

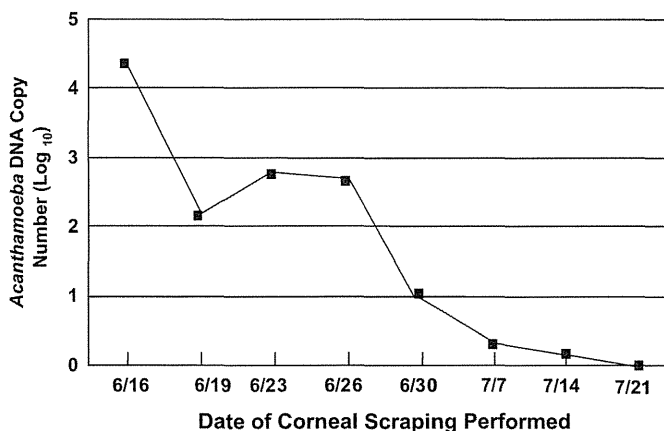


FIGURE 5. Variation in DNA copy number in case 1. Overall, the *Acanthamoeba* DNA copy number declined over the course, and finally, absence of *Acanthamoeba* was confirmed 35 days after the treatment started.

method to identify the presence of *Acanthamoeba* and did not measure the *Acanthamoeba* DNA copy number in the study. Unlike these previous studies, we used the *Acanthamoeba* DNA copy number for the purposes of diagnosis and treatment and reported an average DNA copy number of $4.8 \pm 9.1 \times 10^3$ copies per sample for a clinical diagnosis of AK and a maximum of 2.5×10^4 copies per sample through the course (Table 1). The quantitative result of real-time PCR is particularly useful and crucial in tailoring an antiamebic treatment for patients because this disease tends to resist treatment. However, the use of a single set of primers and probe may be inadequate to detect all the potential *Acanthamoeba* species. In this study, we used the primers and probe designed by Qvarnstrom et al.¹² According to Thompson et al¹³ who have compared the Rivière et al¹¹ and Qvarnstrom et al¹² real-time PCR methods, both real-time PCR assays are useful for diagnosing AK with overall agreement and clinical sensitivities and specificities of 100%.

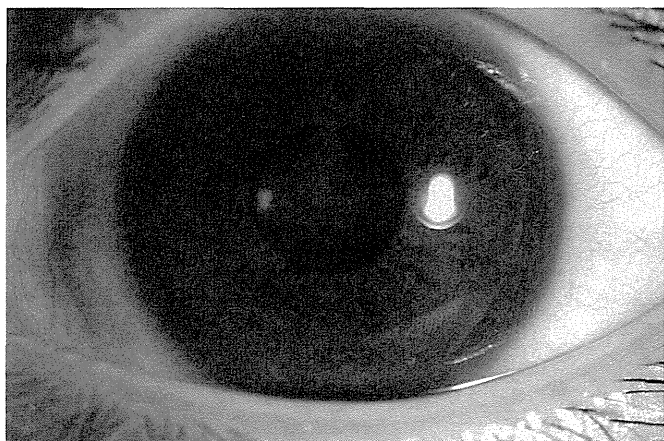


FIGURE 6. Photograph of the patient in case 2 taken on February 13, 2009 before treatment. The initial examination revealed corneal opacity and conjunctival injection in the left eye.

We therefore consider it possible to obtain a PCR result equivalent to our current findings with the Rivière et al¹¹ real-time PCR.

In case 1, culture did not detect *Acanthamoeba*. We also performed smear examination with Fungiflora Y stain, and no definite result was obtained because of the technician's inexperience. *Acanthamoeba* was subsequently detected by both real-time PCR and direct microscopic examination. In case 2, real-time PCR also showed a positive result despite the negative smear result. These results were concordant with our previous findings in which real-time PCR has proven useful in detecting the causative pathogens, although culture has failed to do so in patients with other corneal infections.¹⁵ In case 1, we also successfully quantitated *Acanthamoeba* DNA using the multipurpose solution (MPS) sample taken from the patient's contact lens case. This not only validated the reported association between the MPS use and AK^{16,17} but also demonstrated the consistent results between the PCR assays that used the MPS sample and corneal scraping. Because *Acanthamoeba* exists ubiquitously, samples from various sources can be used for clinical testing with real-time PCR in addition to the samples collected by corneal scraping, which is a painful procedure for patients.

Regardless of its usefulness, real-time PCR has some limitations such as sampling contamination and low DNA copy number. Regarding sampling contamination, we consider it reasonable to regard *Acanthamoeba* as the causative pathogen on the confirmation of its presence because *Acanthamoeba* is not part of the normal ocular surface flora. We previously performed real-time PCR for *Acanthamoeba* on tear samples collected from 10 eyes of 5 normal subjects, and none of the samples detected any *Acanthamoeba* DNA (data not shown). Because the measured DNA copy number depends on the amount of sample collected, the method used for sample collection should be carefully evaluated in addition to the condition of the cornea and the severity of the infection.¹⁸

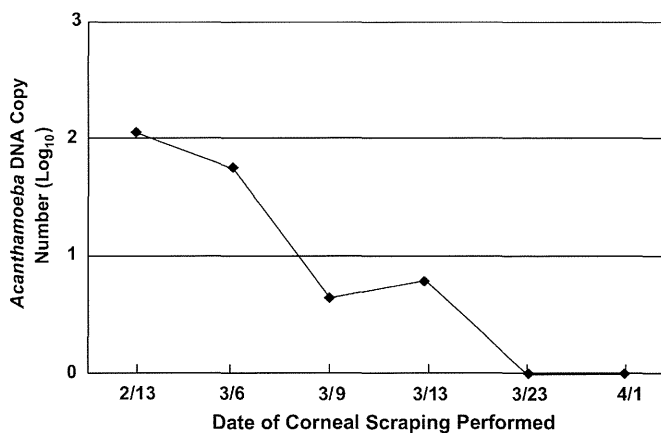


FIGURE 7. Variation in DNA copy number in case 2 similar to case 1; the *Acanthamoeba* DNA copy number also declined over the course, and finally, no DNA was detected 38 days after the treatment was initiated.

In conclusion, real-time PCR seems to be a promising supplemental method to the conventional culture and smear examination for a more rapid and accurate diagnosis of AK. Moreover, its quantitative result can play a vital role in determining treatment outcomes. Clinical features, PCR result, and findings of the routine smear and culture should all be carefully considered in treating this vision-threatening disease.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Ms Mizuno for the technical assistance and Ms Tahara for editorial support.

REFERENCES

- Patel DV, McGhee CN. *Acanthamoeba* keratitis: a comprehensive photographic reference of common and uncommon signs. *Clin Experiment Ophthalmol*. 2009;37:232–238.
- Centers for Disease Control and Prevention (CDC). *Acanthamoeba* keratitis multiple states, 2005–2007. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. 2007;56:532–534.
- 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;93:1555–1556.
- 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.
- Hahn TW, O'Brien TP, Sah WJ, et al. Acridine orange staining for rapid diagnosis of *Acanthamoeba* keratitis. *Jpn J Ophthalmol*. 1998;42:108–114.
- Lehmann OJ, Green SM, Morlet N, et al. Polymerase chain reaction analysis of corneal epithelial and tear samples in the diagnosis of *Acanthamoeba* keratitis. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1998;39:1261–1265.
- 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.
- Schroeder JM, Booton GC, Hay J, et al. Use of subgenic 18S ribosomal DNA PCR and sequencing for genus and genotype identification of *Acanthamoebae* from humans with keratitis and from sewage sludge. *J Clin Microbiol*. 2001;39:1903–1911.
- Yera H, Zamfir O, Bourcier T, et al. Comparison of PCR, microscopic examination and culture for the early diagnosis and characterization of *Acanthamoeba* isolates from ocular infections. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2007;26:221–224.
- Nakano E, Oliveira M, Portellinha W, et al. Confocal microscopy in early diagnosis of *Acanthamoeba* keratitis. *J Refract Surg*. 2004;20:737–740.
- Rivière D, Szczepara 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.
- Qvarnstrom Y, Visvesvara GS, Sriram R, et al. Multiplex real-time PCR assay for simultaneous detection of *Acanthamoeba* spp., *Balamuthia mandrillaris*, and *Naegleria fowleri*. *J Clin Microbiol*. 2006;44:3589–3595.
- Thompson PP, Kowalski RP, Shanks RM, et al. Validation of real-time PCR for laboratory diagnosis of *Acanthamoeba* keratitis. *J Clin Microbiol*. 2008;46:3232–3236.
- Kandori M, Inoue T, Takamatsu F, et al. Two cases of *Acanthamoeba* keratitis diagnosed only by real-time polymerase chain reaction. *Cornea*. 2010;29:228–231.
- Itahashi M, Higaki S, Fukuda M, et al. Detection and quantification of pathogenic bacteria and fungi using real-time polymerase chain reaction by cycling probe in patients with corneal ulcer. *Arch Ophthalmol*. 2010;128:535–540.
- Joslin CE, Tu EY, Shoff ME, et al. The association of contact lens solution use and *Acanthamoeba* keratitis. *Am J Ophthalmol*. 2007;144:169–180.
- Ku JY, Chan FM, Beckingsale P. *Acanthamoeba* keratitis cluster: an increase in *Acanthamoeba* keratitis in Australia. *Clin Experiment Ophthalmol*. 2009;37:181–190.
- Tu EY, Joslin CE, Sugar J, et al. The relative value of confocal microscopy and superficial corneal scrapings in the diagnosis of *Acanthamoeba* keratitis. *Cornea*. 2008;27:764–772.