

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

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

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

今回の調査ではHCL ケースの方が明らかに細菌、真菌

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

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

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

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

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

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

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

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

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

文 献

- 1) 福田昌彦：コンタクトレンズ関連角膜感染症の実態と疫学。日本の眼科 80：693-698, 2009.
- 2) 宇野敏彦, 福田昌彦, 大橋裕一, 下村嘉一他：重症コンタクトレンズ関連角膜感染症全国調査。日眼会誌 115：107-115, 2011.
- 3) 稲葉昌丸, 井上幸次, 植田喜一, 宇野敏彦他：重症コンタクトレンズ関連角膜感染症調査からみた危険因子の解析。日コレ誌 52：25-30, 2010.
- 4) 福田昌彦：コンタクトレンズ関連角膜感染症。あたらしい眼科 28：337-342, 2011.
- 5) Szczotka-Flynn LB, Pearlman E & Ghannoum M : Microbial contamination of contact lenses, lens care solutions, and their accessories : A literature review. Eye & Contact Lens 36 : 116-129, 2010.
- 6) Miller MJ, Wilson LA & Ahearn DG : Adherence of *Pseudomonas aeruginosa* to rigid gas-permeable contact lenses. Arch Ophthalmol 109 : 1447-1448, 1991.
- 7) Dillehay SM & Hill RM : Measures of tear exchange under rigid contact lenses : Part II. Individual systems and a population model. ICLC 18 : 71-73, 1991.
- 8) Paugh JR, Stapleton F, Keay L & Ho A : Tear exchange under hydrogel contact lenses : Methodological considerations. Invest Ophthalmol Vis Sci 42 : 2813-2820, 2001.
- 9) Nichols JJ & King-Smith PE : Thickness of the pre- and post-contact lens tear film measured in vivo by interferometry. Invest Ophthalmol Vis Sci 44 : 68-77, 2003.
- 10) 浜野 光, 荒井 忠, 小谷 稔子, 杉浦 栄一他：コンタクトレンズと前眼部生理。日コレ誌 27 : 145-152, 1985.
- 11) 山田昌和, 坪田一男：高含水率ソフトコンタクトレンズ連続装用の角膜上皮への影響—スペキュラーマイクロスコープによる検討一。あたらしい眼科 6 : 1699-1704, 1989.
- 12) 細谷比志志, 佳波真弓, 吉田弘俊, 大橋裕一他：白内障術後眼のコンタクトレンズ連続装用による角膜上皮の変化—上皮スペキュラー・マイクロスコープによる観察一。日コレ誌 32 : 108-112, 1990.
- 13) 宮下浩平, 太田誠一郎, 千葉桂三：コンタクトレンズ装用が角膜上皮に与える影響について。日コレ誌 31 : 220-225, 1989.
- 14) 黒川真理, 大谷園子, 行定節子, 金井 淳他：コンタクトレンズ装用による角膜上皮細胞への影響—内皮細胞プレブとの関連一。日コレ誌 39 : 148-152, 1997.
- 15) 山田昌和, 坪田一男：コンタクトレンズと角膜上皮。あたらしい眼科 8 : 1691-1697, 1991.
- 16) Mathers WD, Sachdev MS, Petroll M & Lemp MA : Morphologic effects of contact lens wear on the corneal surface. CLAO J 18 : 49-52, 1992.

- 17) Ladage PM, Yamamoto K, Li L, Ren DH et al : Corneal epithelial homeostasis following daily and overnight contact lens wear. *Contact Lens & Anterior Eye* 25 : 11-21, 2002.
- 18) O'Leary DJ, Madgewick R, Wallace J & Ang J : Size and number of epithelial cells washed from the cornea after contact lens wear. *Optom Vis Sci* 75 : 692-696, 1998.
- 19) Miller MJ, Callahan DE, McGrath D, Manchester R et al : Disinfection efficacy of contact lens care solutions against ocular pathogens. *CLAO J* 27 : 16-22, 2001.
- 20) 柳井亮二, 植田喜一, 田尻大治, 松本 融他 : アカントアメーバおよびウイルスに対するポビドンヨード製剤の有効性. *日コレ誌* 47 : 37-41, 2005.
- 21) Beattie TK, Tomlinson A & Seal DV : Surface treatment or material characteristic : The reason for the high level of *Acanthamoeba* attachment to silicone hydrogel contact lenses. *Eye & Contact Lens* 29 : S40-S43, 2003.
- 22) 穂積和弘, 針谷明美, 伊勢ノ海一之, 松澤亜紀子他 : 終日装用におけるシリコンハイドロゲルレンズとハイドロゲルレンズとの付着細菌, 付着タンパク質および結膜囊細菌叢の比較検討. *日コレ誌* 49 : 26-30, 2007.

(2011年8月9日受付)



筆頭著者
稲葉 昌丸

稲葉眼科

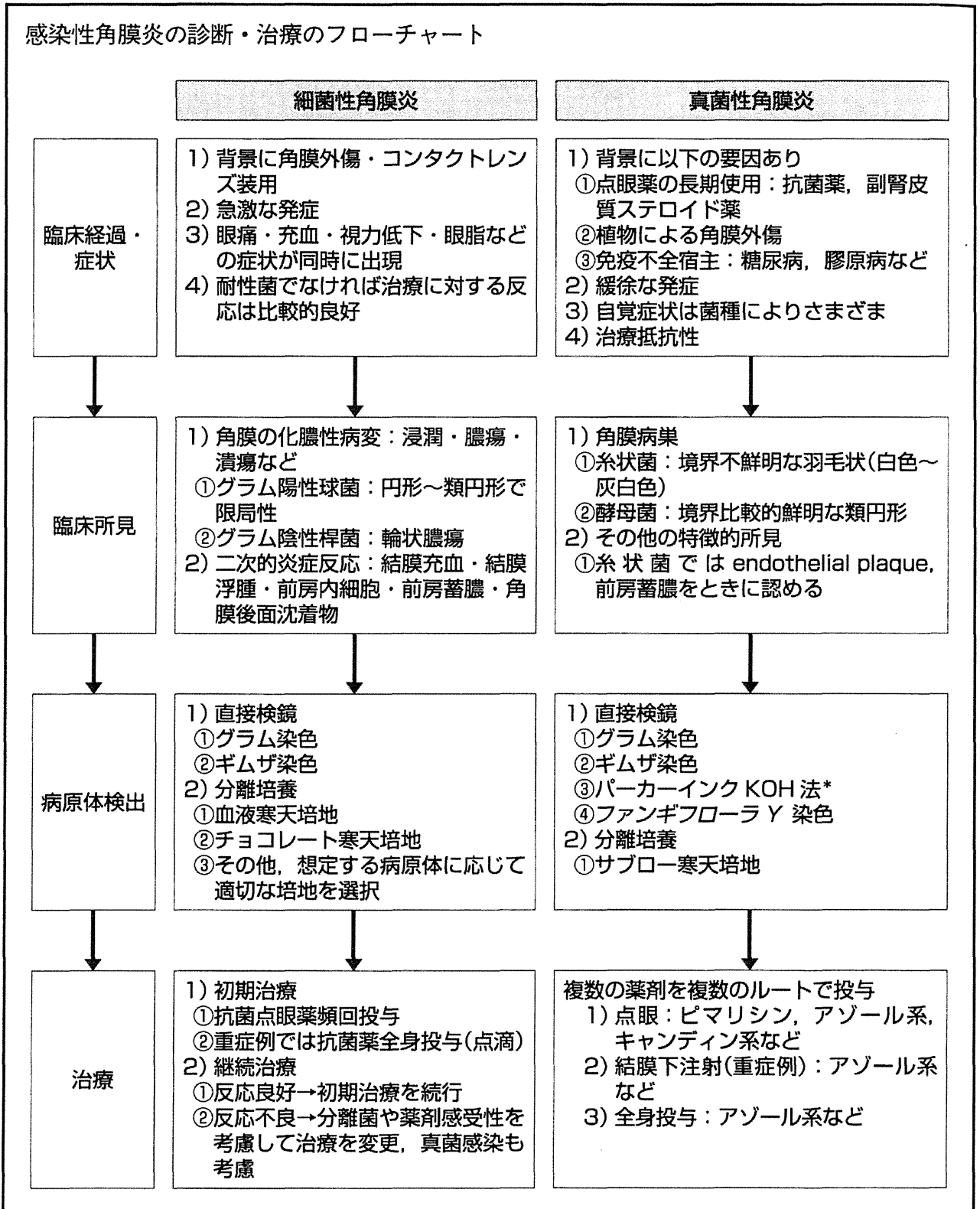
Ⅱ-5 角膜感染症

感染性角膜炎診療ガイドライン(2007)

鳥取大学医学部視覚病態学教授

井上 幸次

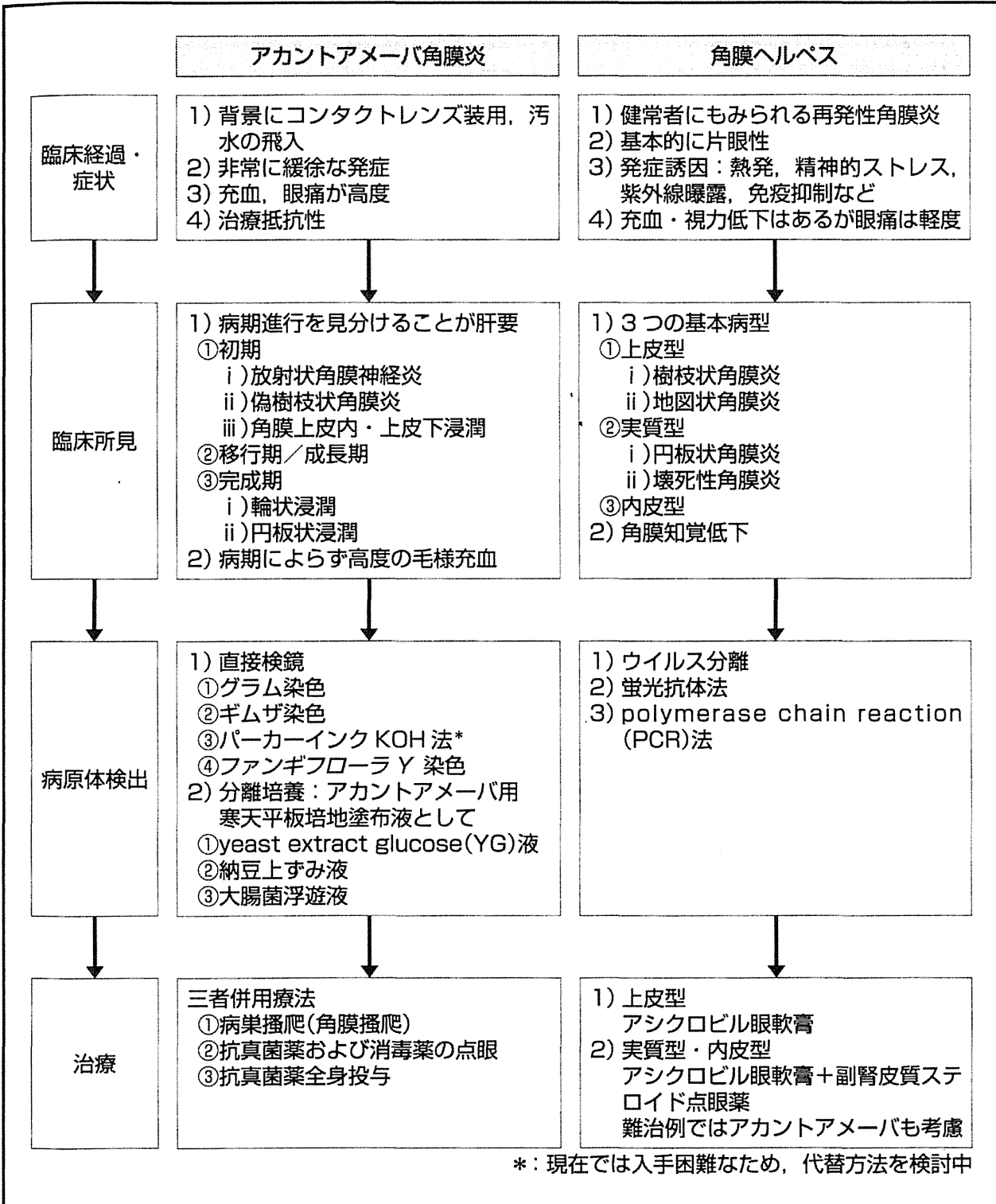
アルゴリズム



次頁につづく

つづき

眼科疾患



(日本眼感染症学会感染性角膜炎診療ガイドライン作成委員会 編: 日眼会誌 111, 770-809, 2007 より引用改変)

総説

感染性角膜炎診療ガイドラインの記載に合わせて、各疾患を分けずに概説する。各疾患別の解説は「アルゴリズム」と「具体的処方」を参照のこと。

定義

角膜に微生物が直接感染して増殖した病態。本来はそれに対してホストの免疫反応が生じて炎症を生じるのが「角膜炎」であるが、最近では医原性に免疫が抑制される状態や種々のバイオマテリアルの導入により、菌が増殖しているにもかかわらず、炎症反応を伴わない特殊な病態もみられるようになってきている。広義には、それも含めて感染性角膜炎と考えられる。

診断

◆病歴(問診)

角膜感染症においても問診が重要なものはいくつまでもない。特に何が感染のきっかけになったかを知ることが重要である。最近では外傷よりも、コンタクトレンズ(CL)の重要性が増しており、その種類(商品名も含む)、装用日数・時間(誤用がなかったか)、CLの洗浄をしていたか、CLのこすり洗いをしてきたか、CLレンズケースの定期交換をしていたか、消毒の種類 [特にマルチ・パーパス・ソリューション(MPS)の商品名]、水道水の使用はなかったか、CL装用時に手洗いをしてきたか、などについて問診する。

◆臨床所見

①細隙灯顕微鏡所見

①上皮病変(樹枝状病変, 地図状病変, 星芒状病変)

- 1) 角膜に樹枝状病変をみた場合、まず、これが単純ヘルペスウイルス(HSV)による樹枝状角膜炎(dendritic keratitis)であるかどうかを見定めることが重要である。樹枝状角膜炎の特徴として、末端膨大部(terminal bulb)の存在、上皮内浸潤の存在、ある程度の幅があること、病変部以外の上皮は正常であることがポイントとなる。
- 2) 偽樹枝状病変を示す疾患として、眼部帯状疱疹、薬剤毒性角膜炎(epithelial crack line)、再発性角膜びらん(RCE)、アcantアメーバ角膜炎が重要である。
- 3) 地図状角膜炎は樹枝状角膜炎よりも鑑別が難しく、外傷などによる単純性角膜上皮欠損(単純性角膜びらん)、細菌・真菌感染に伴う角膜上皮欠損、遷延性角膜上皮欠損、栄養障害性角膜潰瘍、シールド潰瘍などとの鑑別が必要である。
- 4) 星芒状角膜炎は樹枝状角膜炎が非常に小規模で発症し、星形と表現したほ

うが合致する病変を呈したもので、眼部帯状疱疹に伴う星芒状角膜炎、Thygeson 点状表層角膜炎などと鑑別を要する。

②実質病変：感染性角膜炎を疑わせる実質病変に、浸潤、膿瘍、潰瘍がある。

- 1) 浸潤は角膜上皮あるいは実質に生じる好中球やリンパ球を主体とする細胞集積像の総称であり、角膜炎における代表的臨床所見の1つである。一般に、中央部に生じた場合は感染性、周辺部に生じた場合は非感染性のことが多い。
- 2) 膿瘍は角膜内に侵入した細菌や真菌に対して主として好中球が集簇したものである。炎症細胞内に含まれる蛋白分解酵素や活性酸素などにより組織破壊が生じる。治癒後には通常、組織の菲薄化が生じる。
- 3) 潰瘍は角膜上皮全層および実質に欠損が生じた状態をいい、多くは浸潤から発展する。典型的な感染症のパターンでは、好中球やリンパ球を主体とした炎症細胞の集積を角膜実質内に伴う。中央部の潰瘍は感染や神経麻痺に、周辺部の潰瘍は自己免疫疾患や感染アレルギーに起因することが多い。

③その他注意すべき所見

- 1) 感染の場合、角膜病巣に目を奪われがちだが、充血・前房内細胞・前房蓄膿・角膜後面沈着物・角膜浮腫・角膜穿孔などの副次的所見が細隙灯顕微鏡にて観察され、診断・治療の上で重要なヒントとなる。
- 2) 細隙灯顕微鏡検査を行う前に眼瞼浮腫・眼瞼発赤・眼脂・流涙などの肉眼所見にも注意を払う。

②角膜知覚検査

Cochet-Bonnet 型角膜知覚計を用いて、臨床の現場で簡単に行える。古典的な方法ではあるが、特に角膜ヘルペスの診断において必要不可欠である。

◆塗抹検鏡

- ①角膜感染症の診断において、塗抹検鏡は非常に重要である。ガイドラインに記載された方法が唯一の方法ではないので、その施設に応じたやり方を工夫していけばよいと思われる。たとえば、ガイドラインでは擦過に、Kimura spatula を推奨しているが、自分が使いやすい器具であればスパーテルでも、27 ゲージ針でもよい。また、採取したサンプルの塗抹にあたって、サンプル量が比較的多ければ転がすように塗抹し、少なければスタンプを押すようにすると書かれているが、角膜炎の場合、多くはサンプル量が十分でなく、スタンプ法を選択せざるをえない。また、角膜炎ではサンプル量が少ないためにギムザ染色とグラム染色の両者を行うことは実際には難しいことが多いので、どちらか一方をとる場合はグラム染色を優先する。
- ②真菌については、パーカーインク KOH 法が基本であるが、現在パーカーインクは入手困難なため、ファンギフローラ Y 染色が役立つ。このほうが検鏡に不慣れな検者でも真菌と判定しやすい。

◆臨床検査

- ①細菌培養・感受性検査、真菌培養・感受性検査、アカントアメーバ培養、

PCR 法，血清抗体価などを駆使して診断する。

- ②特に最もよく理解しておく必要があるのは，起炎菌と薬剤感受性についてである。
- ③起炎菌については，外眼部には多くの常在菌が存在するため，塗抹の結果と分離菌名の比較，分離菌名と炎症像の特徴の確認，分離菌名と薬剤治療効果（感受性スペクトル）などを考慮し，総合的に決定する必要がある。
- ④薬剤感受性については，一般に最小発育阻止濃度(MIC)によって判定されるが，R(resistant；耐性)と判定された場合でも，点眼薬の場合は濃度が非常に高いため効果が得られる場合もあることを知っておくとよい。
- ⑤PCR 法については，特にヘルペスで使用された場合は，HSV が人体に潜伏感染しており，しかも spontaneous shedding を生じてくるために，補助診断として位置づけられているが，最近では real-time PCR 法によって定量が可能となっており，量的に多い場合は，それによって診断を行ってよいと考えられる。

▶ 治療方針

「具体的処方」を参照のこと。

最近の話題

ガイドラインには掲載されていないが，最近サイトメガロウイルス(CMV)が前眼部感染症の原因となることが注目されている。網膜炎と異なり，免疫正常者に虹彩炎・内皮炎の形で発症する。内皮炎の特徴的な所見として，角膜後面沈着物が輪状に配列する coin lesion が知られている。眼圧上昇の合併が多く，内皮が減少している続発性緑内障ではかなりの割合で CMV 性である可能性が示唆されている。診断は前房水を採取して PCR 法を行い，CMV-DNA を証明することによる。治療はガンシクロビル点滴・点眼，バルガンシクロビル内服などの抗 CMV 療法による。



ガイドライン活用のポイント

- ▶ ガイドラインはあくまで診療のためのベースラインにすぎない。特に感染症は，感染する微生物と感染した個体と，その周囲の環境などの3つが複雑に入り混じった結果で生じる大変複雑な病態であり，無数の組み合わせで千変万化し，例外が山のようにある。さらに治療方法の variation も非常に多い。ガイドラインは単にその中の典型的な例に対する代表的な対応を記載しているにすぎない。ガイドラインを実地臨床でうまく活用するには，それを咀嚼して応用する必要がある。マニュアル的に鵜呑みにして使用してもうまくいかないことが多々ある。

具体的処方

細菌性角膜炎

病型分類	処方例	ポイント
<p>【治療方針】</p> <p>①起炎菌に対して感受性のある抗菌薬を使用することに尽きるが、起炎菌を同定できるまで、あるいは同定できないときには、患者背景・発症誘因および角膜所見に基づいて起炎菌を推測し、治療計画を立てる。起炎菌を推測できない場合には、角膜炎の主な原因菌を網羅できるようにフルオロキノロン系とβ-ラクタム系の点眼を併用して頻回点眼を行う。重症例では抗菌薬の点滴静注を併用する。</p> <p>②培養検査で細菌を検出した場合には薬剤感受性試験を行い、感受性のある薬剤を第一選択とする。ただし、どこから菌を検出したか、塗抹検鏡と培養検査の結果が同じか、角膜所見と整合性があるかなどを考慮する。</p> <p>③近年では細菌性角膜炎において、抗菌薬のほとんどに感受性を示さない多剤耐性菌を検出する頻度が増えている。検出される耐性菌としては、メチシリン耐性黄色ブドウ球菌(MRSA)が最も多く、その他にはメチシリン耐性表皮ブドウ球菌(MRSE)、ペニシリン耐性肺炎球菌などがある。しかし、点眼薬中の薬剤は高濃度であるため、耐性と示されていても、すでに使用しており効果があればそのまま継続して差し支えない。MRSA、MRSE に対してはガイドライン作成以後にバンコマイシン眼軟膏1%が上市され使用可能であるが、厳重な管理のもとに使用が行われている。</p> <p>④重篤な細菌性角膜炎で角膜穿孔を生じた場合には、内服による眼圧下降を図り、安静を保って感染症治療を続行する。やむをえない場合は治療的角膜移植を行うが、可能であれば感染が鎮静化した後に、必要に応じて角膜移植を考慮する。</p> <p>【病型分類】</p> <p>①肺炎球菌：上気道などに存在するグラム陽性双球菌で、突き眼などを契機に角膜炎を生じる。角膜病変は限局性膿瘍であるが、潰瘍病変が生体防御能の弱い中央方向へ移動することがあり、匍行性角膜潰瘍と呼ばれる。莢膜を有する肺炎球菌は好中球による貪食に抵抗するため、重篤になりやすい。深部に進展し、穿孔することがある。</p> <p>②ブドウ球菌：眼表面など至るところに存在するグラム陽性球菌である。角膜炎を生じるのは大半が黄色ブドウ球菌であるが、表皮ブドウ球菌などのコアグラウゼ陰性ブドウ球菌(CNS)も状況により起炎菌となりうる。角膜病変は限局性膿瘍で、重篤化することはまれである。ただ、MRSAが増加しているように、ブドウ球菌は耐性を獲得しやすく、治療上問題となる。</p> <p>③コリネバクテリウム：眼表面(結膜や眼瞼)の常在菌叢をなすグラム陽性桿菌であり、角膜炎の起炎菌とはなりにくいとガイドラインには記載されているが、その後、結膜炎、角膜炎の起炎菌となっている症例がかなり多いことがわかってきており、今後のガイドライン改訂で改められるであろうと思われる。</p> <p>④緑膿菌：グラム陰性桿菌で、日和見感染菌とされているが、角膜炎を惹起すると重篤な症状を来す。典型的な角膜病変は輪状膿瘍を伴った潰瘍で、周囲角膜はスリガラス状混濁を呈する。また、急速に進行し、穿孔をきたすことがある。CL、特にソフトCLの装用に関連した緑膿菌性角膜炎が多くみられる。</p> <p>⑤モラクセラ：大型のグラム陰性双桿菌であり、以前から眼角眼瞼結膜炎の起炎菌として知られているが、全身状態の不良例では中央に角膜炎を生じることがある。</p>		
		<p>ガイドラインには具体的処方については触れていないため、advanced remedyの線引きは困難である。また、多くの例では当初起炎菌が不明のため、このような理想的な形がとれないことも多い。</p>

病型分類	処方例	ポイント
▶肺炎球菌	①～③を併用し、重症例では④を使用 ①ベガモックス点眼液 ②ベストロン点眼液 いずれも1回/時 ③タリビッド眼軟膏 1回/日，就寝前 ④セファメジン α 点滴 静注用 0.5g \times 2回/日，点滴 静注	肺炎球菌に関しては①のような新しいキノロン薬の方が古いキノロン薬よりも効果が高い。 ②は溶解後1週間が使用期限であるので注意を要する。
▶ブドウ球菌 i) MSSA, MSSE の場合	①～③を併用し、重症例では④を使用 ①ベガモックス点眼液 またはクラビット点眼液 ②ベストロン点眼液 いずれも1回/時 ③タリビッド眼軟膏 1回/日，就寝前 ④セファメジン α 点滴 静注用 0.5g \times 2回/日，点滴 静注	
ii) MRSA, MRSE の場合	①または②を使用し、重症例では③を併用 ①オフサロン点眼液 1回/時 ②バンコマイシン眼軟膏 4回/日 ③塩酸バンコマイシン点滴 静注用 0.5g \times 2回/日，点滴 静注	①に含まれているクロラムフェニコールは、再生不良性貧血の副作用のため全身薬としては現在あまり用いられないため、逆にMRSAで交叉耐性を示さないことが多い。ただ、バンコマイシンほどに効果は高くない。 ②の保険適応に角膜炎は正式にはなっていない。MRSA結膜炎に合併した角膜炎ということで使用することになる。

病型分類	処方例	ポイント
▶ コリネバクテリウム	①～③を併用する ①ベストロン点眼液 ②トブラシン点眼液 いずれも1回/時 ③タリビッド眼軟膏 1回/日, 就寝前	コリネバクテリウムはフルオロキノロン製剤に対する耐性化が進んでいるが, セフェム系やアミノグリコシド系の薬剤は効果がある。
▶ 緑膿菌	①～③を併用し, 重症例では④を使用 ①クラビット点眼液 ②トブラシン点眼液 いずれも1回/時 ③タリビッド眼軟膏 1回/日, 就寝前 ④チエナム点滴静注用 0.5g×2回/日, 点滴静注	緑膿菌はベガモックス点眼の適応菌種にはなっていない。 ②は殺菌力が強く, 感染初期に用いるには適しているが, 漫然と使用していると上皮修復を妨げるので注意が必要である。 ④の長期使用は慎むべきである。
▶ モラクセラ	①～③を併用する ①クラビット点眼液 ②ベストロン点眼液 いずれも1回/時 ③タリビッド眼軟膏 1回/日, 就寝前	

真菌性角膜炎

病型分類	処方例	ポイント
<p>【治療方針】眼科領域で使用される抗真菌薬には、ポリエン系・アゾール系・カンディン系・ピリミジン系の4つがある。これらのうち、眼局所用の医療用医薬品として存在するのは、ポリエン系のピマリシン(点眼液・眼軟膏)のみであり、他はすべて自家調整の形で臨床に用いられる。これらの薬剤は、作用機序・抗真菌スペクトル・副作用などが異なるため、起炎菌に応じて使い分ける必要がある。全身状態と薬剤の副作用に注意しながら、複数の薬剤を複数のルート(点眼、結膜下注射、全身投与)で使用するのが基本的な戦略である。本症が疑われた場合には、入院下に集中的な医療を行うことが推奨される。</p>		
<p>【病型分類】</p>		
<p>①糸状菌：白色ないし灰白色の境界不鮮明な病巣を呈することが多い。これは hyphate ulcer と呼ばれ、糸状菌感染に特徴的な所見である。角膜実質内の病変とともに角膜内皮面に円板状に付着する、いわゆる endothelial plaque がみられるのも特有の所見であり、前房内の強い炎症と前房蓄膿を伴う。感染の初期においては、たとえ前房にまで感染が及んでいる状態でも角膜実質の層構造があまり破壊されないのも糸状菌の特徴である。</p> <p>②酵母菌：病巣は境界が鮮明な円形を呈していることが多く、角膜実質浅層に局限していることが多い。病巣の角膜実質の融解傾向は強い。細菌感染による病巣と似たところが多く、細菌学的な検査による鑑別が重要である。</p>		
<p>▶糸状菌</p>	<p>①②のいずれか、または併用に③を追加</p> <p>①ピマリシン眼軟膏 またはピマリシン点眼 5回/日</p> <p>アドバンスド</p> <p>②ブイフェンド 【適応外処方】 点滴用製剤を生食に溶解し1%に調製、1回/時、点眼</p> <p>アドバンスド</p> <p>③ブイフェンド静注用 【適応外処方】 200mg(体重により増減)×2回/日、点滴静注</p>	<p>①ピマリシンは真菌に対して殺菌的に働き、スペクトルも広いが、充血や角膜上皮障害などの副作用もあり、点入時の刺激も強い。特に点眼で著明である。</p> <p>②は真菌性角膜炎で最も重症であるフザリウムに効果がある。水によく溶け、また、点眼した際の副作用も少ない。全身投与では羞明・霧視などの一過性の視覚障害の副作用がある。</p>
<p>▶酵母菌</p>	<p>①②を併用</p> <p>①ジフルカン 【適応外処方】 点滴用製剤をそのまま使用、0.2%、1回/時、点眼</p> <p>②イトリゾール 100mg×1回/日、食直後</p>	<p>①酵母菌のカンジタには効果があるが、糸状菌には効果が低い。全身投与の場合はプロドラッグであるプロジフを使用するが、角膜にはプロジフを代謝する酵素がないので、プロジフを点眼しても意味がない。</p> <p>②は使用しやすいので長期投与になりがちだが、肝機能障害などの副作用に注意が必要である。</p>

アカントアメーバ角膜炎

病型分類	処方例	ポイント
<p>【治療方針】 本疾患には特効薬がなく、三者併用療法(病巣搔爬, 点眼薬, 全身投与)が現時点では最も効果がある。アカントアメーバ角膜炎と確定診断された場合, 当初は週2~3回の病巣搔爬を行い, クロルヘキシジングルコン酸塩, ミコナゾール, フルコナゾール(ジフルカン)を起きてから寝るまで頻回点眼する。さらにイトラコナゾール(イトリゾール)150~200 mg(3~4錠)を1日1回朝食後内服させる。これを行いながら病状をみて搔爬回数, 点眼薬の種類と回数, 内服量の加減を行う。</p>		
<p>【病型分類】</p>		
<p>①初期: 一般に感染から1ヵ月以内の時期に相当する。角膜上皮・上皮下混濁(点状, 斑状, 線状), 偽樹枝状角膜炎を認めるが, 初期のアカントアメーバ角膜炎にきわめて特徴的な所見として, 輪部から中央へ向かう神経に沿って認められる線状の浸潤があり, 放射状角膜神経炎(radial keratoneuritis)といわれている。</p> <p>②完成期: 一般に感染から1ヵ月以降の時期に相当する。輪状浸潤(角膜中央を中心とした横長楕円の形態。上皮欠損を生じて輪状潰瘍となる場合もある), 円板状浸潤(角膜中央の大きな横長楕円の浮腫と混濁。上皮欠損を生じて円板状潰瘍となる場合もある)を呈する。ときに豚脂様角膜後面沈着物, 前房蓄膿を伴う。</p>		
	<p>アドバンスド</p> <p>①~④を併用</p> <p>①ジフルカン 【適応外処方】 点滴用製剤をそのまま使用, 0.2%, 1回/時, 点眼</p> <p>②ブイフェンド 【適応外処方】 点滴用製剤を生食に溶解し1%に調製, 1回/時, 点眼</p> <p>③0.02%クロルヘキシジン 【適応外処方】 1回/時, 点眼</p> <p>④イトリゾール 200 mg×1回/日, 食直後</p>	<p>病期により処方を分けることはガイドラインでは推奨されておらず, またそのような方法も確立されていない。ここでは代表的な処方を1つ挙げるに留める。処方例に加えて搔爬が重要である。</p> <p>③消毒薬であり, 栄養体のみならず, シストにも効果があるが, 角膜への浸透性は不良である。</p> <p>④アゾール系の抗真菌薬はアメーバの栄養体には効果があるが, シストには効果がない。</p>

角膜ヘルペス

病型分類	処方例	ポイント
<p>【治療方針】</p> <p>①上皮型：アシクロビル(ゾビラックス)眼軟膏(5回/日)の投与が原則である。感染予防の目的で抗菌点眼薬を併用してもよい。投与期間は最長3週間を原則とし、上皮型の再発防止を目的とした継続投与は行うべきではない。</p> <p>②実質型：副腎皮質ステロイド点眼薬により免疫反応を抑制する。ゾビラックス眼軟膏の併用が必要である。ゾビラックス眼軟膏を使用せず副腎皮質ステロイド点眼薬のみで対処すると当初は軽快するが、再発・再燃が生じやすく、経過中に上皮型を発症することもある。</p> <p>③具体的な実質型治療のポイント：ベタメタゾンリン酸エステルナトリウム(リンデロン)などの強い副腎皮質ステロイド点眼薬から始めて、状態をみながら回数を減らし、1~2ヵ月で0.1%フルオロメトロン(フルメトロン)などの弱い副腎皮質ステロイド点眼薬に変更し、その後回数を漸減して3~4ヵ月を目処に中止する。軽症の場合は0.1%フルメトロンから開始する。</p> <p>薬物療法に反応しない強い瘢痕性の角膜混濁が残った場合は、角膜移植術の適応となる。</p> <p>【病型分類】</p> <p>①上皮型：初感染の場合を除き、三叉神経節に潜伏感染しているHSV(多くはHSV-1, HSV-2はまれ)の再活性化により、ウイルスが神経節から下行性に角膜上皮に到達し、上皮細胞に感染を起こすことによる。特徴的な樹枝状角膜炎、地図状角膜炎を呈する。</p> <p>②実質型：角膜実質細胞に感染したHSVに対する免疫・炎症反応により起こる病変である。基本病変は円板状角膜炎であり、主として角膜中央にDescemet膜皺襞を伴う円形の実質浮腫が、病巣内に小型~中等大の角膜後面沈着物がみられる。実質浅層を中心とした混濁と病巣部の境界に沿って免疫輪がみられる。前房炎症を伴うことがある。さらに進展すると壊死性角膜炎となり、角膜実質に血管侵入、瘢痕形成、脂肪変性などの病変がある症例で、再発を起こすと実質浮腫とともに、強い炎症細胞の浸潤が起こる。</p>		
▶ 上皮型	①②を併用 ①ゾビラックス眼軟膏 5回/日 ②クラビット点眼液 3回/日	①高頻度に点状表層角膜症を生じるが、軽度なら、量や回数を減じて継続が可能である。 ②上皮型では上皮欠損を生じているので、抗菌点眼薬を混合感染予防に投与するのが無難である。
▶ 実質型	①②を併用 ①フルメトロン(重症ではリンデロン)点眼液 0.1% 3回/日 ②ゾビラックス眼軟膏 3回/日	ステロイド点眼のみでも当初は軽快するが、②でウイルス増殖を抑制しておかないと後で必ず増悪する。上皮型も誘発される。

Effect of Photodynamic Therapy with Methylene Blue on *Acanthamoeba* In Vitro

Tsuyoshi Mito,¹ Takashi Suzuki,^{1,4} Takeshi Kobayashi,^{2,3} Xiaodong Zheng,¹ Yasuhiro Hayashi,¹ Atsushi Shiraiishi,^{2,3} and Yuichi Ohashi^{1,4}

PURPOSE. To evaluate the disinfectant effect of methylene blue (MB)-mediated photodynamic therapy (PDT) on a pathogenic strain of *Acanthamoeba*.

METHODS. *Acanthamoeba castellanii* (ATCC 50370) used in this study were treated under one of four experimental conditions: light irradiation and incubation in MB (L+M+), light irradiation and incubation in physiologic solution (L+M-), incubation in MB only (L-M+), and incubation in physiologic solution (L-M-). M+ trophozoites were incubated in either 0.25 or 0.5 mM MB for 10 minutes. L+ organisms were irradiated for 30 minutes following incubation in solution. A halogen lamp (660 ± 10 nm) with a maximum output of 6 mW/cm² was used as the PDT light source. After treatment, antiacanthamoeba activity was evaluated by checking the respiratory activity of the amoeba with 5-cyano-2,3-tetrazolium chloride (CTC) staining. We also determined whether the effect of PDT with MB had been retained or augmented when it was performed in combination with conventional antiamebic agents.

RESULTS. MB-PDT suppressed the respiratory activity of trophozoites in an MB-concentration-dependent manner at total light doses of 10.8 J/cm². The respiratory activity of each group as a percentage of that of L-M- is as follows: L+M+ 11.6% (0.5 mM), 60.9% (0.25 mM); L-M+ 116.5% (0.5 mM), 105.5% (0.25 mM); L+M- 107.6%; and L-M- 106.3%. (L+M+ versus L-M- *P* < 0.05). MB-PDT had a synergistic effect when used in combination with polyhexamethylene biguanide (PHMB) or amphotericin B, but not with voriconazole.

CONCLUSIONS. MB-PDT is effective against *Acanthamoeba* in vitro and has synergistic effects with PHMB and amphotericin B. (*Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2012;53:6305-6313) DOI:10.1167/iops.12-9828

Acanthamoeba keratitis (AK) is a severe and sight-threatening ocular infection, which usually occurs in the context of soft contact lens (SCL) wear or trauma. *Acanthamoeba* are morphologically classified as trophozoites, which can take up

nutrition and proliferate, and dormant cysts, which resist insults from high temperatures, dryness, and drugs. *Acanthamoeba* can change into trophozoite or cyst form to adjust to various environments.¹ Treatment is usually carried out with a combination of antifungal medications, primarily biguanides such as polyhexamethylene biguanide (PHMB) and chlorhexidine, and diamidines such as propamidine isethionate and hexamidine. However, these medications can often be toxic to the cornea. In addition to medication, sometimes epithelial debridement is performed to make a histologic diagnosis of amoebal infection, or to physically remove amoeba and increase penetration of medication into the tissue.^{1,2} However, even when these therapies are combined, many cases are resistant to treatment, and ultimately 5% to 30% of cases are reported to require therapeutic or optical corneal transplant.³⁻⁷ Due to the rapid emergence of cases, new therapies or prophylaxis regimens for AK are urgently needed.

Riboflavin and UV light-induced cross-linking have been reported to constitute a mechanical treatment for corneal infection, which can be expected to produce immediate effects.⁸⁻¹⁰ Photodynamic therapy (PDT), performed with a light source and a photosensitizer (PS), has garnered attention as another form of antimicrobial therapy.¹¹⁻¹³ PDT takes advantage of the capacity of PS to accumulate in certain target cells. After the PS is administered and irradiated by light of a certain wavelength, it is excited from the ground state through the excited singlet state to a triplet state. In the presence of oxygen, the PS undergoes reactions that produce reactive oxygen species and induce cell damage via oxidative stress.^{11,13,14} Since the PS localizes to certain cells, only target cells in the irradiated area are damaged. Various types of PS are used in PDT, but methylene blue (MB; wavelength of maximum absorption: 600-660 nm), a phenothiazinium PS, has been particularly widely used in histology for more than 100 years. MB has the potential to treat a variety of cancerous and noncancerous diseases, with low toxicity and no side effects.^{15,16} Phenothiazinium PS is known to exhibit antimicrobial effects after exposure to light, and many reports indicate that PDT is effective against bacteria, viruses, and protozoa.¹⁷⁻²¹ However, there are no reports of using PDT with MB (MB-PDT) to treat acanthamoeba infection, and it is not clear whether PDT is effective against amoeba or how MB acts on the organism.

The aim of the present study was to investigate the in vitro amoebicidal effect of two therapies: MB-PDT, and riboflavin and ultraviolet A cross-linking. We also sought to determine whether the effect of MB-PDT is retained or augmented when it is performed in combination with conventional antiamebic agents.

MATERIALS AND METHODS

Organisms and Culture

All studies were performed with *Acanthamoeba castellanii* strain ATCC 50370 (American Type Culture Collection, Manassas, VA), which

From the departments of ¹Ophthalmology, ²Ophthalmology and Regenerative Medicine, and ³Stem Cell Biology, Ehime University Graduate School of Medicine, Ehime, Japan; and the ⁴Department of Infectious Diseases, University of Ehime, Ehime, Japan.

Supported in part by a Grant-in-Aid for Scientific Research (KAKENHI) from the Japan Society for the Promotion of Science: Challenging Exploratory Research KAKENHI Grant 23659812.

Submitted for publication March 9, 2012; revised July 23, 2012; accepted August 18, 2012.

Disclosure: T. Mito, None; T. Suzuki, None; T. Kobayashi, None; X. Zheng, None; Y. Hayashi, None; A. Shiraiishi, None; Y. Ohashi, None

Corresponding author: Takashi Suzuki, Department of Ophthalmology, Ehime University Graduate School of Medicine, Shitsukawa, Toon, Ehime 791-0295, Japan; t-suzuki@m.ehime-u.ac.jp.

was originally isolated from a case of AK. Trophozoites were axenically grown in peptone-yeast extract-glucose (PYG) medium at 25°C in a tissue-culture flask (Becton Dickinson, Tokyo, Japan). Encystment was induced by transferring the trophozoites from the PYG medium to Neff's constant-pH encystment medium²² and incubating the trophozoites for at least 2 weeks at 25°C. Another pathogenic strain of *Acanthamoeba castellanii* (ATCC 30868) and four clinical isolates of *Acanthamoeba* from patients diagnosed with AK in the Ehime Institute of Ophthalmology in 2009 and 2010 were used for comparison purposes.

Preparation of Photosensitizer and Irradiation Source

Methylene blue (MB) (Sigma-Aldrich, Inc., St. Louis, MO) was dissolved in deionized water to give a 10 mM stock solution and stored in the dark until use. It was then diluted by the appropriate volume to obtain the test solutions and filter-sterilized using a 0.22- μ m pore size membrane filter. The light source used was a halogen lamp (noncoherent LC-122A; LumaCare, Newport Beach, CA), equipped with a band-pass filter probe to isolate the 650- to 670-nm wavelength interval. The fluence rate was measured by a power meter device with a thermal sensor (10A; Ophir Optronics Ltd., Jerusalem, Israel) and display (FieldMate laser power meter; Coherent Inc., Santa Clara, CA).

Acanthamoeba Respiratory Activity Assay

To estimate the efficacy of treatment, the 5-cyano-2,3-ditoly-tetrazolium chloride (CTC) biocidal assay was performed as described previously²³ to assess the respiratory activity of *Acanthamoeba*. Briefly, reagents from the bacterial staining/CTC staining kit (Bacstain-CTC Rapid Staining Kit; Dojindo Laboratories, Kumamoto, Japan) were added to samples, and cells were incubated for 30 minutes at 25°C according to the manufacturer's recommendations. Each amoeba suspension was tested in quintuplicate, and fluorescence intensity was measured with a fluorescence microplate reader (FlexStation 3; Molecular Devices, Sunnyvale, CA; excitation, 480 nm; emission, 630 nm). Sodium azide was used to inhibit respiration in samples used as negative controls.

Cell Photosensitization Studies

The phototoxicity of MB toward trophozoites and cysts was examined as a function of the MB concentration. Trophozoites or cysts were collected from a flask, washed with PBS, and centrifuged at 150g for 10 minutes, resulting in a pellet of 4×10^6 organisms. The pellets were resuspended in various concentrations of MB solution (0, 0.05, 0.1, 0.25, and 0.5 mM) and incubated for 10 minutes in the dark. After incubation, the organisms were washed and resuspended in 4 mL of PBS. The amoeba suspension was divided into two portions, and each 2 mL portion was transferred to a 35-mm petri dish. The cover of each dish was removed and a probe was placed above the dish to measure light irradiation intensity. One dish was irradiated with light from a halogen lamp at an intensity of 6 mW/cm² for 30 minutes, resulting in light doses of 10.8 J/cm². The other dish was kept in the dark for 30 minutes. The irradiated and nonirradiated trophozoites were collected from the dishes and the respiratory activity of each sample was measured using the CTC biocidal assay. The CTC biocidal assay was also performed on cysts as described.²³ After treatment with PDT, cysts were preincubated for 16 hours in PYG medium to facilitate the CTC biocidal assay.

The effect of light irradiation dosage on *Acanthamoeba* was also studied. Trophozoites (4×10^6 organisms) were incubated in 0.5 mM MB solution for 10 minutes following the experimental protocol described above. The cells were subsequently transferred to a 35-mm petri dish and were irradiated with light for either 5, 10, 20, or 30 minutes, resulting in light doses of 1.8, 3.6, 7.2, and 10.8 J/cm², respectively. To evaluate the effect of pulse irradiation, samples were

irradiated with 5- or 10-minute pulses of light at 10-minute intervals, for a total of 30 minutes of irradiation and a total light dose of 10.8 J/cm². All experiments were carried out with a control group kept in the dark as described earlier.

Microscopic observations of samples before and after PDT were made with a phase-contrast microscope at $\times 200$ magnification without fixation. Subconfluent cultures of trophozoites were incubated in 0.5 mM MB solution for 10 minutes, and gently washed with PBS twice, taking care to keep the trophozoites from detaching from the bottom of the dish. Afterward, the dishes were refilled with PBS. Trophozoites were irradiated for 30 minutes and, immediately after irradiation, the dish was placed in a dark area for 150 minutes. Photographs were obtained with a differential interference contrast device (Zeiss Axio Observer Z1; Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Jena, Germany) before irradiation, after 10, 20, and 30 minutes of irradiation, and 150 minutes after the completion of irradiation. For the purpose of comparison, control groups were also observed after being treated under the following three conditions: incubation in PBS and no irradiation (L-M-), incubation in PBS and irradiation (L+M-), incubation in MB, and no irradiation (L-M+). Finally, cell viability and survival rate at 150 minutes after the completion of irradiation (or nonirradiation) were determined by trypan blue exclusion^{24,25} and the culture-dependent biocidal assay,^{26,27} respectively. The survival rates of PDT-treated cysts were also determined by the culture-dependent biocidal assay. To check for morphologic changes in trophozoites after PDT, transmission electron microscopy (TEM) was performed using standard procedures described elsewhere.^{28,29} Ultrathin sections (<60–80 nm) were double-stained with uranyl acetate and lead citrate and examined with a transmission electron microscope (JEM 1230; JEOL Ltd., Tokyo, Japan) at 100 kV.

Combined Antiamoebic Drug and Photodynamic Therapy

PHMB, amphotericin B, and voriconazole were used as antiamoebic drugs to determine whether antiamoebic drugs have a synergistic effect with PDT. PHMB was diluted in 1/4 Ringer's solution to obtain test solutions with final concentrations of 1, 2.5, 5, 10, 25, 50, and 100 ppm. Amphotericin B (Fungizone; Bristol-Myers K.K., Tokyo, Japan) was reconstituted in sterile Millipore-filtered water and diluted to concentrations of 100, 200, 400, 800, and 1600 μ g/mL. Voriconazole (Vfend; Pfizer, Tokyo, Japan) was reconstituted in sterile Millipore-filtered water and diluted to concentrations of 40, 100, 400, 1000, 4000, and 10,000 μ g/mL. To evaluate the effect of each antiamoebic drug alone, 4×10^6 trophozoites were incubated in different concentrations of each antiamoebic drug for 60 minutes. Then the cells were washed and the CTC biocidal assay was performed. Based on the results of preliminary experiments with MB and antiamoebic drug monotherapy, sublethal concentrations of each solution were selected to test in combination against trophozoites, to evaluate for a synergistic effect. To assess the effect of combination therapy, 4×10^6 trophozoites were incubated with each antiamoebic drug for 60 minutes, washed with PBS twice, incubated with MB solution in the dark for 10 minutes, and irradiated as described above. After irradiation at 10.8 J/cm² (or nonirradiation), cells were collected from dishes and the CTC biocidal assay was performed.

Riboflavin and Ultraviolet A Light Treatment

Trophozoites (4×10^6 organisms) were incubated for 60 minutes in the dark in a riboflavin solution with 20% Dextran 500 (Medio-Cross; Medio-Haus Medizinprodukte GmbH, Rostock, Germany). Afterward, the cells were washed and pellets were resuspended in 4 mL of PBS. The suspension was divided into two portions, and each 2 mL portion was transferred into a 35-mm petri dish. The cover of the dish was removed and the suspension was exposed to an Ultraviolet A (UVA) light source (365-nm wavelength; UVL-56 handheld UV Lamp; UVP Inc., Upland, CA) for 1 hour at an intensity of 3 mW/cm² as measured

by a UV light meter (J-221, 365 nm; UVP Inc.). After irradiation, samples were collected and the CTC biocidal assay was performed. The CTC biocidal assay was also performed on control samples treated under the following conditions: PBS incubation only, UVA exposure only, and riboflavin solution incubation only.

Statistical Analyses

In the cell photosensitization studies for trophozoites and cysts, the light and dark groups were compared using the Student's *t*-test, assuming equal variances. One-way ANOVA was performed to determine whether there were significant differences between the different test conditions. If a significant difference was found between the groups as a whole, Dunnett's tests were performed to determine where these differences occurred. $P < 0.05$ was used to indicate statistical significance.

RESULTS

Effect of Photodynamic Therapy on Trophozoites and Cysts

The light irradiation-mediated effect of PDT was evaluated at various concentrations of MB (Fig. 1A). First, we confirmed that there was no significant decrease in trophozoite respiratory activity due only to light irradiation (10.8 J/cm²) by comparing trophozoites incubated in PBS and irradiated (PBS light group) with those not irradiated (PBS dark group). Next, we evaluated the concentration-dependent effect of MB with and without light irradiation. In the dark groups, there was no difference between the respiratory activity of trophozoites incubated at any MB concentration below 0.5 mM and that of the PBS dark control group. In the light groups, PDT was not effective when carried out at concentrations of MB of 0.05 and 0.1 mM. However, at higher concentrations of MB, the efficacy of PDT was found to increase in a concentration-dependent manner. When trophozoites were incubated in 0.5 mM MB for 10 minutes, and subsequently irradiated for 5 (1.8 J/cm²), 10 (3.6 J/cm²), 20 (7.2 J/cm²), or 30 minutes (10.8 J/cm²), respiratory activity was found to be significantly less than that of the dark control group (Fig. 1B). In addition, when trophozoites were exposed to 5- or 10-minute pulses of light at 10-minute intervals (total irradiation time 30 minutes), the effect of PDT was found to be equally as strong as that in the group that received 30 minutes of continuous irradiation. With regard to cysts (Fig. 1C), a significant difference in respiratory activity was noted between the dark and light groups at all tested concentrations of MB.

Figure 2A shows the condition of trophozoites before and after irradiation following incubation in MB. Untreated organisms (L-M- group), organisms only irradiated (L+M- group), and organisms only incubated in MB (L-M+ group) were used as control groups. Before irradiation, trophozoites in all groups adhered to the bottom of the dish, and no morphologic differences were observed between the groups (Fig. 2A, a, b, c, d). In the control groups, almost no change was noted over time (Fig. 2A, e, f, g). In contrast, trophozoites in the PDT group began to become round (data not shown) and detach from the bottom of the dish after approximately 10 minutes of irradiation, and after 30 minutes, almost all of the trophozoites were detached and floating in the medium (Fig. 2A, h). Figure 2B shows the percentage of viable cells in each group identified by trypan blue staining 150 minutes after irradiation ended. In the L-M-, L+M-, and L-M+ groups, 94.1%, 97.0%, and 89.8% of trophozoites failed to stain with trypan blue, respectively, whereas the cell viability for the PDT group was 0.6%, substantially lower than the controls. When

the trophozoite survival rate was assessed by a conventional culture-dependent biocidal assay, the survival rates were 111.4%, 103.1%, 111.4%, and 8.5% for the abovementioned groups (Fig. 2C), showing a trend similar to that obtained by trypan blue staining. Cyst survival rates were 103.2%, 111.4%, 96.8%, and 55.4% for the abovementioned groups (Fig. 2D).

TEM of control trophozoites demonstrated characteristic features such as multiple acanthopodia on the cell surface, mitochondria, vacuoles, plasma membrane, densely packed cytoplasm, and the nucleus (Fig. 3A). No appreciable difference could be observed between the morphology of control L-M-, L-M+, or L+M- trophozoites (Figs. 3B, 3C). The majority of the cells treated with MB-PDT showed structural damage, such as severely depleted cytoplasmic contents. Moreover, in these cells, the nucleus was no longer visible, whereas the mitochondria were not noticeably altered (Fig. 3D).

Effect of Photodynamic Therapy on Clinical Isolates

The effects of MB incubation, light irradiation, and MB-PDT were also tested using several additional amoebic strains, including two types of *Acanthamoeba castellanii* from ATCC and four clinical isolates from patients with infectious keratitis. Respiratory activity in each strain after treatment under each condition is shown in the Table. MB-PDT induced significant loss of respiratory activity, with mean values ranging from 0% to 27% in the six strains.

Effect of Combined Photodynamic Therapy and Antiamoebic Drug Therapy

In this portion of the study, PDT was conducted under the following conditions. Trophozoites were irradiated at 10.8 J/cm² after incubation for 10 minutes in 0.1 mM MB, the MB concentration at which trophozoite respiratory activity was not affected in previous experiments. The efficacy of each individual antiamoebic drug was evaluated with the CTC biocidal assay in a preliminary experiment (data not shown), and the effects of combination therapies were investigated using concentrations of each drug that were judged to produce a weak effect in the preliminary experiment (e.g., 1 and 2.5 ppm PHMB, 100 and 200 µg/mL amphotericin B, 400 and 1000 µg/mL voriconazole). PHMB and amphotericin B were found to have a synergistic effect with MB-PDT. Combination therapy of PHMB and 0.1 mM MB without irradiation reduced trophozoite respiratory activity significantly, compared with single-agent therapy with PHMB. When irradiation was added to this treatment regimen, respiratory activity significantly decreased to 2.9% and 2.2% of the control for groups treated with 1 and 2.5 ppm PHMB, respectively (Fig. 4A). A similar trend was noted with amphotericin B. When amphotericin B-treated trophozoites were incubated in MB, no change was observed in respiratory activity. In contrast, when irradiation was added, respiratory activity decreased to 2.8% and 3.3% of the control for amphotericin B concentrations of 100 and 200 µg/mL, respectively (Fig. 4B). No synergistic effect was observed with MB-PDT and voriconazole (Fig. 4C).

Effect of Riboflavin/UVA Combination Therapy on Trophozoites

Figure 5 shows the effect of combination riboflavin and UVA irradiation therapy on trophozoite respiratory activity. The respiratory activity of trophozoites irradiated with UVA for 60 minutes at an intensity of 3 mW/cm² was 111.7% of that of the

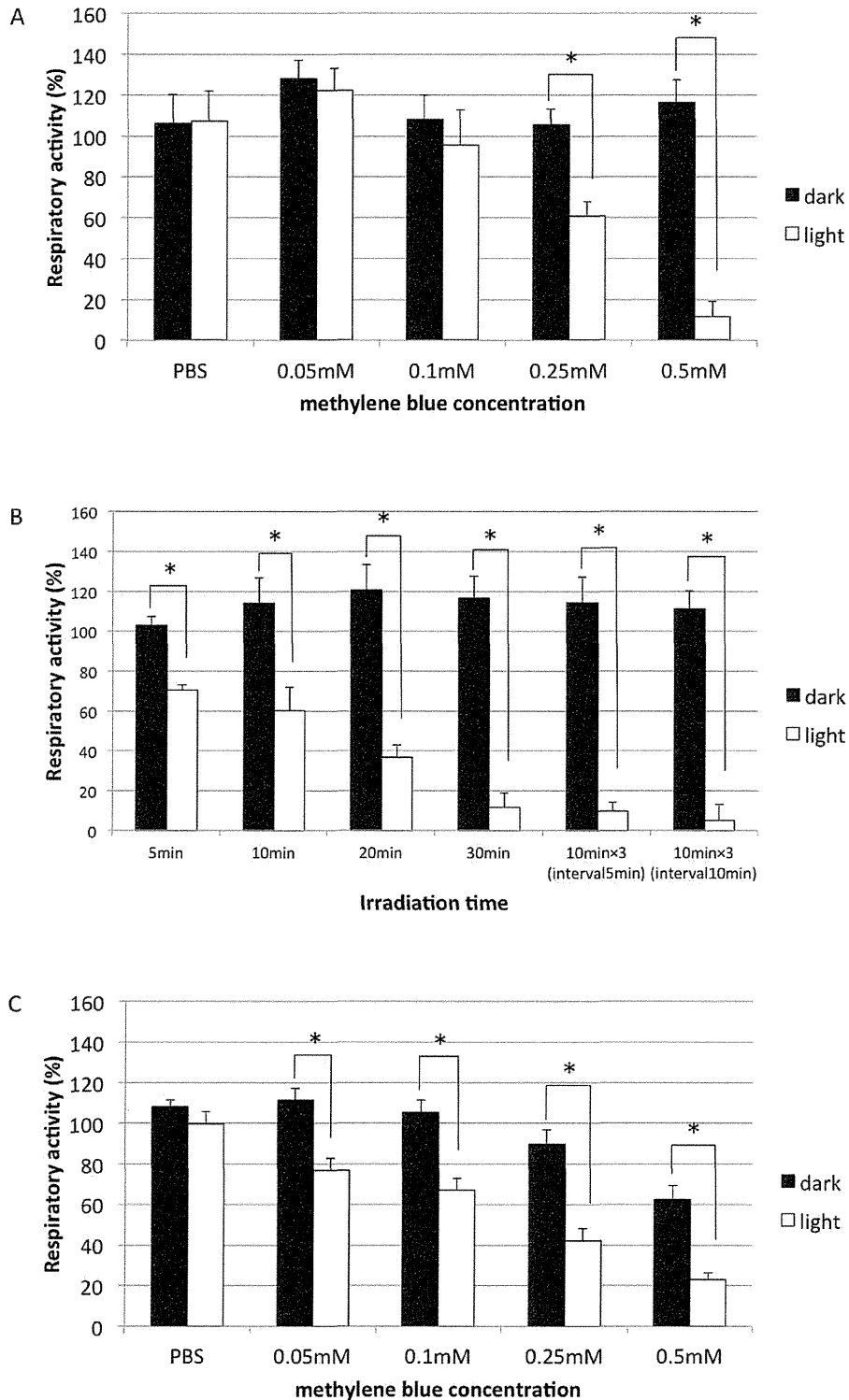


FIGURE 1. Average amoebicidal effects of photodynamic therapy. Irradiated groups were incubated in MB for 10 minutes, washed with PBS three times, and then exposed to light from a halogen lamp (660 nm). A value of 100% was assigned to the respiratory activity of control untreated cells. (A) Trophozoite respiratory activity as a function of MB concentration with or without light irradiation for 30 minutes (total light dosage of 10.8 J/cm²). **P* < 0.05, compared with the dark cells. (B) Effect of irradiation time on phototoxicity of 0.5 mM MB against trophozoites. Cells were irradiated with light for 5, 10, 20, and 30 minutes, resulting in light dosages of 1.8, 3.6, 7.2, and 10.8 J/cm², respectively. Additional samples were exposed to 5- or 10-minute pulses of light at 10-minute intervals, for a total of 30 minutes of irradiation and a light dosage of 10.8 J/cm². The respiratory activity in all irradiated groups was significantly different from that of the dark group (**P* < 0.05). (C) Cyst respiratory activity as a function of MB concentration with or without light irradiation for 30 minutes (total light dosage of 10.8 J/cm²). **P* < 0.05, compared with the dark cells.

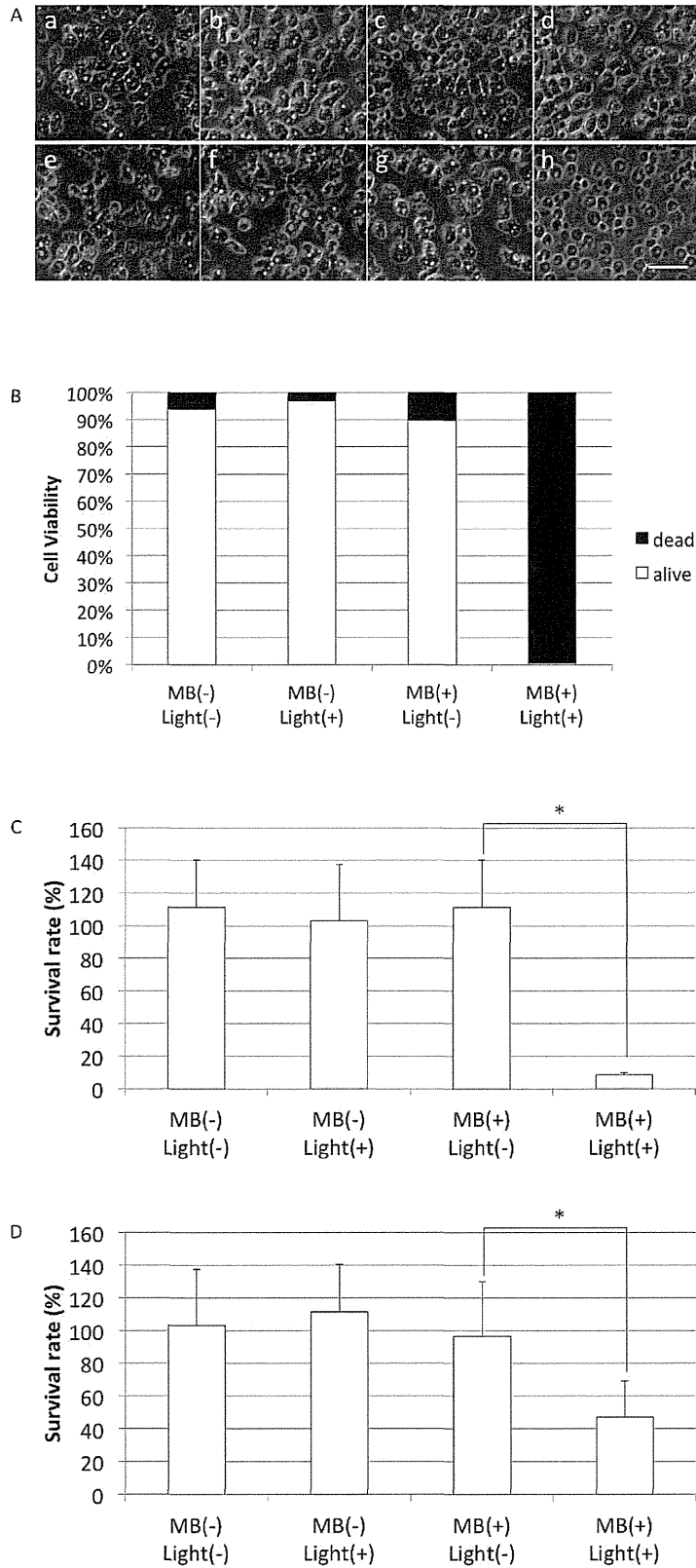


FIGURE 2. (A) Light microscope (phase-contrast) images of trophozoites before light exposure (a-d) and 150 minutes after light exposure (total light dosage of 10.8 J/cm²) (e-h). (a, e) L-M- group; (b, f) L+M- group; (c, g) L-M+ group; (d, h) L+M+ group. Bar: 50 μm. (B) Comparison of cell viability after each treatment regimen. Cell viability was assessed via trypan blue exclusion performed 150 minutes after the completion of light irradiation. (C) Comparison of survival rate after each treatment regimen. Survival rate was assessed by culture-dependent biocidal assay. **P* < 0.01, compared with the dark cells. (D) Survival rate for cysts after treatment with 0.5 mM MB-PDT. **P* < 0.05, compared with the dark cells.

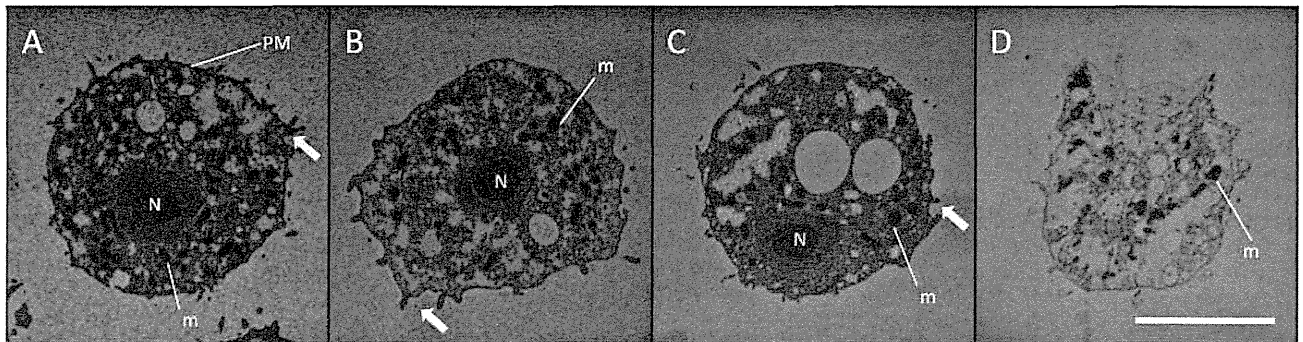


FIGURE 3. Transmission electron microscopy of *Acanthamoeba* trophozoites. (A) Untreated control trophozoites show characteristic morphological features: acanthopodia (arrow), plasma membrane (PM), mitochondria (m), and a large centrally located nucleus (N). (B) L+M- trophozoites and (C) L+M+ trophozoites were not different from untreated cells in morphology. (D) In L+M+ trophozoites, the plasma membrane was ruptured, cytoplasmic contents were severely depleted, and the nucleus was not defined. Bar: 10 μ m.

untreated control organisms. When trophozoites were incubated in 0.1% riboflavin for 60 minutes without UVA irradiation, the respiratory rate was 104.0% of the control. The respiratory rate was 91.9% of the control when trophozoites were treated with a combination of 0.1% riboflavin and UVA irradiation. No significant difference was noted between any of these treatment regimens and the untreated control group.

DISCUSSION

The work outlined here is directed toward the development of PDT as a novel method for the treatment of AK. The findings described in the present study indicate that the phenothiazinium dye MB has a photodynamic effect on *Acanthamoeba* when the microorganism is in both the trophozoitic and cystic stages.

A few experimental investigations have demonstrated that PDT conducted with tetracationic phthalocyanine (RLP068)^{30,31} or perylenequinonoids (hypocrellin B)³² can effectively kill *Acanthamoeba*, but no previous reports have addressed important issues related to the clinical application of PDT, such as necessary irradiation time, comparative efficacy against different clinical strains, synergistic effects with antimicrobial drugs, or comparison with other treatments that use a light source.

Our findings suggest that the CTC biocidal assay can be used as an alternative method to assay for living *Acanthamoeba* organisms instead of the conventional culture-dependent assay using the most probable number (MPN) method³³ or the Spearman-Kärber method.^{26,27} The culture-dependent biocidal assay requires 1 to 3 weeks of cultivation of trophozoites and

cysts, respectively, to detect surviving *Acanthamoeba*. In contrast, the CTC biocidal assay can be carried out in only a few hours for trophozoites (30 minutes for staining and 30 minutes for fixation after the treatment), and in a day for cysts, which require preincubation for 16 hours before CTC staining. In addition, in both our MB-PDT experiments and a previous study that evaluated treatment of *Acanthamoeba* with PHMB and SCL disinfectants,²³ the respiratory activity determined by the CTC biocidal assay was confirmed to be significantly correlated with the survival rate determined by the culture-dependent biocidal assay.

We chose to use MB as the PS in our PDT experiment because MB has low toxicity.³⁴⁻³⁹ Shih and Huang¹⁹ reported that no complications were seen after instillation of 1% (approximately 31 mM) MB on denuded cornea four times per day for 3 days. Intact epithelia prevent MB from staining intact rabbit cornea, so debridement is thought to be necessary for local eye drop administration of MB. In the actual treatment of AK, epithelial debridement has many other benefits, including facilitation of histologic diagnosis of amoebal infection, physical removal of amoeba, and penetration of medication. Since MB has low toxicity, it can be used in combination with epithelial debridement without being problematic, especially if debridement is carried out locally in the area of the lesion.

Another reason we chose MB is that MB is positively charged, enabling it to rapidly bind to the negatively charged cell membrane, mitochondrial membrane, or nucleic acids. Since mitochondrial membranes and nucleic acids have a stronger negative charge than that of the cell membrane, if MB is taken into the cell, it is likely to localize in mitochondria, lysosomes, and areas with nucleic acids.¹⁵ Targeting mitochondria is an important research subject in PDT, since it is thought that damaging mitochondria may induce the apoptotic cascade.⁴⁰ However, in our experiment, mitochondria were not found to be decreased in the MB-PDT group compared with the other group. Instead, our TEM findings showed a notable disappearance of nucleic acids in most trophozoites that underwent MB-PDT. From these findings, it appears that in the present experiment, the direct effect of MB-PDT on nucleic acids may play a more important role in the amoebicidal mechanism of MB-PDT than apoptosis mediated by mitochondrial damage. This may be the case because MB is hydrophilic and an ideal nucleic acid intercalator due to its small size (MW 319.85 g/mol) and linear tricyclic heteroaromatic structure.¹¹

In the present experiment, there was no significant difference between the efficacy of 30 minutes of continuous irradiation and 30 minutes of irradiation divided into three pulses. These results suggest that the effect of PDT on

TABLE. Effect of PDT on Several Amoebic Strains Including Clinical Isolates from Patients with Infectious Keratitis

Amoebic Strain	Light, 10.8 J/cm ²	Methylene	Methylene
		Blue, 0.5 mM	Blue + Light
ATCC 50370 (<i>A. castellanii</i>)	108%	116%	12%
ATCC 30868 (<i>A. castellanii</i>)	113%	94%	0%
Clinical isolate A	113%	135%	19%
Clinical isolate B	137%	141%	27%
Clinical isolate C	108%	83%	11%
Clinical isolate D	83%	84%	15%

Respiratory activity in each group is expressed as a percentage of activity in control untreated trophozoites.