

液体培養法を用いたソフトコンタクトレンズ保存ケース中における アカントアメーバの増殖抑制法に関する基礎的研究

及 川 陽 三 郎

要 約：【目的】 アカントアメーバ角膜炎は、身近な生活環境に生息する自由生活性アメーバによる疾患で、ソフトコンタクトレンズ (SCL) 保存ケース内で発育したアメーバが重要な感染源となっている。本研究では、保存ケース内での病原アメーバの発育抑制を目的とする基礎的検討を行った。【方法】 著者らが考案した液体培養法を用いて、アメーバの臨床分離株のケース内における発育要件について検討した。SCLの洗浄、消毒および保存液であるマルチパーパスソリューション (MPS) について、アメーバの発育抑制効果やシストの付着抑制効果を検討した。また、シャーレに付着したシストをMPSで剥離可能であるかについても検討した。【結果】 アメーバは水道水中でもある程度の細菌数があれば十分発育できたが、MPS中では発育できなかった。臨床分離株には、シストの付着性が強いものと弱いものがあった。シストはMPSを満たしたシャーレには付着できなかったが、保存ケースでは洗浄後にシストの残留が若干認められた。シャーレに付着しているシストは、トリブシンやドデシル硫酸ナトリウム液で剥離できたが、MPSではできなかった。【結論】 保存ケースにMPSを常に満たしておけば、ケース内でのアメーバの発育を完全に抑制でき、混入したシストの付着を大幅に抑制できることから、アカントアメーバ角膜炎を効果的に予防できる。

キーワード：アカントアメーバ、ソフトコンタクトレンズ保存ケース、マルチパーパスソリューション (MPS)、液体培養法

緒 言

アカントアメーバ角膜炎は、角膜の潰瘍や混濁を伴い重度の視力障害をもたらすことがある疾患である (1, 2)。1974年に初めて英国で報告され (3)、わが国では1988年に報告されて以来 (4)、ソフトコンタクトレンズ (SCL) 使用者を中心に増加傾向にある (5)。その病原アメーバは、身近な生活環境中で自由生活し (6)、増殖形態である栄養体は、水中の微生物を摂食しているが、生息環境の悪化に伴いシストに変形して、乾燥や化学物質に対して抵抗型となり1年以上の生存が可能となる (7)。このシストは室内塵中にも高率に検出され、SCL保存ケース中へ混入する機会も多い (8, 9)。

アカントアメーバ角膜炎の診断は、放射状角膜神経炎などの特異な臨床症状からこれを疑い、角膜擦過物の直接検鏡法や培養法で棘状の偽足を持つ栄養体や二重壁構造のシストの形態を持つアメーバを検出することにより確定される (4, 10)。

角膜炎の病原アカントアメーバの分離培養は、通常、寒天培地で行われる (11, 12)。しかし、この寒天培養法では培養中のアメーバをシャーレのまま経時的に直接観察することが難しい。そこで我々は、寒天を溶解するために使用されるアメーバ生食水に大腸菌の死菌を添加した液体培地中で角膜擦過物からアメーバを直接分離培養する方法 (以下、液体培養法と呼称) を確立し、さらに臨床分離株を液体培養法により10年以上培養維持している。我々は、液体培養法を用いて臨床分離株の薬剤感受性試験を実施し、アカントアメーバ角膜炎の点眼薬として経験的に使用されているフルコナゾールやミコナゾールがアカントアメーバのシストをほとんど殺滅できないことを示した (13)。また、液体培養法ではアカントアメーバのシストが栄養体になることなく、シャーレの底面に付着するという現象が新たな知見として得られた。この現象を利用して、臨床的にアカントアメーバ角膜炎に有効であると報告されているピマリシン (14) のように不溶性かつ非透光性の薬剤に対するシストの感受性試験を実施し、この薬剤が*in vitro*でもアメーバのシストに対し殺滅作用を持つことを報告した (15)。以上より、この液体培養法はアカントアメーバの発育増殖にとって従来の寒天培養法と遜色ないものと考えられ、アメーバ発育増殖の経時的かつ定量的評価が可能である点は、従来法より優れている。また、

金沢医科大学大学院医学研究科生体感染防御学(医動物学)
石川県河北郡内灘町大学1-1
平成26年12月22日受理

SCL保存ケース内でアメーバが発育増殖する状態に近い環境が再現できるものと考えられる。

SCLの消毒法としては、過酸化水素水などを用いたコールド消毒法が一般に薦められる(16, 17)。しかしこの方法では、洗浄および保存を消毒作用のない生理的食塩水などで行う必要があり、操作が煩雑となるばかりか、装着後のSCLを入れて保存したりそれを再使用したりできない。マルチパーパスソリューション(multi-purpose solution: MPS)は、SCLの洗浄、消毒および保存を同じ液で行え、使い勝手の良さからレンズ・ケア液の主流になっている(18, 19)。現在、SCL保存ケースの消毒は行われていないが、通常は、SCLの消毒がこのケース内で行われる時に、同時に消毒されていると考えられる。然るに過酸化水素水で消毒した使用後のSCLを直接生理的食塩水の入った保存ケースに戻したり、MPSの不携帯により代わりに水道水を使用したりした場合は、保存ケース内での雑菌などの繁殖は免れられない。

アカントアメーバのシストがSCL保存ケースや角膜上に混入する機会は非常に多いものと思われる。しかし日本国内で1,500万人を超えるコンタクトレンズ使用者に対し、アカントアメーバ角膜炎の症例は数百件程度とされる(20)。これは、シストの状態のアメーバが角膜に接触しても、そのほとんどが涙液で洗い流されるためと考えられる。従って、角膜へのアメーバ感染はSCL保存ケースに混入したシストがいったん栄養体となった後、SCLの装着時などに角膜に運ばれた場合に成立する可能性が高いものと考えられる(21, 22)。

本研究では、患者より分離されたアカントアメーバ株を用いて、水道水や生理的食塩水などの各種溶液中での発育試験を行うとともに、発育に必要な温度や培地中の細菌数について検討した。また、いくつかの銘柄のMPSによるアカントアメーバの増殖抑制効果やSCL保存ケースに混入したシストがケース壁に付着する現象について我々が考案した液体培養法を用いて基礎的に検討し、アカントアメーバ角膜炎の予防法について考察した。

実験方法

1. 材料

1) アカントアメーバ株：臨床材料より分離培養で得られた20株で、株番号#1-20を用いた。このうち#1-10は国立感染症研究所より分与を受けた。#11および#19株は角膜炎患者が使用していたSCL保存ケースよりの分離株で、その他は患者の角膜擦過物よりの分離株である。16SrDNAの塩基配列に基づく遺伝子型(23)は、大部分がT4グループに分類されたが、#6株はT3グループおよび#7株はT5グループだった(表1)。

2) アメーバ生食水：0.5mM tris-HCl緩衝液(pH6.8)に最終濃度0.012% NaCl, 0.00035% KCl, 0.0003% CaCl₂および0.0004% MgCl₂・6H₂Oとなるように調整したものを、ポアサイズ0.45μmのミリポアフィルターでろ過滅菌して使用した(11)。

3) 給餌用大腸菌死菌：大腸菌強化培地にて1晩培養した大腸菌を60℃で1時間加熱して用いた。

4) 培養用シャーレ：6cmプラスチックシャーレ(ポリスチレン製, greiner bio-one)を用いた。

5) SCL保存ケース：ボシュロム社のSCLケア液に無料添付されたポリプロピレン製ケースを用いた。

6) マルチパーパスソリューション(MPS)：主要成分として抗アメーバ薬(24, 25)のポリヘキサニド(polyhexamethylene biguanide: PHMB)を1および0.7ppm含有する2銘柄(MPS1,2)とこれを含有しない1銘柄(MPS3)を用いた(表2)。

2. 液体培養法によるアカントアメーバの分離培養および観察

臨床現場にて、ポリスチレン製遠心チューブ(15ml: BD Falcon)に容れたアメーバ生食水5ml中で角膜擦過物を採取したスパーテルを攪拌してアメーバをアメーバ生食水に接種し

表1. 実験に使用したアメーバ株

株	遺伝子型*	由来	採取地
#1	未同定	角膜擦過物	国立感染症研究所
#2	T4a	角膜擦過物	国立感染症研究所
#3	T4i	角膜擦過物	国立感染症研究所
#4	T4a	角膜擦過物	国立感染症研究所
#5	T4a	角膜擦過物	国立感染症研究所
#6	T4c	角膜擦過物	国立感染症研究所
#7	T3	角膜擦過物	国立感染症研究所
#8	T5	角膜擦過物	国立感染症研究所
#9	T4a	角膜擦過物	国立感染症研究所
#10	未同定	角膜擦過物	国立感染症研究所
#11	T4a	保存ケース	金沢医科大学病院
#12	T4d	角膜擦過物	金沢医科大学病院
#13	T4b	角膜擦過物	金沢大学附属病院
#14	T4a	角膜擦過物	金沢大学附属病院
#15	T4d	角膜擦過物	金沢大学附属病院
#16	T4a	角膜擦過物	金沢大学附属病院
#17	T4a	角膜擦過物	金沢大学附属病院
#18	T4d	角膜擦過物	金沢大学附属病院
#19	T4a	保存ケース	金沢大学附属病院
#20	T4i	角膜擦過物	金沢大学附属病院

*16S rDNAの塩基配列に基づく分類。Rahman M. et al.,2013(23)による。

表2. 使用したMPSの表示成分

MPS	表示成分
1	ポリヘキサニド(PHMB) 0.7ppm, 硼酸, ポロキサミン
2	ポリヘキサニド(PHMB) 1ppm, エデト酸塩
3	塩化ポリドロンウム 11ppm, クエン酸緩衝液 0.0011%

た。これを6cmのプラスチックシャーレに移し、餌となる大腸菌死菌を3滴（菌数約 10^{10} 個/mlアメーバ生食水）添加して27℃で培養した。増殖したアメーバを液体培地で維持して臨床分離株とした。観察はシャーレのまま、位相差型倒立顕微鏡下100倍で行った。

3. アcantアメーバの発育状況および付着シストの残留の判定

アcantアメーバの発育状況の判定は、観察日における10視野以上の観察で、栄養体が認められずシストのみしか観察されない場合を陰性(-)とし、アメーバは発育できなかったものと判定した。また、栄養体が認められるがその数が全虫体数の1%以下である場合を偽陽性(±)とし、ほとんど発育増殖していないものとした。以下、栄養体数が2-25%である場合を(+), 26-89%の場合を(++) および90%以上の場合を(+++)とし、栄養体の発育増殖の程度(発育状況)を判定した(図1)。

付着シストの残留の判定は、シャーレの全面を観察し、シストが認められる場合は、各処理後にシストが残留していると判定した。一方、シストが認められない場合は、シストの残留がないと判定した。

4. 各種溶液中でのアcantアメーバの発育試験

アメーバ生食水中で給餌せずに2週間以上培養してシスト化した臨床分離株#11のアcantアメーバ1,000個を、アメーバ生食水、蒸留水、リン酸緩衝液pH7(PB), リン酸緩衝生理的食塩水(PBS), 生理的食塩水および水道水を各々5ml入れたシャーレで、アメーバ生食水中での培養でアメーバの十分な発育増殖が認められた大腸菌死菌添加量である3滴を給餌して培養し、発育状況を6日間経時的に判定した。

5. 各培養温度によるアcantアメーバの発育試験

シスト化した臨床分離株3株(#11-13)のアcantアメーバそれぞれ1,000個ずつを、アメーバ生食水を入れたシャーレに入れ、5, 10, 15, 20, 35および40℃の各温度で大腸菌死菌を3滴給餌して3日間培養し、発育状況を判定した。

6. 各給餌大腸菌死菌数におけるアcantアメーバの発育試験

シスト化した#11株のアcantアメーバ1,000個を、大腸菌死菌添加量を 10^4 - 10^7 個/mlの7段階に分けたアメーバ生食水中で3日間培養し、発育状況を判定した。

7. MPS感受性試験

アcantアメーバのシストのSCL保存ケース中での増殖に対するMPSの効果を検討するため、臨床分離株3株(#11-13)を用いて、以下のA-C法により行った。

A法(MPS中のシストに対するMPSの発育抑制効果を検証): MPSを5ml入れたシャーレに、アメーバのシスト1,000個を入れ、大腸菌死菌を3滴給餌して27℃で培養した。

B法(遊離シストに対するMPSの発育抑制効果を検証): MPSを5ml入れた15mlの遠心管に、アメーバのシスト1,000個を入れて攪拌し、27℃で1晩処理後、遠心して上清を除去し、新たにアメーバ生食水を加えた。同様の操作を3回繰り返してシストを洗浄し、最後に、洗浄されたシストにアメーバ生食水を加えてシャーレに入れ、大腸菌死菌を3滴給餌して培養した。

C法(付着シストに対するMPSの発育抑制効果を検証): SCL保存ケースにアメーバ生食水1ml中に懸濁したシスト1,000個を入れ、1.5時間放置して、シストをケースに付着せしめた後、上清を吸引除去し、MPSを加えて27℃で1晩処理した。その後、

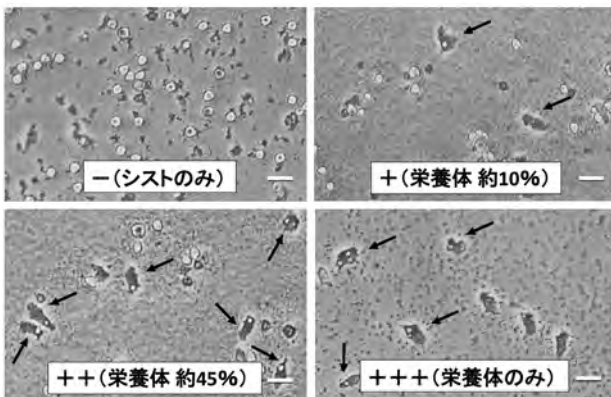


図1. アcantアメーバ発育状況の判定
(-)ではシストのみが観察され、栄養体は認められない。(++)では運動性があり収縮胞(虫体内の白く抜けた泡状の部分)を開閉する栄養体のみが観察される。栄養体の割合が、(+)では全虫体数の約10%であり、(++)では約45%である。
→は栄養体(scale bar = 30μm)。
発育判定基準を次のように定めた(本文参照)。-: 栄養体は認められない(シストのみ); ±: 栄養体は存在するが全体の1%以下; +: 栄養体は2-25%; ++: 栄養体は26-89%; +++: 90%以上が栄養体。

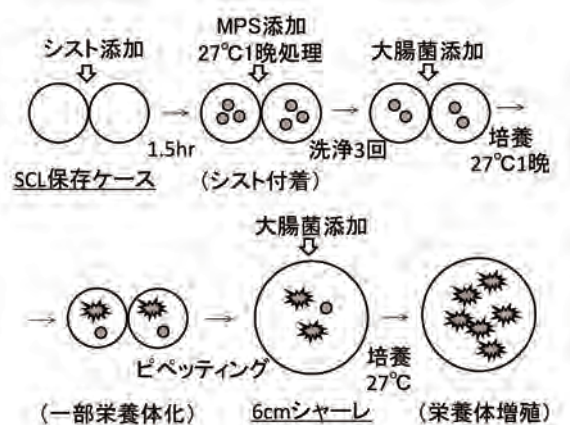


図2. SCL保存ケースへ付着したアcantアメーバシストのMPS感受性試験(C法)の概略
SCL保存ケースにシストを添加して室温で1.5時間静置し、上清を除去後にMPSを添加して27℃で1晩静置する。アメーバ生食水で3回洗浄した後、大腸菌を1滴添加して27℃で1晩培養する。ピペッティングしてケースに付着しているアメーバを剥がした後に、直径6cmのシャーレに入れ大腸菌を2滴添加して27℃で培養を継続する。

MPSを吸引除去し、アメーバ生食水を加えて、軽く振盪後上清を吸引除去した。これを3回繰り返して、ケースに残留しているMPSを洗い流した。最後に、アメーバ生食水1mlと大腸菌死菌を最終給餌菌量(3滴)の1/3量である1滴加えて、保存ケースのまま27℃で1晩培養した。翌日、強いピペッティングによりアメーバをケースより剥がして、シャーレに移し、アメーバ生食水4mlと大腸菌死菌を最終給餌菌量の残量である2滴加えて27℃で培養を継続した(図2)。

各法の対照には、MPS処理の代わりにアメーバ生食水を用いて同様の処理を行った。連日、栄養体の有無を観察し、1週間の観察期間中にもっとも発育した状況を記録して、栄養体が期間中認められなかった場合を感受性ありと判定した。

8. シストの付着性に関する試験

アカントアメーバ臨床分離株ごとのシストについて、付着性の強弱の判定を行い、付着性の強い株について、MPSの付着抑制効果および付着シストの剥離効果を観察するため、以下の実験を行った。

1) シストの付着性の判定：大腸菌死菌を給餌せずに2週間培養してシスト化させた臨床分離株20株について、培養中のシャーレを位相差型倒立顕微鏡で観察しながら振盪し、5か所以上検討して大部分のシストがシャーレの底面に固着して動かない場合を付着性が強いアメーバ株と判定した。反対に、ほとんどのシストが遊離していて動く場合を付着性が弱いと判定した。また、固着したシストと遊離したシストが混在していた場合は、混在と判定した。

2) MPSによるシストの付着抑制試験：SCL保存ケースに3銘柄のMPSを満たした後、付着性の強いアメーバ株#16、#18および#20のシスト1,000個を入れた。1晩放置した後、上清の吸引除去とアメーバ生食の添加を5回繰り返して洗浄して、遊離しているシストをできるだけ除去した。最後にアメーバ生食水を添加した後、シストを剥離させる目的で強くピペッティングしてケース内容液をシャーレに移し、位相差型倒立顕微鏡で残留していたシストの有無を観察した。シストの残留の程度によって、シストの付着が抑制されたかを判定した。また、MPSを満たしたプラスチックシャーレにシストを入れた後、同様に洗浄して観察した。対照としては、MPSの代わりにアメーバ生食水を満たしたケースおよびシャーレを用いた。

3) 付着シストの化学的剥離試験：シャーレで培養した付着性の強いアメーバ株3株を大腸菌死菌を給餌せずに2週間放置した後、このシャーレを上清の吸引除去とアメーバ生食の添加を5回繰り返して洗浄した。洗浄後のシャーレの底面にシストが付着・残留していることを位相差型倒立顕微鏡で確認した後、付着シストを剥離させる目的で3銘柄のMPS、2.5%トリプシンおよび4%ドデシル硫酸ナトリウム液(SDS)溶液を各々5ml入れ、振盪しながら1.5時間37℃で保温した。上清の吸引除去とアメーバ生食水の添加を5回繰り返して洗浄後、位相差型倒立顕微鏡でシャーレの底面に残留しているシストの有無を観察し

た。シストの残留の程度によって、付着シストが剥離されたかを判定した。対照として、薬剤処理を行わずに同様な振盪・保温および洗浄操作を行った。

結 果

1. 各種溶液中での発育試験

対照のアメーバ生食水中では、培養1日目から半数以上のアメーバが栄養体となり、2および3日目ではほとんど栄養体のみとなってさかんに増殖を続ける様子が観察された。しかし培養4日目になるとシストが目立ち始め、5および6日目には大部分がシスト化してほとんど増殖を停止してしまった。また、蒸留水とPB中でも、アメーバ生食水と同様な発育経過が観察された。一方、生理的食塩水およびPBS中では、1日目から少数の栄養体が認められたが、栄養体の大量出現時期は培養5日以降に遅延した。水道水中での発育はアメーバ生食水と同様だった(表3)。

2. 各温度における発育試験

培養温度5-10℃では、#11および#13株でごく少数ではあるが栄養体が観察された。15℃では、3株すべてで栄養体が目立つようになり、20および35℃では大量の栄養体が認められた。しかし40℃では、栄養体が観察された株はなかった(表4)。

3. 各給餌大腸菌死菌数における発育試験

培養3日目の時点で、#11株は給餌大腸菌死菌数が 10^6 個/ml以上では大部分が栄養体となって増殖していたが、 10^5 個/ml以下では、ほとんど栄養体とならなかった(表5)。

表3. 様々な溶液中におけるアカントアメーバ#11株の発育

溶液	培養日数						
	0	1	2	3	4	5	6
アメーバ生食水	-	++	+++	+++	++	+	±
蒸留水	-	++	+++	+++	++	+	±
PB	-	++	+++	+++	++	+	±
PBS	-	+	+	+	+	++	+++
生理的食塩水	-	+	+	+	+	++	+++
水道水	-	++	+++	+++	++	+	±

-から+++の判定基準は図1参照。

表4. 培養温度によるアカントアメーバの発育違い(培養3日後)

株	培養温度					
	5℃	10℃	15℃	20℃	35℃	40℃
#11	±	±	+	+++	+++	-
#12	-	-	+	+++	+++	-
#13	±	±	+	+++	+++	-

-から+++の判定基準は図1参照。

4. MPS感受性試験

感受性試験法 (A-C法) により異なった結果を示した (表6)。各法の対照のアメーバ生食水では、全ての方法および分離株で培養期間中に多量の栄養体が確認された。また、MPSに対する感受性は、アメーバ株間での発育状況に若干の差異が認められたが、分離3株でほぼ同等だった。

A法では、用いたすべてのMPSで、観察期間中、アcantアメーバの栄養体は観察できず、アメーバ株3株の発育は完全に抑えられた。

B法では、PHMBを含有しないMPS3で処理した場合に、アメーバ株3株全て栄養体の出現が観察され、アメーバの発育は抑えられなかった。しかしPHMBを含有するMPS1およびMPS2による処理では、栄養体は観察期間中観察できず、アメーバ株3株の発育は完全に抑えられた。

表5. 給餌菌数によるアcantアメーバ#11株の発育の違い (培養3日後)

菌数			
10 ⁴ 個/ml	10 ⁵ 個/ml	10 ⁶ 個/ml	10 ⁷ 個/ml
±	±	++	+++

-から+++の判定基準は図1参照。

表6. MPS感受性試験 (栄養体の発育状況)

試験法	分離株	MPS			対照
		1	2	3	アメーバ生食水
A法	#11	-	-	-	+++*
	#12	-	-	-	+++
	#13	-	-	-	+++
B法	#11	-	-	+++	+++
	#12	-	-	+++	+++
	#13	-	-	+++	+++
C法	#11	+	+	+++	+++
	#12	+	+	+++	+++
	#13	+	+	+++	+++

*1週間の培養期間中の最大値。
-から+++の判定基準は図1参照。

表7. アcantアメーバ臨床分離株20株のシャーレへの付着性

シストの付着性	分離株
きわめて強い(付着)	#1, #3-5, #9-10, #14, #16, #18, #20 (計10株)
弱い(遊離)	#2, #7-8, #13, #15 (計5株)
両者が混在している*	#6, #11-12, #17, #19 (計5株)

*強固に付着しているシストと遊離しているシストが混在。

C法では、全てのMPSによる処理で、栄養体が観察され、アメーバ株3株の発育は抑えられなかった。

5. シストのシャーレに対する付着性

アcantアメーバ臨床分離株20株のシストのシャーレに対する付着性は、株間で明らかに異なっていた (表7)。すなわち、10種類の株 (#1, #3-5, #9-10, #14, #16, #18および#20) では付着性がきわめて強くほとんどのシストがシャーレの底面に固着しており、5種類の株 (#2, #7-8, #13および#15) では付着性が弱くほとんどのシストが遊離していた。また、残りの5種類の株 (#6, #11-12, #17および#19) では付着性の強いシストと弱いシストが混在していた。

6. MPSによるシストの付着抑制試験

付着性の強い3種類の株 (#16, #18および#20) のアcantアメーバのシストをSCL保存ケースおよびシャーレに実験的に添加した結果、アメーバ生食水をあらかじめ満たしておいた対照では、容器やアメーバ株に関係なく洗浄後に多数の残留したシストが認められた。しかし、あらかじめ3銘柄のMPSを満たしておいた場合には、いずれもMPSの銘柄やアメーバ株に関係なく、シャーレでは洗浄後に残留しているシストは認められず、シストの付着は完全に抑制された。一方、保存ケースでは、対照に比べて大幅に減少しているものの、洗浄後に残留しているシストが認められた。

7. シャーレに付着したシストの化学的剥離

シャーレに付着した3株のアcantアメーバのシストは、トリプシンおよびSDSの処理で完全に剥離され、洗浄後には残留していなかった。しかし3銘柄のMPSの処理では、シストはほとんど剥離されず、洗浄後にも対照と同程度に残留していた。

考 察

まず、本報告で用いたアcantアメーバの培養法 (液体培養法) について、従来から用いられている寒天平板に大腸菌などの菌体粒子を塗布した培地 (寒天平板法) およびPYGC培地 (プロテオースペプトン, イーストイクトラクト, グルコースおよびシステインを含有: PYGC培地法) で菌体を給餌しない培養法との相違点について考察する。

アメーバの発育増殖に関しては、液体培養法で患者分離株20数株が10年以上培養維持できている現状から、他の培養法と比べ遜色ないと思われた。一方、この液体培養法では、アメーバの増殖は培養1週目頃までには止まってしまうアメーバは全てシスト化してしまうが、寒天平板法では2週間程度およびPYGC培地法では1か月程度増殖が持続するといわれており (11)、シスト化の原因については今後検討する必要がある。故に、本報告ではアメーバの増殖形態である栄養体の出現状況を観察することにより発育基準を定めた。

角膜炎患者の臨床材料からの液体培養法によるアメーバの分離に関しては、金沢大学眼科からの検体で臨床的に初期のアcantアメーバ角膜炎と診断された患者でのアメーバの分離率は、ほぼ

100%だったという背景データが得られている(未発表)。また、本法では培養翌日には、運動性のあるアメーバの栄養体を確認可能であるが、寒天平板法では少なくとも2-3日は必要であり、PYGC培地法では雑菌の増殖が問題となり事実上、直接分離は不能となる(11)。また、液体培養法では、患者が使用していたSCL保存ケースからもケースに直接培養液を入れてアメーバを分離することができた。この様に、液体培養法は角膜上皮細胞が混ざった程度の臨床材料からの分離培養には適していると思われるが、一方で、土砂など大量の不溶物が存在するような材料からの分離培養では、溶液全体が混濁し観察不能となる。

以上のように、液体培養法と従来の寒天平板法およびPYGC培地法には相違が認められるが、液体培養法ではシャーレを直接位相差型倒立顕微鏡で観察してアメーバ栄養体の運動性およびシストの形成やシャーレへの付着の様相を経時的に確認できること、SCL保存ケース内でのアメーバの増殖は液体培養法による増殖形態と似ていると思われることおよび液相を入れ替えることでMPS中におけるアメーバの増殖抑制効果などの検定ができることなどの理由から、本研究でのアメーバの培養には、この培養法がより適していると考えられた。

アカントアメーバのシストは、身近な生活環境を広く汚染しており、細心の注意を持って取り扱わなければSCL保存ケースへの混入を避けられない。従って、このアメーバがSCLのコールド消毒法の保存液として使われることが多い生理的食塩水や、MPSの代用品として使われてしまうことがある水道水中でも20℃程度の環境温度で十分に発育可能であることは、アカントアメーバ角膜炎の予防のためにSCL使用者に喚起すべき重要事項である。一方、給餌細菌数が 10^6 個/ml以上に達しないとアメーバが十分に増殖できないことは、同症の発生が比較的少数に抑えられている一因となっていると考えられる。しかし、定期健診で異常を認めなかった中学生の涙液のブドウ球菌数は、207例中24例(11.6%)で 10^{5-6} 個/mlに達したという報告(26)もあり、角膜上はアカントアメーバが十分増殖できる環境となる可能性が高く、病原アメーバの特に栄養体を角膜上に運ばないことが肝要である。

MPS感受性試験のA法による試験で、アメーバの発育が完全に抑制されたことは、SCL保存ケースにMPSが満たされていれば、たとえシストが外界から混入したとしても、アメーバがケース内で栄養体となって増殖することはないことを意味している。角膜へのアメーバ感染は、SCL保存ケースに混入したシストがいったん栄養体となった後、SCLの装着時などに角膜に運ばれた場合に、成立する可能性が高くなると考えると、A法の結果は、今回使用したどのMPSでもこれを常にSCL保存ケースに満たしておくことで、アカントアメーバ角膜炎を高率で予防できることを示している。

B法の試験結果では、PHMBを含有するMPSでシストを1晩処理することにより、その後MPSが洗い流されても、アカントアメーバの発育を抑制できることが示された。しかしC法の試験結果では、PHMBを含有するMPSでSCL保存ケースに付

着したシストを1晩処理しても、その後MPSを洗い流すと、シストが栄養体となって発育してしまうことが示された。すなわち、B法でシストに対する発育抑制効果の認められたMPSでも、C法でのSCL保存ケースに付着したシストに対してはその効果が不十分であることから、アカントアメーバ角膜炎の予防法として、保存ケースにシストを付着させないということも重要な要因であると考えられた。一般にアカントアメーバのシストに対するMPSの発育抑制効果は不十分であると報告(27)されているが、本研究によりシストのMPS感受性が遊離シストと付着シストで異なることが判明した。

アカントアメーバのシストが時に器物や角膜に固着していることは、以前より知られていた(28,29)。今回、アカントアメーバが液体培地中でシャーレのまま簡単に培養・観察できるようになり、臨床分離株間でシストの付着性に相違があることが新たに観察された。Rahmanら(23)の報告した16S rDNAの遺伝子型と対比させてみると、T3およびT5グループの2株は付着性の弱いシストを形成していたが、遺伝子型が同定された残り16株のT4グループには、シストの付着性が強いもの、弱いものおよび両者が混在するものが認められた。一方、T4グループを細分類したT4a-dでは、付着性との相関性は認められなかったが、T4iの2株はいずれもシストの付着性が強いものだった。また、シストの付着性が強いものと弱いものが混在していると判定された5株のうち#6と#19の2株は、いずれも16S rDNAの遺伝子型はT4グループだが18S rRNAでみると塩基配列が2種混在しており、異なった遺伝子型のアメーバの混合感染であろうと推測されている(23)。以上から、アカントアメーバ臨床分離株間におけるシストの付着性の違いは遺伝的に制御された性質であろうと思われるが、症例の発生数や難治度とシストの付着性との関係については、現在のところ特に報告されていない。しかしこのような付着性の違いは、SCL使用者が水道水で洗浄したSCL保存ケースへのシストの残留度には、かなり影響をおよぼしているものと推定される。シストをアメーバ生食水とともにケースに入れ1.5時間放置すると、付着性の強いシストではケースを洗浄後にもシストの大部分がケース内に残存しており、その後ケースにアメーバ生食水と大腸菌死菌を入れて培養することにより大量の栄養体が出現してしまう。この様に環境中から混入したアカントアメーバのシストが、栄養体になることなくそのまま短時間で器物に付着してしまい、更にMPSに一晩浸漬しても殺滅できないことは、SCL保存ケースをアメーバ・フリーに保持しようとする試みにとっては脅威である。

では、市販のMPSはシストの付着を阻止できるのだろうか？実験的には、あらかじめMPSを満たしたプラスチックシャーレにシストを入れても、その後の洗浄によりすべて洗い流すことができ、MPSがシストの付着を阻止できることが示された。しかし、MPSを入れたSCL保存ケースにシストを入れた場合は、洗浄後に認められるシストはごく少量となるものの、今回の洗浄法では完全に洗い流すことはできなかった。このような

容器によるシストの残留性の違いは、材質による差よりも容器の形状の差による洗浄しにくさや水切れの悪さなどによる可能性もあり、さらに検討を要する。また、本報告ではSCLに対するシストの付着性については触れていないが、一銘柄の1日使い捨てタイプのSCLでは、シストの付着がほとんど認められないという結果が得られており(未発表データ)、今後、SCLの種類などを変えてさらに検討を進めたい。

プラスチックシャーレに付着したシストは、蛋白分解酵素のトリプシンや界面活性剤で蛋白分子の高次構造を失わせるSDSに1.5時間ほど浸すことにより完全にはがすことができ、付着因子は蛋白質であろうと考えられた。一方、いったんプラスチックシャーレに固着してしまったシストは、MPSに浸してもほとんどはがすことができなかった。シストが器物に付着するメカニズムについては、現在、解明されていないが、非常に短時間で付着したり、有機物をほとんど含まない蒸留水中でも付着したりすることが観察されるので、細菌などが多数集まって形成されるバイオフィームとは異なるものと思われる。今後、これらの結果を視野に入れたSCLやSCL保存ケースおよび洗浄剤の開発が必要と思われる。

アカントアメーバが角膜上皮に留まらずポーマン層に達してシストを形成している状態が、横川らとの共同研究(30)で共焦点レーザー顕微鏡によって捉えられており、このような像の見られた患者では治癒が遷延して難治性となる傾向があった。このアメーバのシスト化現象は、アメーバ生食水中での培養でも培養4日目頃から認められ、そのまま大腸菌死菌を給餌せずに放置すると、シスト化率は進行し2週間以内に栄養体は認められなくなった。この状態のシャーレに再び大腸菌死菌を給餌すると、シストは栄養体となって増殖を始めるが、今度は培養2日目にほとんどがシスト化してしまう(未発表データ)。このような現象は、増悪と寛解を繰り返す難治性のアカントアメーバ角膜炎(31)の機序をうまく説明できると考えられ、現在、病原アメーバのシスト化や栄養体化を制御する物質を探索し、治療に応用できないものか検討中である。

結 語

一般に、アカントアメーバのシストに対するMPSの発育抑制作用は、不十分であるといわれているが、今回の実験結果から、アメーバはMPSの存在下では栄養体となることができないことが明らかとなった。従って、MPSを保存ケースに常に満たした状態にすることは、シストのケースへの混入、栄養体化、SLC装着による栄養体の角膜への運搬というアカントアメーバの角膜感染経路の遮断法として有効であると考えられる。

SCL保存ケースの洗浄・保管方法としては、現在、水洗い後に風乾させることが推奨されているが(木下茂(2010)国民生活センターの報告「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-使用実態調査を踏まえて-」(平成21年12月16日公表)に関する報道について、http://www.clgakkai.jp/general/sc_houkoku.html)、今回得られたようなアカントアメーバのシストの付着性を考慮した場合、乾燥中に環境中から混入したシストがケースに固着してしまうのを避けるため、ケースの水洗い後には乾燥させずに再度MPSを満たして保管するほうがよいと考えられる。また、シストが乾燥状態に対し強い抵抗性を持つことから(7)二つの保存ケースを所持してレンズを入れていない一方を洗浄・乾燥させておく方法でも、乾燥時に混入・固着したシストの除去は困難であり、推奨できない。今後更に、他の病原体の残留性をも含めて、SCL保存ケースの材質や形状および洗浄や保管法について検討すべきであると思われる。また、本実験で用いた液体培養法は、SCL保存ケース中でのアカントアメーバの増殖状態に近く、MPS中でのアメーバの発育条件などの様々な解析に利用できることが示され、本法の応用により更に検討を進める予定である。

利益相反の開示

本研究に関する著者の利益相反はない。

稿を終えるにあたり、ご指導およびご校閲いただきました本学微生物学教室の大原義朗教授に深謝いたします。

本研究に使用しましたアカントアメーバ臨床分離株の#1-10は、国立感染症研究所の遠藤先生並びに八木田先生に分与いただきました。また、#11-12株は本学眼科学教室の北川和子教授より、#13-20株は金沢大学眼科学教室の小林顕准教授および横川英明助教より依頼された検査材料より分離され培養維持していたものを、研究材料として使用させていただきました。ここに記して、深謝いたします。

さらに、北川和子教授には臨床の立場から、本研究の遂行のための貴重なご指導・ご支援をいただきました。重ねて深謝いたします。

文 献

1. 竹内勤:眼感染症 アメーバによる眼感染症-アカントアメーバ角膜炎-. 眼科 1991; **33**: 1347-53.
2. 石橋康久, 本村幸子:眼感染症 アカントアメーバ角膜炎の診断と治療. 眼科 1991; **33**: 1355-61.
3. Naginton J, Watson PG, Playfair TJ et al: Amoebic infection of the eye. Lancet 1974; **2**: 1537-40.
4. 石橋康久, 松本雄二郎, 渡辺亮子ほか: *Acanthamoeba keratitis*の1例-臨床像, 病原体検査法および治療についての検討-. 日眼会誌 1988; **92**: 963-72.
5. 篠田和男, 小林顕, 三輪さおりほか: アカントアメーバ感染が否定された角膜炎で放射状角膜神経炎が認められた1例. 日眼紀 2002; **53**: 894-7.
6. 鶴原喬, 富山康, 石橋康久ほか: *Acanthamoeba*の土壌内分布. 臨眼 1993; **47**: 1665-9.
7. 山浦常, 白坂竜曠, 松本克彦ほか: 東京都内と広島市内の砂場からのアカントアメーバの検出. 寄生虫誌 1993; **42**: 361-4.
8. 山浦常, 白坂竜曠, 松本克彦ほか: 室内塵からのアカントアメーバの検出. 寄生虫誌 1993; **42**: 130-3.
9. Miyazaki T, Yagita K, Yanagi T et al: Seasonal fluctuation of *Acanthamoeba* spp. contamination in water containers placed indoors and outdoors. Acta Med Nagasaki 2007; **52**: 13-8.
10. 小林顕, 石橋康久: アカントアメーバ角膜炎. あたらしい眼科 2002; **19**: 1005-10.
11. 遠藤卓郎, 八木田健司: アカントアメーバ角膜炎の診断法の開発. 神原廣二(監). 寄生虫疾患の診断法の開発と症例検討, 大阪, 医薬ジャーナル社, 1991; 87-97.
12. 石尾香, 岡田克樹, 石橋康久ほか: アカントアメーバ角膜炎の確定診断

- における培地の比較. 日眼紀 1995; **46**: 1021-5.
13. Oikawa Y, Kitagawa K, Yagita K et al: Drug susceptibility of *Acanthamoeba* isolated from 13 Japanese patients with *Acanthamoeba* keratitis. J Kanazawa Med Univ 2005; **30**: 67-70.
 14. Kitagawa K, Nakamura T, Takahashi N et al: A novel combination treatment of chlorhexidine gluconate, natamycin (pimaricin) and debridement for a *Acanthamoeba* keratitis. Jpn J Ophthalmol 2003; **47**: 616-7.
 15. 及川陽三郎, 小林顕, 北川和子: アカントアメーバに対する抗真菌薬ピマリシン (ナタマイシン) の有効性について. 大原病年報 2010; **50**: 27-30.
 16. Lindquist TD, Doughman DJ, Rubenstein JB et al: *Acanthamoeba*-contaminated hydrogel contact lenses. Susceptibility to disinfection. Cornea 1988; **7**: 300-3.
 17. 石橋康久, 河野恵子, 本村幸子ほか: *Acanthamoeba* に対するタップソーク (R) および温度の影響. 日コンタクトレンズ会誌 1988; **30**: 257-60.
 18. 植田喜一: デイスボーズブルレンズ・頻回交換レンズの問題点. あたらしい眼科 1998; **15**: 341-8.
 19. Hiti K, Walochnik J, Haller-Schober EM et al: Viability of *Acanthamoeba* after exposure to a multipurpose disinfecting contact lens solution and two hydrogen peroxide systems. Br J Ophthalmol 2002; **86**: 144-6.
 20. 所正治, 山口智博, 田中身和ほか: 病原性寄生原虫における分子分類の現状. 金沢大十全医学会誌 2008; **117**: 53-7.
 21. 武藤哲也, 長谷英樹, 佐藤剛ほか: 難治な両眼アカントアメーバ角膜炎の1例. 日眼紀 1999; **50**: 22-6.
 22. 武藤哲也, 小林顕, 三輪さおりほか: 頻回交換レンズ (FRCL) のマルチパーパスソリューション (MPS) ケア症例にみられたアカントアメーバ角膜炎の一例. 眼科 2003; **45**: 1871-5.
 23. Rahman MM, Yagita K, Kobayashi A et al: Genetic characterization of clinical *Acanthamoeba* isolates from Japan using nuclear and mitochondrial small subunit ribosomal RNA. Korean J Parasitol 2013; **51**: 401-11.
 24. Larkin DF, Kilvington S, Dart JK: Treatment of *Acanthamoeba* keratitis with polyhexamethylene biguanide. Ophthalmology 1992; **99**: 185-91.
 25. Miller MJ, Callahan DE, McGrath D et al: Disinfection efficacy of contact lens care solutions against ocular pathogens. CLAO J 2001; **27**: 16-22.
 26. 久城初江, 伊藤清治: 健康人の涙液におけるブドウ球菌について. 感染症誌 1984; **58**: 827-31.
 27. 小玉裕司: ケア用品の基礎知識. 日コンタクトレンズ会誌 2000; **42**: S11-6.
 28. 石橋康久, 渡辺亮子, 本村幸子ほか: コンタクトレンズに対する *Acanthamoeba* の接着 (第1報) 素材による違いおよび洗浄の影響. 日コンタクトレンズ会誌 1990; **32**: 49-55.
 29. Imayasu M, Uno T, Ohashi Y et al: Effects of multipurpose contact lens care solutions on the adhesiveness of *Acanthamoeba* to corneal epithelial cells. Eye Contact Lens 2009; **35**: 246-50.
 30. Yokogawa H, Kobayashi A, Yamazaki N et al: Bowman's layer encystment in cases of persistent *Acanthamoeba* keratitis. Clin Ophthalmol 2012; **6**: 1245-51.
 31. 北川和子, 藤沢綾, 青山繁樹ほか: クロルヘキシジン点眼が有効であったアカントアメーバ角膜炎の1例. あたらしい眼科 2000; **17**: 833-7.

Control of Proliferation of *Acanthamoeba* in a Soft Contact Lens Case Demonstrated by a Newly Devised Culture Method Using a Liquid Medium

Yosaburo Oikawa

Department of Microbiology, Kanazawa Medical University Graduate School of Medical Science, (Department of Medical Zoology, Kanazawa Medical University School of Medicine) Uchinada, Ishikawa 920-0293, Japan

Acanthamoeba keratitis is a disease caused by free-living amoeba that live in the environment, and amoeba proliferating in a soft contact lens (SCL) case is a well known important source of infection. A basic study on the proliferation of *Acanthamoeba* in a SCL saving case was carried out to control the growth of these pathogenic amoebae.

By using a liquid culture method developed by the author, the growth of the clinically isolated amoebae and the proliferation control in the SCL case achieved by three commercially available multi-purpose solutions (MPSs) were examined. Those MPSs are commonly used for cleaning, disinfection and storage of SCL.

Escherichia coli over 10^6 /ml as a bait was able to grow the amoebae in tap water, but not in MPSs. Certain clinical isolates have cysts with strong adhesion to a polystyrene dish.

Others have cysts with weak adhesion. The cysts could not adhere to the dish filled with MPSs. However, a small number of cysts remained in a SCL case filled with MPSs after the cleaning. The cysts adhering to the dish could be sucked away after treatment with trypsin or sodium dodecyl sulfate, but not MPSs.

If the storage case is constantly filled with an MPS, *Acanthamoeba* keratitis can be effectively prevented, because the growth of the amoebae and the adhesion of the cysts can be drastically suppressed. To reduce the number of remaining cysts in the case after cleaning, further studies are required to devise the material and the shape of SCL cases and to specify the optimal cyst-cidal chemical agent.

Key Words: *Acanthamoeba*, soft contact lens storage case, multipurpose solution (MPS), liquid culture method