

氏名	おい かわ ようきぶろう 及 川 陽三郎
学位論文題目	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

学位論文内容の要旨

研究目的

アカントアメーバは、池や土壌などに生息する自由生活性のアメーバであり、そのシストにより身近な生活環境は広く汚染されている。アメーバ角膜炎は、ソフトコンタクトレンズ (SCL) 使用者を中心に症例が報告されており、その主な原因は SCL 保存ケース中で発育増殖した病原アメーバによる感染であると考えられている。SCL 保存ケースは SCL の洗浄・消毒・保存液である multi-purpose solution (MPS) で洗浄後風乾することが推奨されているが、この風乾の過程でシストのケース内への混入を許す可能性が高いと考えられる。本研究では、アカントアメーバ角膜炎の予防法を確立するため、SCL 保存ケース内における病原アメーバの発育増殖要因、MPS によるシストの発育増殖抑制作用およびケースへの付着抑制作用について、申請者らが考案した液体培養法を用いて検討した。

実験方法

液体培養法で維持されているアカントアメーバ臨床分離株 20 株を実験に用いた。アメーバ生理食塩水に一定数の大腸菌死菌 (約 10^{10} 個/ml) を添加したものを液体培地とし、アカントアメーバを接種後、 27°C で液体培養を行った。MPS は抗アメーバ作用を有する薬剤である poly-hexamethylene biguanide を含有する 2 種類の MPS と、含有しない 1 種類を用いた。アカントアメーバの発育増殖要因を検討するため、培養温度 ($5\text{--}40^{\circ}\text{C}$) および給餌細菌数 ($10^4\text{--}10^7$ 個/ml) を段階的に変動させ、発育増殖を観察した。また、水道水や生理的食塩水における発育増殖についても検討した。MPS に対する感受性は、以下の方法を用いて検討した。A 法：MPS 中でのシストの発育増殖抑制効果を検証するために大腸菌を添加した MPS 中でアカントアメーバのシストを培養した。B 法：遊離しているシストに対する MPS の発育増殖抑制効果を検証するために遊離シストを MPS に一晚浸漬後、アメーバ生理食塩水にて培養した。C 法：シャーレに強固に付着しているシストに対する MPS の発育増殖抑制効果を検証するために付着シストを MPS 処理後、アメーバ生理食塩水にて培養した。臨床分離株 20 株が形成するシストのシャーレへの付着性の違いは、培養シャーレに加えた振動により剥離するシストの数により判定した。MPS のシストの付着抑制効果を検討するために、臨床分離株のうち培養シャーレへの付着性が強い株のシストを MPS で満たした保存ケースおよびシャーレに添加・付着させ、容器洗浄後に残留するシストの数を計測した。シストを剥離する薬剤として、トリプシンおよび SDS についても同様に検討した。

実験成績

アメーバ生理食塩水中では、アカントアメーバは培養温度 20-35℃で活発に発育増殖し、給餌細菌数は 10^6 個/ml 以上が必要であった。蒸留水や水道水中では、アメーバ生理食塩水と同様に発育増殖し、生理的食塩水や PBS など浸透圧の高い溶液中でも、やや発育開始が遅れるが増殖は良好であった。MPS に対するシストの感受性試験では、MPS の種類に関係なく、A 法ではアカントアメーバは全く発育増殖できなかった。また、抗アメーバ薬を含有する 2 種類の MPS の場合においては、B 法ではアカントアメーバの発育増殖は完全に抑制されたが、C 法では発育増殖抑制効果が不完全であった。抗アメーバ薬を含有しない MPS では B 法 C 法ともにアカントアメーバの活発な発育増殖が認められた。保存容器別のシスト付着抑制試験では、SCL 保存ケースでは洗浄後にもごく少量のシストがケースに残留していたが、シャーレではシストの付着は完全に抑制され、洗浄後に残留するシストは認められなかった。また、シャーレに付着しているシストは、トリプシンや SDS で剥離できたが、MPS ではほとんど剥離できなかった。

総括および結論

アカントアメーバは生活環境温度で一定の数になれば、水道水や生理的食塩水中でも十分に発育増殖できることより、SCL の保存液としてこれらを MPS の代わりに使用することの危険性が示された。一方、アカントアメーバの発育増殖は MPS 中では起こらないことより、常に SCL 保存ケースを MPS で満たしておくことで、ケース内で発育増殖したアカントアメーバを角膜に運ぶ危険性は阻止できると考えられた。また、付着性が強いシストをアメーバ生理食塩水で満たした保存ケースに添加した場合、短時間でケースの内面に付着し、洗浄後も大部分が残留するが、保存ケースを MPS で満たした場合はシストの付着が抑制されることが明らかとなった。しかし、MPS には、ケースに付着したシストに対する剥離作用は認められなかった。MPS に含有される抗アメーバ薬に対する付着シストの感受性は、遊離シストに比べ低かった。以上の結果より、アカントアメーバ角膜炎の予防にはシストを SCL 保存ケースに付着させないことが重要であり、外界から混入するシストの付着および増殖を防止するためには、ケースを洗浄後、風乾せず直ちに MPS で満たしておくことが効果的であることが示された。さらに、シストの付着を防止する保存ケースの形状や材質の検討および付着シストを効果的に剥離することが可能な MPS の開発が、今後の検討課題として示された。