

[原 著]

当院で *Acanthamoeba* spp. が検出された角膜炎 16 例の検討

小原知美・岩崎友里・園田明子・今枝義博
藤田保健衛生大学坂文種報徳會病院臨床検査部

(平成 21 年 2 月 18 日受付, 平成 21 年 8 月 14 日受理)

アカントアメーバ角膜炎は *Acanthamoeba* spp. を原因とした疾病で, 早期の段階での臨床所見からは角膜ヘルペスや角膜真菌症との区別は必ずしも容易ではない。その診断は角膜病巣から *Acanthamoeba* spp. が検出されることによって確定する。筆者らは 2005 年から 2008 年の 4 年間に, 臨床的にアカントアメーバ角膜炎を疑い, 培養検査および塗抹検査で *Acanthamoeba* spp. を検出し, 確定診断に至った 16 症例について検討した。対象患者は 17~55 歳の 16 名で 10 代, 20 代で半数以上を占めた。すべてコンタクトレンズ使用者であった。栄養型は培養後 1~6 日目に検出され, シストは 2~6 日目に栄養型と混在もしくはシスト単独で観察された。初回の検査で検出されず, 虫体が検出されるまでに複数回の検体提出を必要とした症例もあった。アカントアメーバ角膜炎の予後は治療開始時の病期に依存する。早期の確定診断が望まれるが検出率は低い。*Acanthamoeba* spp. の検出には採取時の病期や検査方法が影響することが示唆されたため, 抗菌薬や抗真菌薬に抵抗性の角膜炎の場合には *Acanthamoeba* spp. に起因している可能性も視野に入れ, 複数回検査を行うことが必要である。さらに, 医師と臨床検査技師が積極的に情報交換し, 連携して対処することが非常に重要であると考えられた。

Key words: *Acanthamoeba* spp. コンタクトレンズ, 栄養体, シスト

序 文

アメーバとは単細胞で仮足によって運動する原生動物の総称である。*Acanthamoeba* spp. は共生や寄生など他の生物に依存しないで生活できる自由生活性アメーバで, 世界各地の土壌や水たまりに棲息している。アカントアメーバ角膜炎は, このアメーバが角膜に感染した状態であり, 1974 年に英国からの報告例が論文¹⁾に発表されてその存在が知られるようになった。本邦では 1988 年石橋ら²⁾が第 1 例を報告して以来, 1990 年代から 2000 年前後まで全国で年間約 10 件程度の発症数^{3~6)}で, あくまでも希少難治性疾患として考えられてきた。ところが 2007 年には本邦各地でアカントアメーバの急増が報告され⁷⁾, 当院でも 2005 年, 2006 年に各 1 例の経験があった後, 2007 年には 10 例に急増し, 2008 年になっても収束の兆し

はない。

本症はいまだに確立した治療方法のない難治性感染症である。早期に治療しなければ重篤な角膜炎へと発展し, 角膜に穿孔をきたし, 強い混濁を残して失明に至ることもある。アカントアメーバ角膜炎には放射状角膜炎, 輪状角膜炎などの特徴的所見が報告されている。しかしながら初期には特徴的な角膜所見を呈することが少なく, 角膜ヘルペスや角膜真菌症との鑑別が困難である。したがって病変が上皮~上皮下に限局した初期の段階での本症の診断には, 病巣から採取された検体の培養検査ないし, 塗抹検査を行って *Acanthamoeba* spp. を証明することが決め手となる^{8,9)}。

今回筆者らは 2005 年から 2008 年の 4 年間に臨床的にアカントアメーバ角膜炎を疑い, 培養検査ないし, 塗抹検査で *Acanthamoeba* spp. を検出し, 確定診断に至った 16 症例について検討したので報告する。

対象と方法

1. 対象

2005 年 1 月から 2008 年 10 月の約 4 年間に角膜検体から培養検査ないし, 塗抹検査によって *Acan-*

著者連絡先: (〒454-8509) 名古屋市市中川区尾頭橋 3-6-10

小原 知美

TEL: 052-321-8171

FAX: 052-322-4734

E-mail: bantanel@fujita-hu.ac.jp

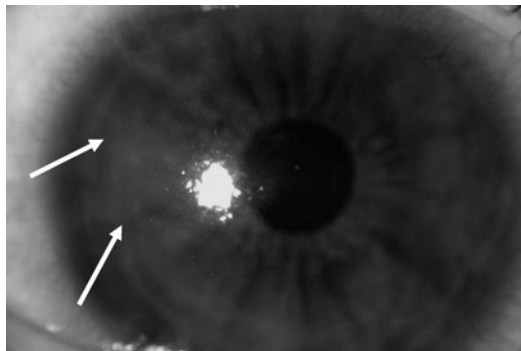


図1. 初期 (症例9)

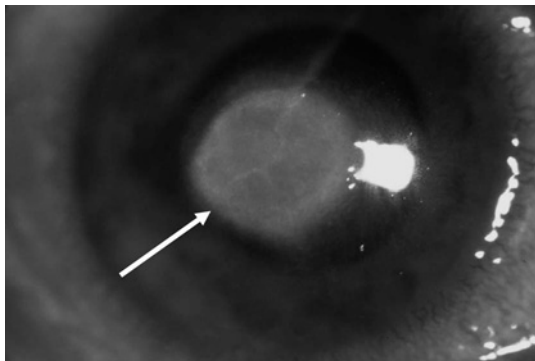


図3. 完成期 (症例6)

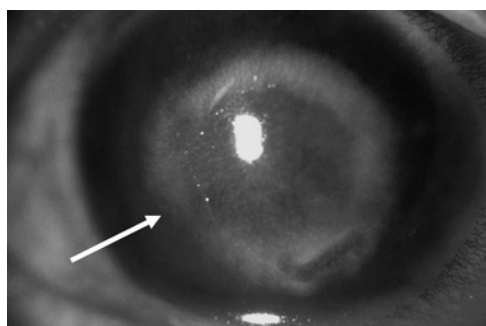


図2. 移行期 (症例8)

thamoeba spp. が検出された角膜炎患者 16 例を対象とした。内訳は 2005 年 1 例, 2006 年 1 例, 2007 年 10 例, 2008 年 4 例であった。

2. 検出患者の臨床背景

Acanthamoeba spp. 検出患者 16 例について年齢, 性別, 病眼, コンタクトレンズ (CL) 使用歴, 症状, 前医での治療歴について調査した。

3. 臨床病期

アcantアメーバ角膜炎の臨床病期については石橋分類¹⁰⁾に従って 1 期から 3 期に分類した。1 期 (初期) には激しい疼痛, 輪部結膜に毛様充血, 浮腫や偽樹枝状の角膜上皮障害や放射状の角膜神経炎 (図 1) が見られ, *Acanthamoeba* spp. が角膜に感染してから 1~4 週間の時期であるといわれている。2 期 (移行期) では角膜中央にリング状の浸潤が現れる (図 2)。3 期 (完成期) はリング状の混濁が中心部まで波及し, 濃い輪状浸潤, 円板状潰瘍, 円板状角膜炎を呈し, 輪部の浮腫や充血もより強くなる (図 3)。

4. 検体の採取

検体の採取は当院の眼科外来でアcantアメーバ角膜炎が疑われた患者に対して, 表面麻酔下でスパーテ

ルないしゴルフ刀による搔爬および滅菌綿棒による擦過によって行われた。これを少量の滅菌生理食塩水とともに滅菌スピッツに入れ, 当検査室に提出された。

5. 培養

採取検体を滅菌生理食塩水 500 μ l に浮遊させて検体浮遊液とした。培地は無栄養の 1.5% 寒天培地に, マックファーランド 6 程度に調整した大腸菌液を 500 μ l 接種し, コンラージ棒で培地全体に塗布して作製した。検体浮遊液 300 μ l をピペットで培地の中央部分に接種し, 培地を上向きにしたまま 35°C 好気条件下で培養した。培養した培地の観察は接種後 1 日目から虫体検出まで 400 倍にて顕微鏡下で行った。

培養陽性時の推定病日数, 培養開始から検出までの期間, 培養陽性時の虫体の形態, 陽性までの施行回数を同時に調査した。

一般細菌, 真菌の培養は HK 半流動培地 (極東製薬), ポアメデア DHL 寒天培地 (栄研化学), 羊血液寒天/チョコレート (日水製薬) を使用し実施した。真菌専用培地は使用しなかった。HK 半流動培地は, 35°C で 1 週間培養し, 菌の発育を観察した。DHL 寒天培地は 35°C 好気条件下で, 羊血液寒天/チョコレートは 35°C 5% 炭酸ガス下でそれぞれ 2 日間培養した。

6. グラム染色

グラム染色は培養と同様, 角膜病変部位を搔爬したものを採取し, 滅菌綿棒で擦り付けるようスライドガラスに塗布した。火災固定後 Bartholomew & Mittler (B&M) 法を実施して 1,000 倍で観察した。

グラム染色陽性時の推定病日数, 陽性までの施行回数を同時に調査した。

結 果

調査期間中, 当院眼科で臨床所見からアcantアメーバ角膜炎と診断された症例は 21 例 22 眼であっ

表 1. 臨床背景

症例		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
年齢 (歳)		48	18	28	55	54	32	17	46	29	20	29	19	53	19	18	43
性別 ¹⁾		F	F	F	F	F	F	M	M	M	F	M	M	F	F	M	F
病眼 ²⁾		L	R	R	L	B	R	L	R	L	R	R	L	L	L	L	L
コンタクトレンズ ³⁾		H	S	S	H	H	S	S	S	S	S	S	S	H	S	S	S
症状	眼痛	○	○	○	○	○				○		○	○		○	○	○
	視力低下	○	○	○	○	○	○	○	○	○			○				
	充血			○			○	○	○	○	○	○	○	○	○		
	角膜糜爛	○	○			○		○			○	○					○
	流涙			○	○												
	違和感					○											
	開眼不良									○							○
	掻痒感										○						
浮腫												○					
前医での治療歴	キノロン系抗菌薬	○			○	○	○		○	○	○	○	○	○	○	○	○
	その他抗菌薬		○								○			○			
	ピマリシン	○						○							○		
	フルコナゾール	○							○					○			
	イトラコナゾール							○									
	ミカファンギン												○				
	抗ウイルス薬	○	○		○			○	○		○		○		○		
	抗アレルギー薬		○				○			○							
	ステロイド		○			○	○	○	○	○		○	○	○			○
ヒアルロン酸ナトリウム		○			○	○										○	
加療期間 (日)		19	18	16	9	11	43	13	78	13	15	21	29	15	12	10	3

1) F: 女性, M: 男性

2) L: 左眼, R: 右目, B: 両目

3) H: ハードコンタクトレンズ, S: ソフトコンタクトレンズ

※症例 3 の前医での詳細な治療歴は不明

た。うち 19 例 20 眼について角膜病変の搔爬により採取された検体が提出された。この中で *Acanthamoeba* spp. が培養検査ないし、塗抹検査で検出された症例は 16 例 17 眼であった。検出されなかった 3 症例はいずれも初期の病期で、そのうち 2 症例は検体が各 1 回しか提出されず、フルコナゾールやクロルヘキシジン点眼による抗アメーバ治療で完治した。他の 1 例は初期および実質浸潤をきたした病期で、検体は 2 回にわたり提出されたが検出されていなかった。また、抗アメーバ治療にもかかわらず改善傾向が得られないまま通院を中断しているため、アcantアアメーバ角膜炎の確定診断には至っていない。

培養検査ないし、塗抹検査でアcantアアメーバ角膜炎と確定診断された患者は、全例が CL の使用者であった。患者は 17~55 歳の 16 名で平均年齢は 33.0 ± 14.5 歳であった。内訳は 10 代が 5 例 (31.3%), 20 代が 4 例 (25.0%) と半数以上を占めた。男女比は男性

6 名 (37.5%), 女性 10 名 (62.5%) で、女性が多い結果となった。病眼は左眼: 9 例 (56.3%), 右眼: 6 例 (37.5%), 両眼 1 例 (6.3%) であった。すべての症例で CL を使用しており、ソフト (デイリー, 2 週間タイプ, 1 カ月タイプを含む) 12 例 (75.0%), ハード (酸素透過性) 4 例 (25.0%) であった。1 例は軍手で眼を擦った外傷もリスクファクターであると考えられた。症状は眼痛, 充血を伴っている症例が 11 例 (68.8%) と多く、ほかに視力低下 10 例 (62.5%), 角膜糜爛 7 例 (43.8%), 流涙 2 例 (12.5%), 違和感 2 例 (12.5%) などが見られた。すべての症例で前医にて角膜真菌症, ヘルペス角膜炎, 流行性角結膜炎, ブドウ膜炎などを疑われ, レボフロキサシンなどの抗菌薬点眼, フルコナゾールなどの抗真菌薬点眼のほか, 抗菌薬軟膏や抗真菌薬軟膏, 抗ウイルス薬軟膏, ステロイドなどによる治療歴があった (表 1)。

Acanthamoeba spp. 培養検査は 15 例について実施

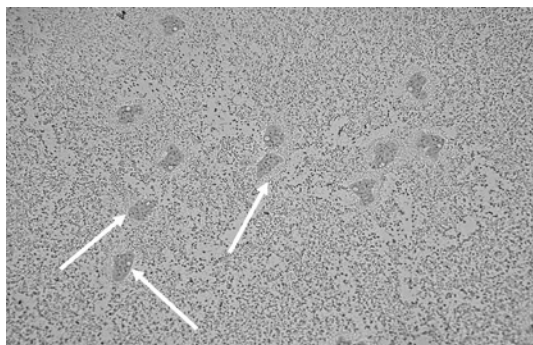


図4. 栄養体 (症例1) (×400)

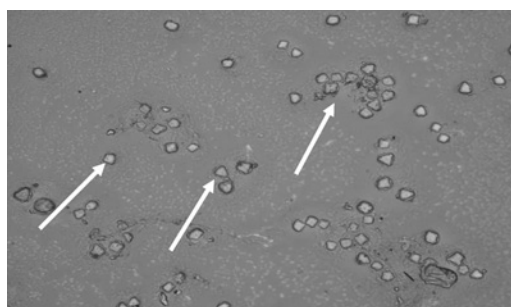


図5. シスト (症例2) (×400)

表2. 培養結果

症例	培養陽性時 時推定病日 (日)	検出までの 培養日数 (日)	検出時の 病原体	陽性までの 試行回数 (回)
1	46	1	栄養体	3
2	26	6	シスト	2
3	16	5	シスト	1
4	14	3	栄養体	2
5	15	3	栄養体・シスト	3
6	未実施	未実施	未実施	未実施
7	20	2	栄養体	1
8	不明	2	栄養体	2
9	14	3	栄養体	1
10	17	6	シスト	1
11	21	3	栄養体・シスト	1
12	29	2	栄養体	1
13	17	2	栄養体・シスト	2
14	12	3	栄養体	1
15	9	1	栄養体	1
16	6	6	栄養体・シスト	1

した。アメーバ感染以外にもドライアイなど複数の疾患が重なっているために、臨床経過が複雑で、病日の推定が困難であった1症例を除き、培養陽性時の推定

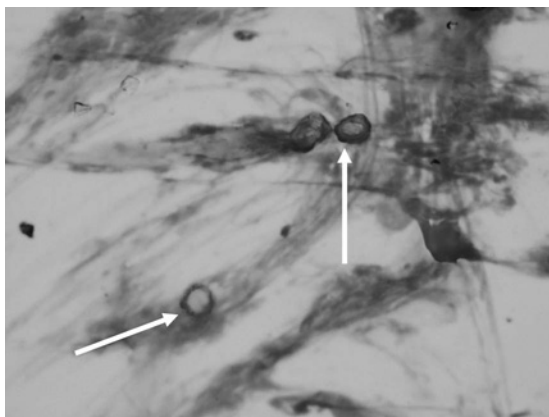


図6. グラム染色像 (症例1) (×1,000)

表3. グラム染色結果

症例	グラム染色陽性時 推定病日 (日)	検出までの施行回数 (回) (検出なしの場合の施行回数)
1	55	3
2	検出なし	(5)
3	検出なし	(2)
4	31	7
5	17	4
6	6	2
7	検出なし	(1)
8	不明	8
9	20	2
10	検出なし	(1)
11	検出なし	(1)
12	未実施	未実施
13	検出なし	(8)
14	未実施	未実施
15	未実施	未実施
16	未実施	未実施

病日数は6日から46日目(平均18.7日)であった。培養開始から栄養体もしくはシスト型の虫体を検出するまでの日数は1~6日(平均3.2日)であった。陽性になるまでの培養試行回数は1~3回で、6例(40.0%)が複数回の検査を要した。*Acanthamoeba* spp. は、栄養体単独で8例(53.3%) (図4: 症例1)、シスト型単独で3例(20.0%)が検出され (図5: 症例2)、4例(26.7%)は栄養型とシスト型が混在して検出された。栄養体は1日目から観察され、シストは2~6日と比較的培養が進んでから観察された(表2)。

一般細菌、真菌の培養は14例について実施し、3例(21.4%)で *Propionibacterium* spp., グラム陽性桿菌、ブドウ糖非発酵グラム陰性桿菌がHK半流動培地で

検出された。DHL 寒天培地, 羊血液寒天/チョコレート平板培地では菌の発育は認めなかった。臨床症状からこれらの検出菌は角膜炎の原因とは考えられなかった。真菌は HK 半流動培地, 平板培地ともに検出されなかった。

グラム染色は 12 例で実施し, 6 例 (50.0%) で検出された。検出された虫体はすべて二重壁構造を持つシストであった (図 6: 症例 1)。検出されなかった症例のうち, 3 例では 2~8 回の検査を実施したにもかかわらず検出できなかった。病日の推定が困難であった 1 例を除き, グラム染色陽性時の推定病日数は 6~55 日 (平均 25.8 日) であり, 培養よりも病日数が長かった (表 3)。

培養, グラム染色ともに複数回施行例は 2 から 7 日の間隔をおいて実施していた。

考 察

Acanthamoeba spp. による角膜炎は何らかの角膜上皮障害の後, アメーバが角膜に感染して発症する。85% は CL 装用者に見られ, 残りの 15% は外傷が原因と報告されている^{11~13})。CL がそのリスクファクターとなるのは, CL による角膜上皮障害と CL そのものに汚染があって感染するためと考えられる。近年のアカントアメーバ角膜炎急増の背景としては 2 週間あるいは 1 カ月タイプなど頻回交換型のソフト CL の普及に伴って CL の使用者が急増したことと, 使用者の CL 管理方法に問題があることが指摘されている。実際に当院の患者では全例においてその発症に CL の関与が認められた。本検討ではディスポーザブルを含むソフトタイプの CL 12 例 (75%), 酸素透過性ハード CL 4 例 (25%) であったが, 現在の一般的な CL 使用者の割合から考慮すると酸素透過性ハード CL による発症頻度が比較的高いように思われた。

アカントアメーバ角膜炎では病巣からの *Acanthamoeba* spp. の検出が診断の決め手となる。初期はアメーバの数が少ないため検出が困難であるが, 病期が進み完成期になると表層部にアメーバが多くなるため検出率が上がるといわれている¹⁴)。症例 2, 3, 10 はグラム染色では検出できず, 培養検査においても他の症例よりも病原体検出までに時間がかかったことより, 表層部にアメーバ数が少なかったことが示唆された。臨床的に病期を明確に区別することは困難であるが¹⁵)、症例 2, 3, 10 においては初期の段階であったと考えられた。症例により, 自覚症状が現れてから検出までの期間は大きな幅があり, 前処置を含め, アメーバの増殖は一定ではないことが示唆された。 *Acanthamoeba*

spp. は 2 life cycle で, 栄養型とシストからなり, 栄養型は環境に存在する細菌を常食として倍数分裂で増加する。しかし, 環境が悪化した場合には耐久性のシストとなる。今回筆者らの検査では栄養型は培養後 1~6 日目に検出され, シストは 2~6 日目に栄養型と混在もしくはシスト単独で観察された。このことより培養初期から栄養型, シストともに視野に入れた観察が必要であると考えられた。

Acanthamoeba spp. による角膜炎の予後は治療開始時期に依存するといわれている¹⁶)。それゆえ早期の確定診断が望まれるが, 当院では受診から診断まで最長 3 回の検査を要した。菌体の証明には採取病時期, 検査方法が影響することが示唆されたため, 抗菌薬や抗真菌薬に抵抗性の角膜炎の場合には *Acanthamoeba* spp. も視野に入れ, 複数回検査を行うことが必要であると考えられた。

当院での 16 症例においては同じ医師が診察しており, 検体採取においても同医師が実施していた。複数回数施行例が古い症例に多いことより, 検体採取の熟練度も検出感度に影響する可能性が示唆された。早期に診断が確定して治療が開始できれば良好な予後が得られるにもかかわらず, 初期の段階ではアメーバを検出することが困難であり, 特徴的な角膜所見を呈してこないため診断が困難である。眼科医は典型的な角膜所見でなかったとしても, また搔爬による検体からアメーバが最初から検出されなくても, アカントアメーバ角膜炎の可能性も考慮に入れ, CL や保存液を提出してアメーバの有無を調べる必要がある。そして検査室側では臨床症状などの患者情報を積極的に得ることにより, 通常的一般細菌検査で菌が発育せず, 検出された菌が臨床所見と一致しない場合は *Acanthamoeba* spp. も視野に入れた培養をする必要があると思われた。

アカントアメーバ角膜炎は初期の段階で確定診断することにより抗アメーバ治療で良好な視力予後が期待できる。そのためには医師と臨床検査技師が積極的に情報交換し, 連携して対処することが非常に重要であると考えられた。

文 献

- 1) Nagington, J., P.G. Watson, T.I. Playfair, J. McGill, B.R. Jones. 1974. Amoebic infection of the eye. *Lancet* 2: 1537-1540.
- 2) 石橋康久, 松本雄二郎, 渡辺亮子, 他. 1988. *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* 92: 963-972.

- 3) 平野耕治, 高良俊武, 楊 京華, 他. 1996. アカントアメーバ角膜炎終末例. 臨眼 50:1340-1341.
- 4) 石橋康久, 渡辺亮子, 加畑隆道, 他. 1990. イトラコナゾール内服が奏効したアカントアメーバ角膜炎の2例. 臨眼 44: 551-555.
- 5) 伊藤陽一, 月川一恵, 佐藤憲夫, 他. 1989. 重症化した *Acanthamoeba* 角膜炎の1例. あたらしい眼科 6: 1362-1366.
- 6) 塩田 洋, 内藤 毅, 小西裕美子, 他. 1990. 角膜ヘルペスと誤診されたアカントアメーバ角膜炎の2例. 臨眼 43: 302-303.
- 7) 2008年角膜カンファレンス抄録集.
- 8) 石橋康久, 松本雄二郎, 渡辺亮子, 他. 1988. *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 92: 963-972.
- 9) 石橋康久, 本村幸子. 1988. アカントアメーバ角膜炎. あたらしい眼科 5: 1689-1696.
- 10) 石橋康久. 2003. アカントアメーバ角膜炎. 臨眼 57: 176-181.
- 11) 石橋康久. 2002. アカントアメーバ角膜炎 37 自験例の分析. 眼科 44: 1233-1239.
- 12) 宮川嘉隆. 1991. *Acanthamoeba* の基礎とコンタクトレンズ. 眼科 33: 713-717.
- 13) 高沢朗子, 石橋泰久. 1991. コンタクトレンズと感染症—Contact lens and corneal infection—. 眼科 36: 877-882.
- 14) 石橋泰久, 本村幸子. 1991. アカントアメーバ角膜炎の診断と治療. 眼科 33: 1355-1361.
- 15) Bacom, A. S., J. K. G. Dart, L. A. Ficker, et al. 1993. *Acanthamoeba* keratitis. The value of early diagnosis. *Ophthalmology* 100: 1238-1243.
- 16) Dougherty, P. J., P. S. Binder, B. J. Mondino, et al. 1994. *Acanthamoeba* sclerokeratitis. *Am. J. Ophthalmol* 117: 475-479.

16 Cases of *Acanthamoeba* Keratitis

Tomomi Ohara, Yuri Iwazaki, Akiko Sonoda, Yoshihiro Imaeda

Department of Clinical Laboratory Medicine, Fujita Health University Second Hospital,
3-6-10 Otoubashi, Nakagawa-ku, Nagoya-shi, Aichi 454-8509

Amoeba keratitis is a disease caused by *Acanthamoeba*. Since it can be difficult to distinguish from corneal herpes and keratomycosis, early definitive diagnosis is needed. Over four years from 2005 to 2008 we investigated 16 cases in which *Acanthamoeba* keratitis was suspected clinically, and detected *Acanthamoeba* with gram stain and in culture. The patients were 16 people aged from 17 to 55 years, with the majority being in between 10 and 30 years. All of the patients in whom *Acanthamoeba* was detected wore contact lenses. Trophozoites were detected 1-6 days after culturing with nutrients. Cysts were observed on day 2-6, either mixed with trophozoites or alone. The prognosis of keratitis from *Acanthamoeba* depends on the time when treatment is started, and so an early definitive diagnosis is desirable. At our hospital tests are conducted three times at most from examination until a definitive diagnosis is made. The collection period and test methods have been suggested to influence verification of the germ body, and *Acanthamoeba* should be kept in mind in cases of keratitis that are resistant to antimicrobials and antifungal agents. Repeated tests are sometimes needed.