

症 例

アcantアメーバ角膜炎の3例

——角膜擦過細胞診でのアcantアメーバ原虫の同定——

堀越美枝子¹⁾ 石原 力¹⁾ 石井 英昭²⁾ 伊古田勇人³⁾山口由美子⁴⁾ 柏原 賢治⁵⁾ 城下 尚⁶⁾ 村上 正巳⁷⁾群馬大学医学部附属病院病理部¹⁾, 日本医科大学武蔵小杉病院病理部²⁾, 深谷赤十字病院検査部³⁾,群馬大学医学部附属病院眼科⁴⁾, 済生会前橋病院検査科⁵⁾, 東邦病院病理部⁶⁾,群馬大学大学院医学系科病態検査医学⁷⁾

背景：アcantアメーバ角膜炎 (Acanthamoeba keratitis) はコンタクトレンズ装着者に増加傾向がみられる。原因は淡水、土壌等に生息しているアcantアメーバ (Acanthamoeba) の感染によるもので、角膜擦過細胞診標本にて嚢子 (cyst), 培養検査にて原虫の嚢子 (cyst), 栄養体 (trophozoite) を検出できた3例を経験したので報告した。

症例：角膜擦過細胞診で原虫の嚢子が確認できた。パバニコロウ染色ではライトグリーンにより嚢子壁が染色され、内部は茶褐色あるいは不染性であった。PAS染色では嚢子壁陽性、嚢子内部は暗赤色を呈していた。ギムザ染色では嚢子壁が青紫色に好染した。また、培養により得られた塗抹標本に蛍光染色を施し、蛍光を発するアcantアメーバの嚢子を検出できた。

結論：アcantアメーバ角膜炎はアcantアメーバ原虫を検出し、早期に治療することが重要である。検出方法には病巣擦過物のパーカーインク KOH法による直接鏡検あるいは培養が代表的な検査方法であるが、角膜擦過細胞診標本でパバニコロウ染色、PAS染色、ギムザ染色標本の鏡検によるアcantアメーバ原虫の検出は簡便であり、早期に治療へ結びつくことができるため、有用な検査方法である。

Key words : Acanthamoeba, Acanthamoeba keratitis, Corneal scraping cytology, Case report

I. はじめに

近年、コンタクトレンズ使用者にアcantアメーバ角膜炎 (Acanthamoeba keratitis) が増加し、眼科領域で問題となっ

ている。本疾患は、湖沼、プール、土壌等に分布する自由生活原生動物であるアcantアメーバ原虫 (以下原虫と略す) の角膜への感染で起こる。アcantアメーバ角膜炎は難治性で放置すると角膜潰瘍を形成することもあり、原虫を的確に同定し、早期に治療を開始することが重要である。

Three cases of acanthamoeba keratitis—Detection of protozoa by ordinal cytological preparation of corneal scrapes—

Mieko HORIKOSHI¹⁾, C.T., J.S.C., I.A.C., Tsutomu ISHIHARA¹⁾, C.T., J.S.C., Hideaki ISHII²⁾, M.D., Hayato IKODA³⁾, M.D., Yumiko YAMAGUCHI⁴⁾, M.D., Kenji KASHIWABARA⁵⁾, M.D., Takashi JOSHITA⁶⁾, M.D., Masami MURAKAMI⁷⁾, M.D.

¹⁾Department of Pathology, Gunma University Hospital

²⁾Department of Pathology, Musashikosugi Hospital Nippon Medical School

³⁾Department of Pathology, Fukaya Red Cross Hospital

⁴⁾Department of Ophthalmology, Gunma University Hospital

⁵⁾Department of Clinical Laboratory Medicine, Saiseikai Maebashi Hospital

⁶⁾Department of Pathology, Toho Hospital

⁷⁾Department of Clinical Laboratory Medicine, Gunma University Graduate School of Medicine

論文印刷請求先 〒371-8511 群馬県前橋市昭和町3の39の15 国立大学法人群馬大学医学部附属病院病理部 堀越美枝子

平成19年8月15日受付

平成19年10月4日受理



Photo. 1 "Frosted glass" turbidity from the upper to middle anterior corneal epithelium of the right eye. Slit-lamp microscopy.

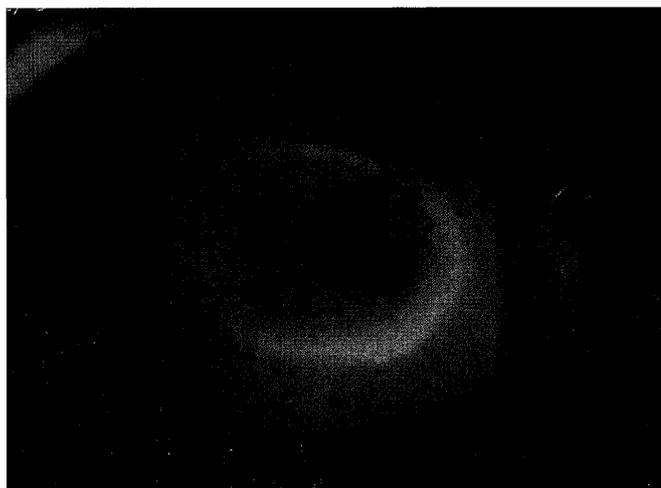


Photo. 3 Ringed-ulcerative lesion in the corneal anterior epithelium of the right eye. Slit-lamp microscopy.

今回、われわれは角膜炎と診断された患者の角膜擦過細胞診で原虫の囊子型を培養検査による同定に先行して確認しえた3例を経験し、アカントアメーバ角膜炎の診断に角膜擦過細胞診が有用であることを明らかにしたので報告する。

II. 症 例

症例 1: 34 歳, 男性. コンタクトレンズ使用者. 2000 年春頃より右眼に充血と痛みあり, 近医を受診するも改善せず, 5 ヶ月後に当院眼科を受診した. 細隙灯検査では, 右眼に強い毛様充血, 角膜中央上皮から上皮下にすりガラス様混濁がみられた (Photo. 1). アカントアメーバ角膜炎疑いにて, 眼脂の塗抹検鏡, 培養が施行されたが, 原虫は確



Photo. 2 Radial invasion and cloudiness close to the corneal anterior epithelium of the left eye. Slit-lamp microscopy.

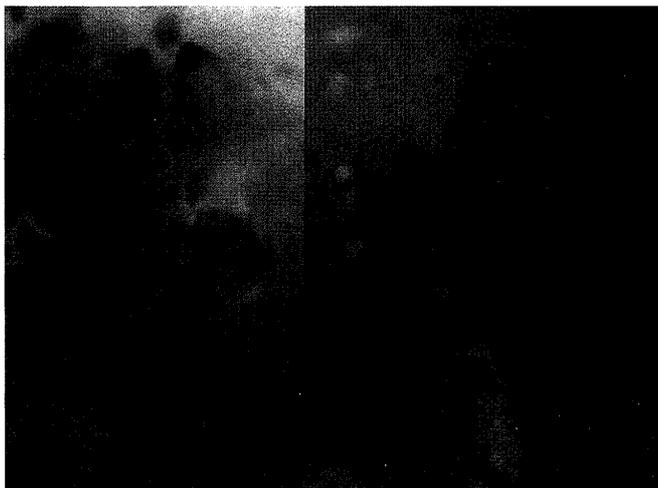
認できなかった. 同時に採取された角膜擦過細胞診検査にて囊子が証明できた. 治療はフルコナゾール, ミコナゾールによる点眼治療により軽快し, 外来にて経過観察となった.

症例 2: 40 歳, 女性. コンタクトレンズ使用者. 2005 年春頃より左眼が開けにくく, 充血と痛みがあり, 近医を受診するも改善せず, 当院眼科を受診した. 細隙灯検査では, 左眼角膜に放射状の浸潤, 混濁がみられた (Photo. 2). 受診時の角膜擦過細胞診にて囊子を検出し, その後, 培養検査で栄養体の寒天上での運動が軌跡としてみられ, グラム染色標本で栄養体, 囊子が検出できた. フルコナゾール, ミコナゾールの点眼薬, フロリド点滴により治療を行い軽快し, 経過観察となった.

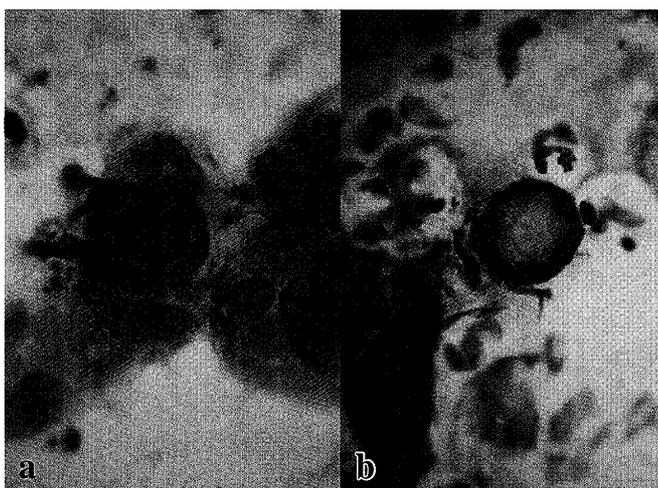
症例 3: 31 歳, 女性. 臨床診断は角膜潰瘍. コンタクトレンズ使用者. 2006 年春頃より右眼に異物感あり, 数ヵ所医院を受診したが全く改善なく, 当院眼科を受診した. 細隙灯検査では, 右眼に毛様充血と角膜浮腫がみられ, リング状の角膜病変がみられた (Photo. 3). 角膜擦過細胞診検査, 培養により原虫の囊子が確認できた. フルコナゾール, ミコナゾール点眼治療に加え, 角膜搔爬が数回施行された. 改善傾向がみられ, 外来にて経過観察となった.

III. 細胞診および培養検査所見

症例 1: 角膜擦過細胞診標本で核腫大のみられる角膜上皮細胞が集塊で認められ, その中に, 好中球, 囊子状態の原虫を認めた. パパニコロウ染色標本では囊子内部は茶褐色あるいは不染であったが, ライトグリーンに淡染性の厚い囊子壁と 2 重膜構造が認められた (Photo. 4a). また, PAS 染色では囊子壁は赤色調, 囊子内部は暗赤色であった

**Photo. 4** Case 1

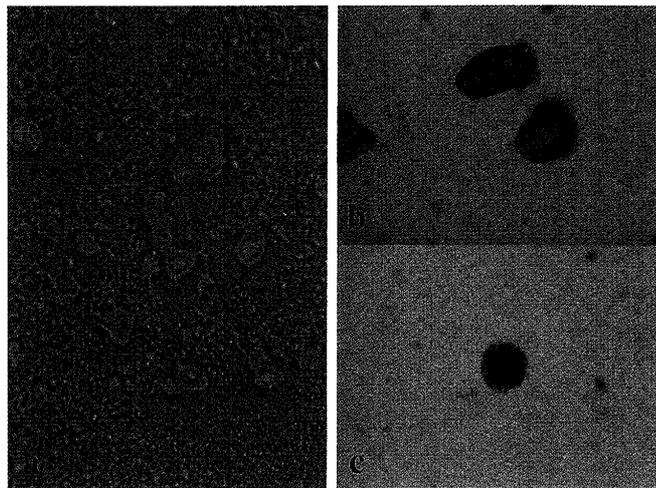
- a : Acanthamoeba protozoan cyst recognized with sponge cytology. The inside is observed as brown or unstained, but thick cyst walls and two-membrane structures are weakly observed as light green in Papanicolaou staining.
- b : PAS staining also with the cyst wall red and the interior dark red.

**Photo. 6** Case 3

Papanicolaou staining shows light green strongly positive in two-membrane Acanthamoeba structure with well-stained nuclei in Photo. 6a in the background of marked inflammatory cell invasion, or not stained nuclei in Photo. 6b.

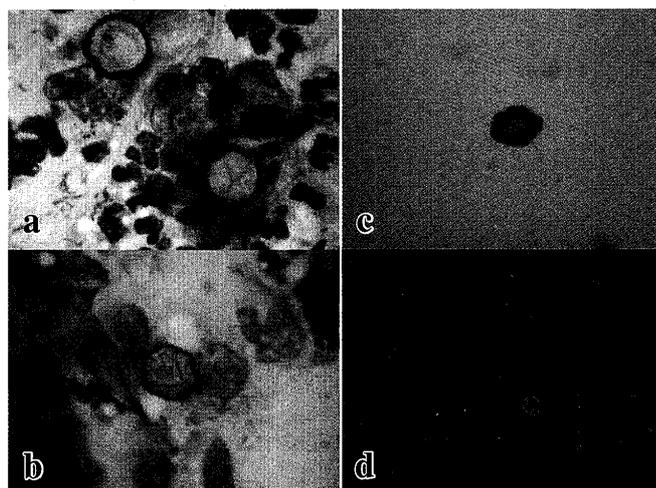
(Photo. 4b).

症例 2：角膜擦過細胞診のパパニコロウ染色標本，ギムザ標本では原虫は認められなかったが，PAS 染色標本で少数の原虫が同定された。この原虫の嚢子壁は不染であったが，嚢子内部は暗赤色に染まった。同時に施行された培養検査では，アcantアメーバ栄養体の培地上での運動が軌跡として認められた (Photo. 5a)。培養のグラム染色では栄養体 (Photo. 5b) と嚢子 (Photo. 5c) の両方が確認された。

**Photo. 5** Case 2

Acanthamoeba trophozoite trail on the surface of culture agar (arrow) in Photo. 5a.

5b and 5c indicate Gram-stained culture agar, recognizing Acanthamoeba trophozoite and protozoan cyst.

**Photo. 7** Case 3

Acanthamoeba negative in Giemsa staining but its protozoan cyst wall showing its presence (Photo. 7a, b).

Protozoan cyst identified in Gram staining and immunofluorescent staining of culture (Photo. 7c).

症例 3：角膜擦過細胞診標本のパパニコロウ染色では著明な炎症細胞浸潤と，上皮細胞の核腫大傾向がみられた。原虫はライトグリーンに淡染性の厚い嚢子壁を有し，嚢子内部は茶褐色 (Photo. 6a) あるいは不染 (Photo. 6b) の 2 重膜様構造を呈していた。ギムザ染色では原虫は不染であったが，嚢子壁周囲または内壁が紫青色に染まり原虫の存在が確認できた (Photo. 7a, b)。また，培養標本のグラム染色 (Photo. 7c) や蛍光染色 (ファンギフローラ Y 染色) にて嚢子が同定された (Photo. 7d)。

IV. 考 察

1974年にNagington¹⁾が、翌1975年にJonesら²⁾が報告して以来、欧米諸国では原虫が角膜炎を起こすことが知られていた。本邦でも1988年に石橋ら³⁾が報告して以来、同症例が報告されているが、コンタクトレンズ使用の普及により、患者数が増加している。実際、発症者の85~90%がコンタクトレンズ使用者であり、そのうちの90%がソフトコンタクトレンズ使用者といわれている。原虫は生水、淡水、土壌、海水、野菜、空気中の埃、あるいは水泳用のプール、室内塵等、多様な環境中に存在している^{4,5)}。原虫は栄養体(trophozoite)と嚢子(cyst)の2形態の生活環を呈す。栄養体は生活中のいろいろな環境に存在する細菌を常食し、倍数分裂で増加する。生育環境条件が悪化した場合には嚢子型になって耐性を示し、不利な環境下でも生存可能となる^{6,7)}。発症者の10~15%は角膜の外傷が感染の誘引となっているといわれている。すなわち、角膜上皮が健全な場合、原虫は角膜内部に侵入できないが、角膜上皮が障害された時に初めて原虫が角膜内部に侵入でき、そこに寄生し、角膜炎を起こすと考えられている⁸⁾。特に、コンタクトレンズの不適切な着用により角膜に損傷を生じ、レンズの着脱の際に、原虫に汚染されたコンタクトレンズケースの汚染やレンズ、手指を介しての感染が成立しやすくなっていると考えられる。コンタクトレンズの使用の80%はソフトコンタクトレンズである。しかし、コンタクトレンズの使用が原虫感染の重要なリスクファクターのトップであるが、どの様な種類のコンタクトレンズにも発症しうる⁹⁾。角膜炎を放置すると、原虫が角膜深部に侵入し、角膜潰瘍など重篤な症状をきたすので、原虫が上皮や実質のごく表層に限局している初期段階で原虫を検出し、診断することが重要である。

検出方法としては共焦点顕微鏡の使用、上皮や実質の生検、アcantアメーバDNAのPCR法、病巣擦過物のパーカーインクKOH法による直接鏡検あるいは分離培養法がある。これらの中で一番特異度の高い方法は分離培養法と考えられるが、培養には時間がかかり、分離同定率も40~70%と原虫の検出法としては低く、的確な方法とはいえない¹⁰⁾。

今回、われわれは角膜擦過物を用いた通常の細胞診断学的手法(パパニコロウ染色、PAS染色、ギムザ染色標本)で、嚢子を同定し、その後、培養検査で栄養体、嚢子を確認した。すなわち、原虫はパパニコロウ染色ではライトグリーンに淡染性の厚い嚢子壁を有する2重膜構造、外壁は不規則な突起と襞がみられ、内側は放射状あるいは球状、多角形で嚢子内部は茶褐色あるいは不染性であった。PAS

染色では外壁、内壁間是不染であり、嚢子内部は暗赤色であった。ギムザ染色標本では嚢子壁周囲が紫青色に染色され、嚢子内部は不染であった。症例2, 3では角膜擦過物の培養検査も同時に行われた。症例2の培養検査では寒天培地上での原虫の動きが軌跡としてみられ、グラム染色にて原虫の栄養体、嚢子の両方が確認された。症例3の培養ではグラム染色、蛍光染色で嚢子を確認した。

アcantアメーバ角膜炎の治療に原虫を早期に同定し、確定診断することが重要である⁹⁾。培養検査で栄養体を検出するには4~5日、嚢子型を検出するには6~7日を要する。一方、パパニコロウ染色やギムザ染色、PAS染色による細胞診断標本の直接観察では、角膜擦過から30分足らずで原虫の嚢子を検出することができるので、非常に早い段階で治療を開始できる可能性がある。

V. ま と め

アcantアメーバ角膜炎では原因である原虫を早期に検出し、治療することが重要である。原虫の検出には、上皮生検や実質生検による病理組織検査、病巣擦過物のパーカーインクKOH法による直接鏡検や分離培養法によるや共焦点顕微鏡を用いた微生物学的同定法、アcantアメーバのDNA(PCR法)での分子生物学的同定等の方法がある。しかし、これら方法では時間を要し簡便でない。一方、細胞診検体の染色標本では検体処理から鏡検まで短時間で迅速に診断可能である。

今回の報告でアcantアメーバ角膜炎の診断に細胞診が非常に有用であることを明らかにするとともに、細胞診検査者は、アメーバ原虫の生育形態について知悉すべきことを示した。

Abstract

Background: Acanthamoeba, a protozoan living in fresh water or soil, may infect the human cornea and provoke inflammation. Cases of acanthamoeba keratitis are increasing among contact lens users. We report three cases in which acanthamoeba cysts were detected by ordinal cytological corneal scraping.

Cases: All patients used contact lenses. Cytological examination of corneal scraping showed protozoan cysts. Papanicolaou staining showed the cyst wall as light green whereas the cyst interior stained as brown or unstained. In periodic acid Schiff staining, the cyst wall stained red-pink and the interior dark red. Gimsa staining showed the cyst wall as blue-violet. We judged the protozoa to be acanthamoeba as later confirmed by fluorescent staining applied to the cell culture of corneal scraping.

Conclusion: To avoid serious complications in acanthamoeba keratitis, it is critical to detect causative organisms promptly. Optical detection

by Parker Inke and KOH and cell culture of corneal scraping are conventional for acanthamoeba detection, but cytological preparation using Papalicolau, PAS, and Gimsa staining is more convenient and rapid for early medical treatment of acanthamoeba keratitis.

文 献

- 1) Nagington, J., Watson, P.G., Playfair, T.J. Amoebic infection of the eye. *Lancet* 1974 ; 2 : 1537~1540.
- 2) Jones, D.B., Visvesvara, G.S., Robinson, N.M. Acanthamoeba polyphaga keratitis and Acanthamoeba uveitis associated with fetal meningoencephalitis. *Trans Ophthalmol Soc UK* 1975 ; 95 : 221~232.
- 3) 石橋康久, 松本雄二郎, 渡辺亮子, 木村幸子, 安羅岡一男. Acanthamoeba keratitis の 1 例. *日眼会誌* 1988 ; 92 : 963~972.
- 4) Visvesvara, G.S., (宮永嘉隆, 訳). アカントアメーバの生物学およびアカントアメーバ角膜炎の疫学. *眼科* 1991 ; 33 : 719~726.
- 5) 山浦 常, 白坂龍曠, 松本克彦, 中井呈子, 坂上英紀. 室内塵からのアカントアメーバの検出. *寄生虫学雑誌* 1993 ; 42 : 103~135.
- 6) McCulley, J.P., (宮永嘉隆, 訳). アカントアメーバ角膜炎の臨床的展望. *眼科* 1991 ; 33 : 728~736.
- 7) Heidemann, D.G., Verdier, D.D., Dunn, S.P. Acanthamoeba keratitis associated with disposable contact lenses. *Am J Ophthalmol* 1990 ; 110 : 630~634.
- 8) 日比野佐和子. アカントアメーバ角膜炎における放射状角膜神経炎およびシスト. *あたらしい眼科* 2004 ; 21 : 51~52.
- 9) 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 : 1005~1010.
- 10) Mathers, W.D. アカントアメーバ角膜炎の新しい診断法. *あたらしい眼科* 2000 ; 17 : 1251~1259.