

令和 3 年 6 月 8 日現在

機関番号：13301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2020

課題番号：16K20310

研究課題名(和文)アカントアメーバ角膜炎の超早期診断法の開発と発症機序の解明

研究課題名(英文)Development of early diagnostic method and elucidation of pathogenic mechanism for Acanthamoeba keratitis

研究代表者

森 奈津子(Mori, Natsuko)

金沢大学・医学系・協力研究員

研究者番号：80768747

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：集まったアカントアメーバ角膜炎症例に対し、レーザー生体共焦点顕微鏡、前眼部光干渉断層計、PCR各検査データを集めた。また、放射状角膜神経炎をレーザー共焦点顕微鏡、前眼部光干渉断層計(OCT)を用いて解析した。既存の抗がん剤、抗真菌薬の抗アカントアメーバ作用、抗シスト効果を評価した。アカントアメーバ角膜炎の診断前の治療、診断までの日数、治療日数等、諸因子に対し、視力予後に関するデータを解析したので、学会発表し論文にまとめる予定である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

アカントアメーバは原生動物の一種であり、このアメーバが角膜に感染することによりアカントアメーバ角膜炎が引き起こされる。アカントアメーバ角膜炎は比較的稀な疾患であるが、失明にまで至る難治性角膜感染症である。近視人口の増加によるコンタクトレンズ使用の増加、低年齢化や、カラーコンタクトレンズ使用の増加に伴い近年増加傾向にあり、社会的な問題となりつつある。本症は早期診断が難しく治療に抵抗し、若年例での失明症例も増加していることから、本症の早期診断と治療法の開発は急務である。

研究成果の概要(英文)：Acanthamoeba keratitis cases were added. For the addition of Acanthamoeba keratitis cases, laser confocal microscopy, anterior segment optical coherence tomography, and PCR test data were collected. In addition, radial keratoneuritis were analyzed using a laser confocal microscope and an anterior optical coherence tomography (OCT). The anti-Acanthamoeba and anti-cystic effects of existing anti-cancer agents and antifungal agents were evaluated. We have analyzed data on visual acuity prognosis for various factors such as pre-diagnosis treatment of Acanthamoeba keratitis, days until diagnosis, and treatment days, and we plan to publish the data.

研究分野：角膜

キーワード：アカントアメーバ角膜炎 アカントアメーバ 角膜感染症 前眼部OCT 共焦点顕微鏡

1. 研究開始当初の背景

アカントアメーバは原生動物の一種であり、このアメーバが角膜に感染することによりアカントアメーバ角膜炎が引き起こされる(図1-7)。アカントアメーバ角膜炎は比較的稀な疾患であるが、コンタクトレンズ装用との関連が明らかとなつて以来、近年急速に増加の傾向にあり、健康な若年者が罹患し、失明にまで至ることもあって、社会的に大きな問題となっている。早期の診断および治療が予後にとって極めて重要であるが、臨床所見のみからは診断が難しいことが多く、極早期診断法の確立が求められている。研究代表者はこれまでにアカントアメーバ角膜炎についての研究を粘り強く続けており、その成果の一つとして、早期診断における角膜専用レーザー生体共焦点顕微鏡により角膜内シストの生体画像診断の有用性について報告した(図5)。また、本装置を用いた診断率を高めるために、培養したアメーバ栄養体の生体観察を行い、生体角膜内における高輝度の不純物(壊死した角膜上皮や炎症細胞)との鑑別のポイントについて報告した(図7)。さらに、初期のアカントアメーバ角膜炎に特徴的な臨床所見である、放射状角膜神経炎の共焦点顕微鏡所見と前眼部OCTについて世界で初めて報告した(図8)。これらの画像診断と同時に、最近では患者から採取した涙液を用いたアカントアメーバDNAのPCRを同時に行い、早期診断方における有用性と共に、北陸地域における感染性アメーバ株の遺伝子分類を試みている(図6)。また、最近我々は、アカントアメーバ角膜炎患者がアカントアメーバ感染時に血清の抗体価が上昇することを発見し(未発表)、これを応用して血清の抗体価、更に涙液の抗体価からアカントアメーバ角膜炎感染の有無を極早期に簡潔に診断可能ではないかと考えた。また、放射状角膜神経炎の研究を進め、アカントアメーバ角膜炎の病態を解明することで早期診断・治療の手掛かりを得ることができないかと考えていた。

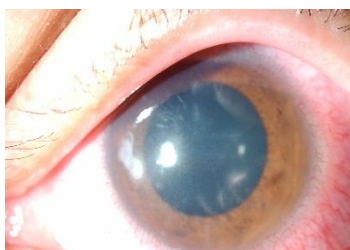


図1 アカントアメーバ角膜炎初期

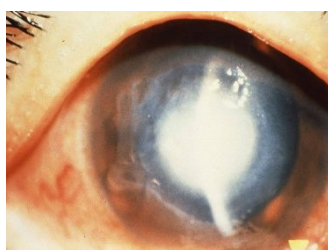


図2 アカントアメーバ角膜炎末期

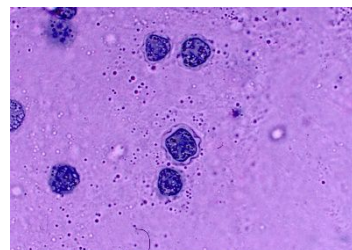


図3 パーカーインク染色したアメーバシスト

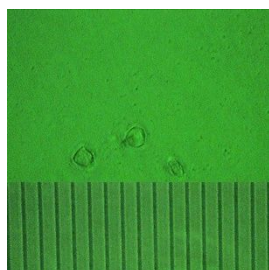


図4 培養したアメーバシスト

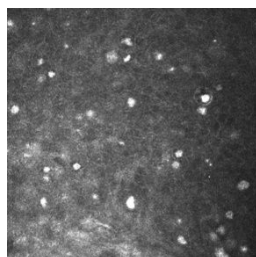


図5 アメーバシストの共焦点顕微鏡所見

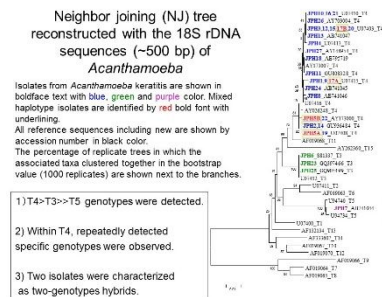


図6 北陸地域におけるアメーバの遺伝子分類

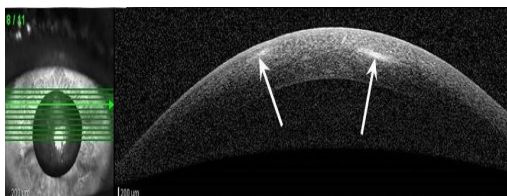


図7 放射状角膜神経炎の前眼部OCT所見

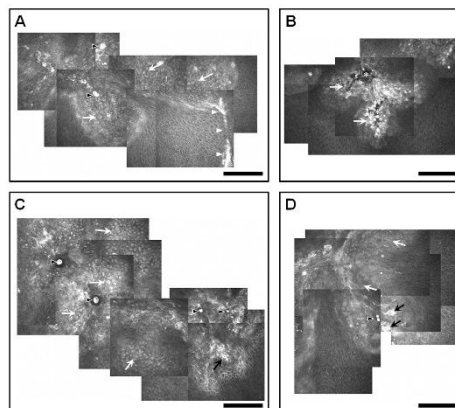


図8 レーザー共焦点顕微鏡を用いたヘルペス角膜炎の樹枝状病変のマッピング

2. 研究の目的

- (1) 本研究では、レーザー共焦点顕微鏡と前眼部光干渉断層計を用いてアcantアメラバ角膜炎における角膜の生体超微細構造を明らかにし、診断的価値のある情報を抽出することが第一の目的である。
- (2) 更に、多数の画像を用いたマッピングテクニックを用いてアcantアメラバ角膜炎における偽樹枝状角膜病変と放射状角膜神経炎の2次元ならびに3次元構造を明らかにする。(図8参照)
- (3) アcantアメラバ血清抗体、涙液抗体を時系列に観察し、その推移から極早期診断・病態の遷延について解析する。可能であれば、ELISAを使用して、涙液からのアcantアメラバ角膜炎の迅速診断法を開発する。
- (4) 前房水を用いたPCRによる病原体のDNAの検出と、両画像撮影機器の診断率の違いについて、感度と特異度を解析し、PCR診断の位置づけについて評価を行う。
- (5) アcantアメラバ角膜炎の新薬を開発する。

3. 研究の方法

- (1) **レーザー共焦点顕微鏡を用いたアcantアメラバ角膜炎症例角膜における生体微細構造の解析と広範囲マッピング解析**
レーザー共焦点顕微鏡 (Heidelberg Retina Tomograph 2 Rostock Cornea Module, HRT2-RCM, Heidelberg Engineering GmbH, Heidelberg, Germany) を用いて、角膜中央の生体観察を角膜上皮、実質、内皮の各レベルにおいて広範囲に行う。対象眼を塩酸オキシブプロカインで表面麻酔した後、角膜にHRT2-RCMのレンズキャップを接触させ、角膜中央部における前述した様々な深さで、可能な限り広範囲にスキヤニングを行う。得られる2次元画像は1枚当たり384×384ピクセルの解像度を持ち、これは角膜上の0.4×0.4mmの範囲に相当する。得られた多数のイメージをコンピュータプログラム (Adobe Photoshop; Adobe Systems, San Jose, CA, USA) を用いて結合し、広範囲モンタージュを作成し、病態を解明する。
- (2) **前眼部光干渉断層計 (OCT) を用いたアcantアメラバ角膜炎症例における2次元・3次元構造の解析**
OCT (RTVue, Optovue, Inc. Fremont, CA, USA) を用いて、角膜中央の生体観察を角膜上皮、実質、内皮の各レベルにおいて広範囲に行う。特に、上皮付近でのシストの状態の観察に主眼を置き、得られた多数のイメージをコンピュータプログラム (Adobe Photoshop; Adobe Systems, San Jose, CA, USA) を用いて結合し、広範囲モンタージュを作成する。
- (3) **アcantアメラバ角膜炎症例の他覚的・自覚的視機能の解析**
矯正視力、角膜内皮細胞密度とその減少率、コントラスト感度測定、高次収差 (オクルス社製前眼部解析装置ペンタカムを使用) 眼圧の測定を行い、他覚的な視機能検査を行う。得られたデータについて、Statview ソフトウェアを用いた統計解析を行い、病期分類作成の参考とする。また、患者において、当院受診時と、治療終了後において、The National Eye Institute Visual Function -25 (VFQ-25) 日本語版を用いて術後の視覚関連機能を検討する。VFQ-25 日本語版は、すでに信頼性と妥当性が確認され、眼手術による視覚機能改善の評価に使用されている。得られた VFQ-25 の総合スコアについて、Statview ソフトウェアを用いた統計解析を行い、各群間での比較とその他の眼疾患における過去のデータとの比較を行う。
- (4) **アcantアメラバ角膜炎症例における診断の感度と特異性について**
アcantアメラバ角膜炎症例において、これまでに検査を行った、レーザー共焦点顕微鏡、前眼部光干渉断層計検査に加えて、前房水のPCR、血清・涙液のアcantアメラバ抗体の情報を合わせ、各検査の感度と特異性について解析し、早期診断法を確立する。
- (5) **アcantアメラバ角膜炎に効果のある薬剤を既存薬で探索する**

まずは既存の抗がん剤で眼科と関連する 5FU、マイトマイシン、パクリタキセルを使用し、抗アメーバ効果、抗シスト効果があるか実験を行う。

4. 研究成果

(1) 当院における過去 11 年間のアcantアメーバ角膜炎症例 26 症例 27 眼における治療前のステロイド点眼の影響について検討した。

症例を治療前にステロイド点眼なし群 (N) 12 例 12 眼 (男性 6 例 6 眼、女性 6 例 6 眼、平均年齢 24.0 歳)、ステロイド点眼あり群 (S) 14 例 15 眼 (男性 5 例 5 眼、女性 9 例 10 眼、平均年齢 28.7 歳) 比較検討した。年齢、性別、左右、偽樹枝状病変の有無、放射状角膜神経炎の有無、診断時のステージ、治療開始までの日数、治療期間、角膜上皮掻痒回数で有意差は認めなかった。治療前視力と治療後の最終視力に有意差を認めた。

アcantアメーバ治療前にステロイド点眼を使用すると、アcantアメーバの活動性が活発になり、角膜下・実質混濁を生じ、治療前から視力低下が認められ、アcantアメーバ治療後も角膜実質混濁の残存・血管侵入等で治療後も視力向上が困難であると考えられた。

2群のまとめ				結果			
ステロイド	なし (N) 群	あり (S) 群	p値	ステロイド	なし (N) 群	あり (S) 群	p値
年齢 (歳)	24±5.7	28.7±10.8	0.24 *	治療開始までの期間 (日)	10.6±4.4	19.9±16.1	0.2
性別 (男:女)	6:6	5:9	0.69 *	治療期間 (日)	60.8±24.9	83.1±59.9	0.755
眼 (右:左)	8:4	8:7	0.7 *	角膜上皮掻痒 (回)	2.25±1.4	5.6±6.0	0.167
ステージ (初期:移行期)	11(91.7%):1(8.3%)	11(73.3%):4(26.7%)	0.34 *	治療前視力 (LogMAR)	0.34±0.11	0.84±0.35	0.025
偽樹枝状病変	11(91.7%)	15(100%)	0.44 *	最終視力 (LogMAR)	-0.079±0.0046	0.0±0.13	0.028
上皮下混濁			*				
結膜充血	12(100%)	15(100%)	1				
放射状角膜神経炎	10(83.3%)	14(93.3%)	0.19				

Mann-Whitney U test

★ : Mann-Whitney U test * : Fisher's exact test

各項目に有意差なし

アcantアメーバ角膜炎治療前にステロイド点眼なし群とあり群では、治療前視力と最終視力に有意差が出た。

(2) 抗がん剤 (マイトマイシン、5FU、タクリタキセル)、抗真菌薬 (ミルテフォシン) の抗アメーバ効果、抗シスト効果について実験を行った。

1 回目のトライアルではミルテフォシンに若干の効果が認められたが、2 回目のトライアルではすべての薬剤暴露サンプルで栄養型がほぼ同レベルに出現した。したがって、シストに対する殺原虫作用は、いずれの抗がん剤にも認められなかった。

抗がん剤処理の一部では増殖後のシスト形成の遅延が認められた。具体的には、コントロールおよび 5FU、ミルテフォシン処理では処理後 6 日目までに栄養型は 20% 未満に減少しシスト形成が進行したのに対して、マイトマイシンとパクリタキセル処理では、10 日目においても各々 50% 以上、20% 以上の栄養型の存在が確認された。

本評価結果からも明らかなように、シストの薬剤に対する耐性は極めて高い。したがって、シスト形成を阻止し、栄養型をターゲットとして薬剤を効かせることは、アcantアメーバを原因とする感染症の治療法としては合理的である。

シストに対しては効果が認められなかったマイトマイシンとパクリタキセルは、シスト形成阻止と栄養型に対する殺原虫作用で治療薬として利用可能の可能性があると考えられた。

結果 1 回目

薬剤	1 日目	3 日目	6 日目
A	-	+++	++
B	-	+++	+
C	-	+	+ -
D	-	+++	++

cont.	-	+++	+
-------	---	-----	---

結果 2 回目

薬剤	1 日目	3 日目	6 日目	10 日目	14 日目
A	+ -	++	++	+++	+
B	+ -	++	+	+	+ -
C	+ -	++	+	+	-
D	+ -	++	++	++	+
cont.	+ -	++	+	+ -	+ -

判定

+++ : 栄養体の割合が 50% 以上

++ : 栄養体の割合が 20-49%

+ : 栄養体の割合が 1-19%

+ - : 栄養体の割合が 1% 未満

- : 栄養体が認められない

使用薬剤

A . マイトマイシン : 2mg/5ml アメーバ生食、原液の 0.004% 濃度

B . 5FU : 50mg/ml DMSO をアメーバ生食で 50 倍希釈、1mg/ml 濃度

C . ミルテフォシン : 10mg/5ml アメーバ生食、2mg/ml 濃度

D . パクリタキセル : 5mg/ml DMSO を 0.107ml/5ml アメーバ生食、124.2nM/ml 濃度

control. : アメーバ生食

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計15件（うち査読付論文 15件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Ye Y, Mori N, Kobayashi A, Yokogawa H, Sugiyama K.	4. 巻 10
2. 論文標題 Long-term outcomes of Descemet stripping automated endothelial keratoplasty for bullous keratopathy after argon laser iridotomy	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Japan Journal of Ophthalmology	6. 最初と最後の頁 1007
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nishino T, Kobayashi A, Mori N, Yokogawa H, Sugiyama K.	4. 巻 14
2. 論文標題 In vivo Imaging of Reis-Bucklers and Thiel-Behnke Corneal Dystrophies Using Anterior Segment Optical Coherence Tomography	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Clinical Ophthalmology	6. 最初と最後の頁 2601-2607
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nishino T, Kobayashi A, Mori N, Yokogawa H, Sugiyama K.	4. 巻 10
2. 論文標題 Clinical Evaluation of Electrolysis for Reis-Bucklers Corneal Dystrophies and In Vivo Histological Analysis Using Anterior Segment Optical Coherence Tomography	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cornea	6. 最初と最後の頁 1097
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yokogawa H, Kobayashi A, Mori N, Nishino T, Sugiyama K.	4. 巻 24
2. 論文標題 Visibility of the Retina Through an Air-Filled Anterior Chamber During Simultaneous Vitrectomy and Descemet's Stripping Automated Endothelial Keratoplasty	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Clinical Ophthalmology	6. 最初と最後の頁 2119-2123
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yokogawa H, Kobayashi A, Mori N, Nishino T, Sugiyama K.	4. 巻 39
2. 論文標題 Clinical Evaluation of the "Lifeline Suture" Technique for DSAEK in Cases Without Posterior Capsule Using a Novel Donor Insertion Device	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cornea	6. 最初と最後の頁 523-526
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kobayashi A, Yokogawa H, Mori N, Nishino T, Sugiyama K.	4. 巻 40
2. 論文標題 Graft Edge Reflection of a Tightly Scrolled Roll Using Endoillumination as a Simple Method for Determining Graft Orientation in Descemet Membrane Endothelial Keratoplasty	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cornea	6. 最初と最後の頁 254-257
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kobayashi A, Yokogawa H, Mori N, Nishino T, Sugiyama K.	4. 巻 10
2. 論文標題 Clinical Evaluation of the NS Endo-Insertor, a Novel Donor Insertor for Descemet's Stripping Automated Endothelial Keratoplasty	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Case Report Ophthalmology	6. 最初と最後の頁 357-364
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nishino T, Kobayashi A, Yokogawa H, Mori N, Sugiyama K.	4. 巻 13
2. 論文標題 Changing indications and surgical techniques for keratoplasty during a 16-year period (2003-2018) at a tertiary referral hospital in Japan	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Clinical Ophthalmology	6. 最初と最後の頁 1499-1509
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Mori N, Yokogawa H, Kobayashi A, Nishino T, Sugiyama K.	4. 巻 13
2. 論文標題 Surgery-induced iris abnormalities after Descemet membrane endothelial keratoplasty and their impact on postoperative clinical outcomes	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Clinical Ophthalmology	6. 最初と最後の頁 805-809
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nishino T, Kobayashi A, Mori N, Masaki T, Yokogawa H, Fujiki K, Yanagawa A, Murakami A, Sugiyama K.	4. 巻 63
2. 論文標題 In vivo histology and p.L132V mutation in KRT12 gene in Japanese patients with Meesmann corneal dystrophy	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Japan Journal of Ophthalmology	6. 最初と最後の頁 46-55
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kobayashi A, Yokogawa H, Mori N, Masaki T, Sugiyama K	4. 巻 9
2. 論文標題 Development of a Donor Tissue Holding Technique for Descemet's Membrane Endothelial Keratoplasty Using a 25-Gauge Graft Manipulator	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Case Report Ophthalmology	6. 最初と最後の頁 431-438
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yokogawa H, Kobayashi A, Okuda T, Mori N, Masaki T, Sugiyama K.	4. 巻 1
2. 論文標題 Combined Keratoplasty, Pars Plana Vitrectomy, and Flanged Intrascleral Intraocular Lens Fixation to Restore Vision in Complex Eyes With Coexisting Anterior and Posterior Segment Problems	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Cornea	6. 最初と最後の頁 S78-S85
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nishino T, Kobayashi A, Yokogawa H, Mori N, Masaki T, Sugiyama K	4. 巻 12
2. 論文標題 A 10-year review of underlying diseases for endothelial keratoplasty (DSAEK/DMEK) in a tertiary referral hospital in Japan	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Clinical Ophthalmology	6. 最初と最後の頁 1359-1365
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nishino T, Kobayashi A, Mori N, Masaki T, Yokogawa H, Sugiyama K.	4. 巻 53
2. 論文標題 Clinical evaluation of a novel surgical technique (large cross incision) for conjunctival cysts	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Canadian Journal of Ophthalmology	6. 最初と最後の頁 e36-e39
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kobayashi A, Yokogawa H, Mori N, Masaki T, Sugiyama K	4. 巻 11
2. 論文標題 Association of fluorescein anterior corneal mosaic and corneal K-structures by in vivo laser confocal microscopy in patients with keratoconus	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Clinical Ophthalmology	6. 最初と最後の頁 1359-1363
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 Natsuko Mori, Akira Kobayashi, Tsubasa Nishino, Shigeto Fujimura, Hideaki Yokogawa, Kazuhisa Sugiyama
2. 発表標題 Two cases of severe corneal damage after administration of anti-TNF- preparation.
3. 学会等名 Asia cornea society (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 森奈津子、小林顕、横川英明、西野翼、藤村茂人、杉山和久
2. 発表標題 膿疱性乾癬へのアダリムマブ投与後に重症角膜パンヌスが生じた1例
3. 学会等名 角膜カンファランス 2021
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 森奈津子、小林顕、横川英明、西野翼、杉山和久
2. 発表標題 Fabry病患者に見られた渦状角膜の生体組織所見
3. 学会等名 角膜カンファランス 2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 森奈津子、小林顕、横川英明、西野翼、杉山和久
2. 発表標題 アルゴンレーザー虹彩切開術後水疱性角膜症に対するDSAEK術後の内皮細胞密度
3. 学会等名 角膜カンファランス 2017
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 森奈津子、小林顕、横川英明、杉山和久
2. 発表標題 アcantアメラバ角膜炎における治療前ステロイド点眼の影響
3. 学会等名 臨床眼科学会 2016
4. 発表年 2016年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------