

要旨

Acanthamoeba は土壌や淡水、海水に分布する自由生活性のアメーバであるが、近年アメーバ性肉芽腫性脳炎やアメーバ性角膜炎の発症例が散発し注目されている。このことから、生活環境下における児童公園内の砂場の砂、家屋室内塵、コンタクトレンズ及びその洗浄保存液の *Acanthamoeba* の棲息状況を調査した。*Acanthamoeba* の分離培養にはアメーバ用塩類溶液 KCM で作製した 1.5%NN 寒天平板培地に納豆菌を塗布したものをを用いた。その結果、砂 55 検体中 53 検体から *Acanthamoeba* spp. が検出され、3 グループに分類したところ、55 検体中 1type が 9 検体 (16%)、2type が 53 検体 (96%) が、3type が 8 検体 (15%) 検出された。また室内塵 10 検体中 10 検体すべてから *Acanthamoeba* spp. 検出され、グループ分類としては 1type が 1 検体 (10%)、2type が 8 検体 (80%)、3type が 4 検体 (40%) であった。しかし使い捨てコンタクトレンズ 9 検体や、その洗浄保存液 38 検体からは検出されなかつた。

序論

Acanthamoeba は土壌や淡水、海水に広く分布する自由生活性のアメーバとして知られていたが、1956年以降ヒトへの感染があいついで報告された。またこれまでに数例の *Acanthamoeba* sp. による、アメーバ性肉芽腫性脳炎が報告されている。また近年コンタクトレンズ装着者の増加に伴い、*Acanthamoeba* による難治性の角膜炎が増加し発生し注目されている (Fig.1)。ほとんどのアメーバ性角膜炎の80%以上がコンタクトレンズ装着者であり、その他は外傷後に発症するとの報告もある (1-7)。

そのようなことからヒトの生活環境下における、*Acanthamoeba* の棲息状況を調査することになった。

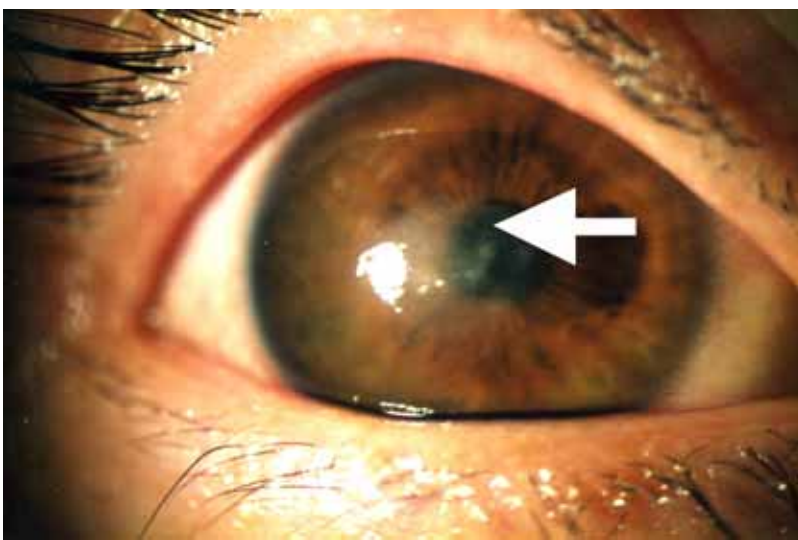


Fig.1

Keratitis cause *Acanthamoeba* sp.
corneal become clouded
inflammation

検査材料と方法

材料

1. 砂場の砂

2004年7月から8月にかけて、弘前市内児童公園内の砂場の中心部から、表面深さ約3cm下の砂を50mlの滅菌コニカルチューブで採取した。

1つの児童公園内の砂場からの砂の採取は、1サンプルとした (Fig.2)^{8,9)}。

2. 家屋室内塵

弘前市居住者10世帯の土足で汚染されない住居内塵を各自宅の電気掃除機で吸引した10サンプルを用いた。ビニール袋に移し密封した吸引後のゴミサンプルを、手で振り攪拌しビニール袋内のゴミを均一にした。その後サンプル塵は篩を通し、落下した細塵をサンプルとした¹⁰⁾。

3. コンタクトレンズ洗浄保存液およびコンタクトレンズ

東北地方に居住するコンタクトレンズ使用者を対象に、普段使用しているコンタクトレンズの洗浄・保存液を使用後、ケースに入ったまま回収した。また、使い捨てのソフトコンタクトレンズ使用者から、使い捨て期限の過ぎたレンズを普段使用しているレンズケアケースのまま回収しサンプルとした。回収した洗浄保存液は3000rpm, 10minで遠心し、沈渣100 μ lをサンプルとした¹¹⁻¹²⁾。



Fig.2 sampling sand from hirosaki city

方法

【アカントアメーバの分離用培地の作製】

60 μ m以下の *Acanthamoeba* sp. には、小型アメーバ類の培養の基本となる非冠水寒天平板培養 (1.5%NN寒天平板培地) を用いた。

培地はアメーバ用塩類溶液KCMで溶解した1.5%NN寒天 (Difco bacto-agar) を121 $^{\circ}$ C, 15minでオートクレーブにかけ滅菌したものを、直径90mmシャーレに厚さ2~3mmと薄めに作製した。使用時に培地表面に納豆菌浮遊液 (*Bacillus subtilis*) を塗布した¹³⁾。

また、アメーバ用塩類溶液KCMはKCl 0.7g, CaCl 0.8g, MgSO₄-7H₂O 0.8g を蒸留水に溶解し1000mlとし、使用時に100倍希釈して使用した (table 1)。寒天の厚さが必要以上に厚すぎると検鏡の際観察に不向きであることから厚さ2~3mmになるように調整した (Fig.3)。

納豆菌浮遊液の作製は、納豆菌 (*Bacillus subtilis*) を普通寒天平板培地で、37 $^{\circ}$ C 1~2日間培養した後、アメーバ用塩類溶液KCMで10⁶~10⁷/mlに調整し、500 μ lをマイクロピペットで培地に塗布し使用する。

table 1 KCM composition

KCl	0.7g
CaCl	0.8g
MgSO ₄ -7H ₂ O	0.8g
D.W.	1000ml

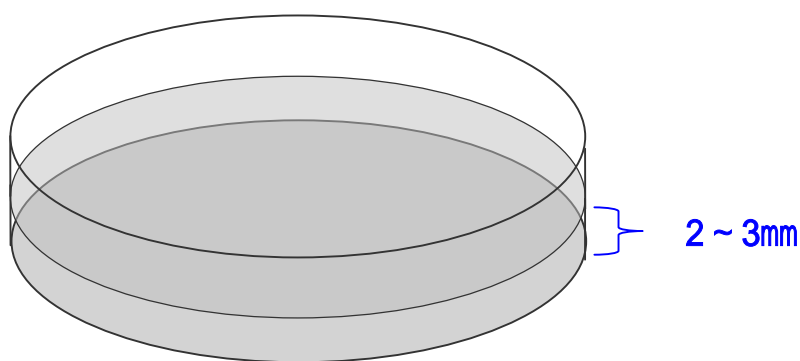


Fig.3
1.5%NN agar plate
(90mmシャーレ)

【培養の実際】

1. 採取した砂約50mg (米粒大の大きさ) を培地の4カ所に置き (Fig.4) 30 $^{\circ}$ Cの暗所で1週間以上培養した。
2. 採取し調整した室内塵 (細塵) 約100mg (米粒大の大きさ) を同様の培地の4カ所に置き、同様に培養した。
3. コンタクトレンズ洗浄保存液は遠心後の沈渣100 μ lを同様の培地上に塗布した。
また、使い捨てコンタクトレンズは直接培地上に置き、同様に培養した。培養の際、左右のコンタクトレンズは別の培地にて培養した。

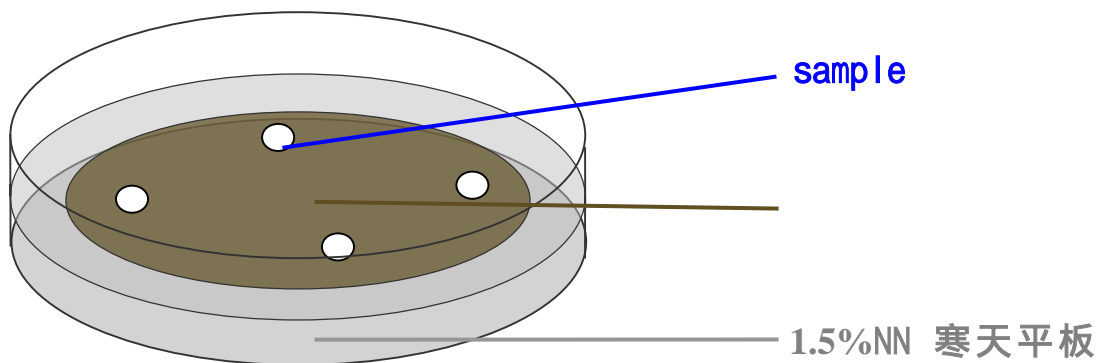


Fig.4
Isolation
culture
from sample

【検出アメーバ類の分類法】

培養後、実体顕微鏡を用いて培地上からアメーバの栄養体またはシストを観察した。*Acanthamoeba* sp.と推測されたアメーバ体を精査するため、滅菌パスツールピペットの先端をバーナーで焼き引き延ばし、毛細管を作製し、それを用いアメーバ用塩類溶液KCMを注加してアメーバを釣り上げ、スライドガラス上に展開し光学顕微鏡で観察した。

培養2～3日後には土壌アメーバの栄養体がサンプルの周辺へ這い出してくるのが観察できた。培養5～7日後には培地の中心部分からシストの形成が見られた。

検出されたシストは石井及び、Pussard等に準じて3グループに分類した¹³⁾ (Fig.5)(Table2)。また、検出された*Acanthamoeba* sp.のシスト・栄養体はギムザ染色、グラム染色、パパニコロー染色を施し観察した。

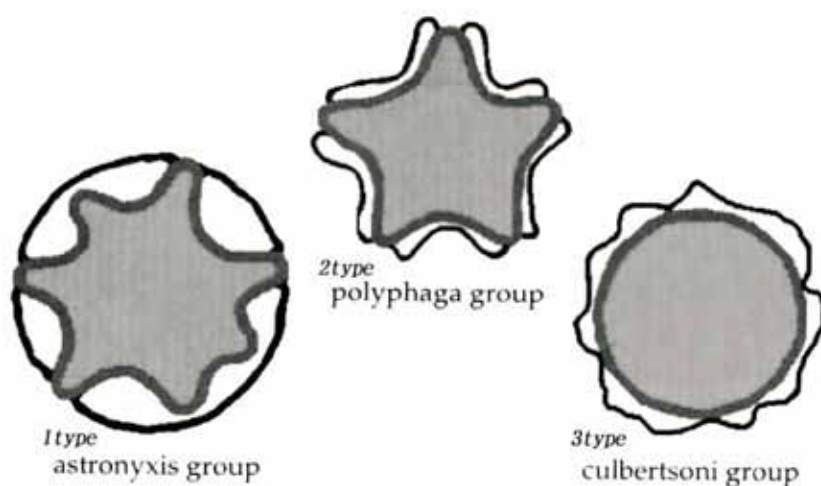


Fig.5
classification of
Acanthamoeba spp.cyst⁵⁾

Table2 classification of *Acanthamoeba* sp.

By Pussard and Pons(1977)	
Species	
1type	<i>A. astronyxis</i> <i>A. comandoni</i> <i>A. echinulata</i>
2type	<i>A. castellanii</i> <i>A. rhyodes</i> <i>A. paradvionensis</i> <i>A. mauritaniensis</i> <i>A. polyphage</i>
3type	<i>A. palestinensis</i> <i>A. culbertsoni</i> <i>A. lenticulata</i> <i>A. pustulosa</i> <i>A. royreba</i>

結果

児童公園内の砂場の砂55検体中53検体から *Acanthamoeba* spp. が検出された。

検出されたシストを石井およびPussard等に準じて3グループに分類したところ、砂場の砂55検体中9検体から1typeのシストが検出され、55検体中53検体から2typeのシストが、また55検体中8検体から3typeのシストが検出された (Table 3)。

室内塵の培養の結果10検体中10検体すべてから *Acanthamoeba* spp. が検出された。グループ分類としては、1typeが1検体の10%、2typeが8検体の80%、3typeが4検体の40%であった (Table 4)。

しかしながら使い捨てコンタクトレンズ9検体や、コンタクトレンズ洗浄保存液38検体のすべてにおいて *Acanthamoeba* spp. は検出されなかつた (Fig.6)。

Table 3 detection and classification of *Acanthamoeba* sp. from sand of children's playground in hirisaki city

	No. of institutions		Classification of <i>Acanthamoeba</i> spp.		
	Examined	Detected (%)	1type	2type	3type
sand	55	53(96%)	9(1%)	53(96%)	8(15%)

Table4 detection and classification of *Acanthamoeba* sp. from house dust of human habitation in hirosaki city

	No. of institutions		Classification of <i>Acanthamoeba</i> spp.		
	Examined	Detected (%)	1type	2type	3type
house dust	10	10(100%)	1(10%)	8(80%)	4(40%)

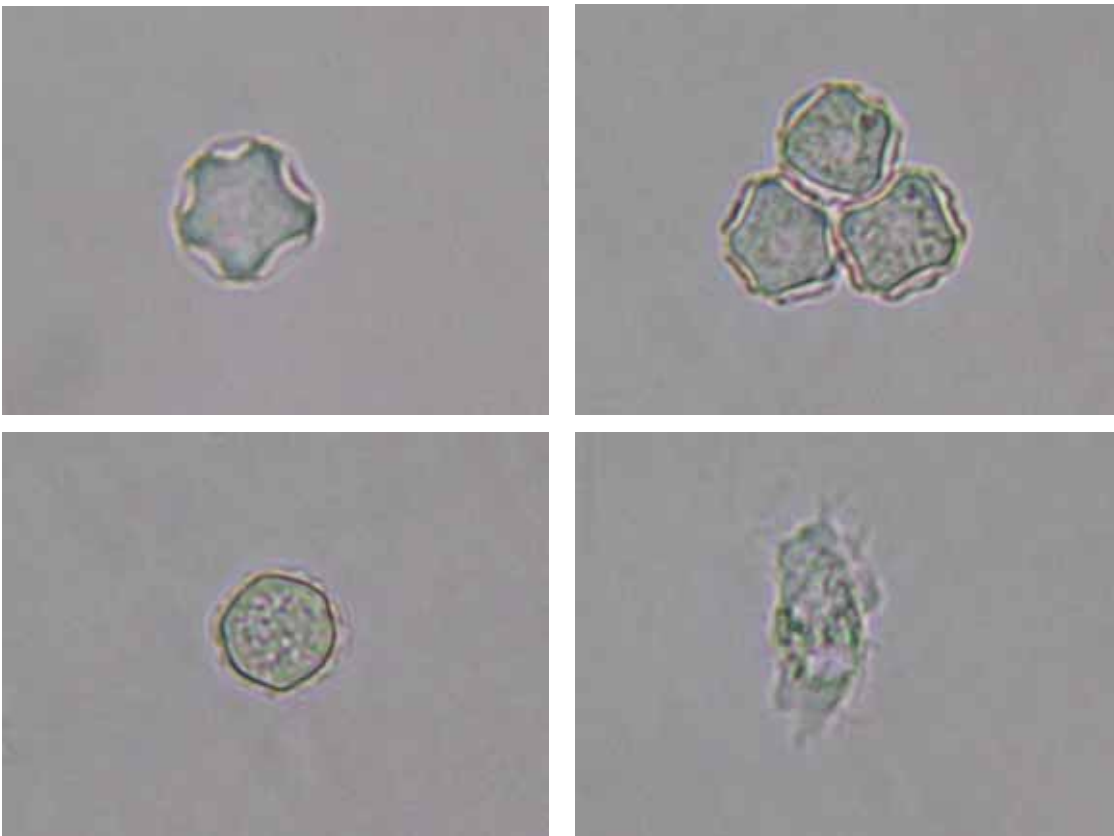


Fig.6 form of *Acanthamoeba* sp. cyst and trophozoite (× 400)

考察

今回の砂における *Acanthamoeba* spp. の調査では、*Acanthamoeba* spp. が96%と高率に検出された。検出されなかった砂場と、*Acanthamoeba* spp. が検出された砂場の立地環境の違いは、ほとんどなかった。砂場の周囲は全て、土壌であり、周りには草木が必ずといっていい程存在し、ヒトの生活する地域のなかでは公園の砂場は土壌アメーバの棲息しやすい環境と考えられる。

3分類では角膜炎の原因として最も多い2typeの *Acanthamoeba* sp. が高率(96%)に検出された。1typeや3typeは比較的少なかった。これは、砂場に棲息する細菌類などのアメーバの餌となる微生物類と関係があると思われる。実際、普通寒天平板培地の培養では3typeの *Acanthamoeba* はある種の細菌や真菌と共に発育してくる傾向があると推測された。

また、岩木川を挟んだ川西区域と川東区域との *Acanthamoeba* spp. の検出率の差は顕著でなかった。

また、室内塵においても高率(100%)に *Acanthamoeba* spp. が検出され、*Acanthamoeba* はヒトの生活環境下に高率かつ密接に分布することが明かとなった。今回の調査では数量的な検討は行わなかったが、室内細塵には多くの *Acanthamoeba* spp. が分布するようである。家屋内の *Acanthamoeba* は、高層ビルの最上階からも検出されるとの報告もあり、ヒトの衣類や皮膚などに付着することで人為的に家屋内へ運ばれたと推測される¹⁰⁾。また、空気中からも検出されるとの報告もあることから風などにより運搬されることも推測される。室内塵もまた、2typeの *Acanthamoeba* sp. が多く検出され、1typeは少数であった。

今回の調査では、コンタクトレンズ及びコンタクトレンズ洗浄保存液からは *Acanthamoeba* spp. は検出されなかったが、室内塵から高率に *Acanthamoeba* spp. が検出されることや、サンプルとなったコンタクトレンズ洗浄保存液に高率にアメーバの餌となるであろう細菌、真菌類の汚染が見られコンタクトレンズケース内でアメーバ類が増殖する可能性は十分に考えられることから、コンタクトレンズの取り扱いには十分な注意が必要である。

参考文献

- 1) 間宮和久 松本光生 中沢満:北東北でのアカントアメーバ角膜炎第1例(2001):眼科臨床医報:95,166-168
- 2) 今泉利雄 松野大生 小笠原孝祐:アカントアメーバ角膜炎の1例(2000):眼科臨床医報:94,1375
- 3) 石橋康久等:*Acanthamoeba keratitis*の1例(1980):日眼会誌:92,963-972
- 4) 石橋康久等:放射状角膜神経炎で診断された初期アカントアメーバ角膜炎の2例(1996):臨眼:50,1881-1885
- 5) 石橋康久:アカントアメーバ角膜炎の完成期と思われる像を呈した症例(1990):臨

眼:44.873-876

- 6) 塩田洋 矢野雅彦 鎌田泰夫 片山智子 三村康男:アカントアメーバ角膜炎の臨床経過の病期分類(1994):臨眼:48,1149-1154
- 7) 太刀川貴子等:アメーバ性角膜炎(1995):日眼会誌:99,68-75
- 8) 山浦常等: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(1993.6):寄生虫学雑誌:第42巻,第4号,361-364,
- 9) 山浦常等:砂場からのアカントアメーバの検出(1992):Clinical Parasitology:vol.3,31-33
- 10) 山浦常等:室内塵からのアカントアメーバの検出(1993):寄生虫学雑誌:42,130-133,
- 11) 山浦常:当院でのアカントアメーバ角膜炎の検索(1992):Clinical Parasitology:3,25-27
- 12) 田原和子 浅利誠志:アカントアメーバの検査法(1998):Medical Technology:vol.26,673-679
- 13) 石井圭一:アメーバ図鑑,金原出版,東京,1999