

## サブロー・ブドウ糖寒天培地を用いたアカントアメーバの分離培養

加藤 俊彦

屋島総合病院 眼科

塩田 洋, 三村 康男

徳島大学医学部眼科学教室 (主任: 三村康男 教授)

(平成8年1月25日受付)

*Isolation of Acanthamoeba with Sabouroud's glucose agar plate*

Toshihiko Kato

Department of Ophthalmology, Yashima General Hospital, Kagawa

Hiroshi Shiota and Yasuo Mimura

Department of Ophthalmology, School of Medicine, The University of Tokushima, Tokushima

(Director: Prof. Yasuo Mimura)

## SUMMARY

Isolation of *Acanthamoeba* or finding out the cysts from corneal lesions is necessary to confirm the diagnosis of *Acanthamoeba* keratitis. However, we cannot always find out the cyst from corneal scrapings of the lesions. In these cases the isolation of *Acanthamoeba* is very important to confirm the diagnosis.

Non-nutrient agar plates are generally used to isolate *Acanthamoeba*, but it is difficult to get them easily at many hospitals.

To find out another agar that can be used to isolate *Acanthamoeba* and got easily, Sabouroud's glucose agar plates were compared with non-nutrient agar plates for the isolation of *Acanthamoeba*.

Both agar plates seeded with *Escherichia coli* showed a nice growth of trophozoites first and cysts later. A clinical material, stock solution of contact lens used by a suspected patient of *Acanthamoeba* keratitis, was put on Sabouroud's glucose agar plate seeded with *Escherichia coli*. After three days of incubation at 25°C *Acanthamoeba* was found on the plate.

Sabouroud's glucose agar plate was a very useful agar plate for the isolation of *Acanthamoeba*.

(received January 25, 1996)

Key words: *Acanthamoeba*, non-nutrient agar plate, Sabouroud's glucose agar plate, trophozoite, cyst

アカントアメーバ角膜炎は難治性の角膜疾患であり、1974年以降欧米では多数の症例報告 (Nagington ら, 1974; Jones ら, 1975; Samples ら, 1984; Hirst ら, 1984; Moore ら, 1985; Wright ら, 1985; Wilhelmus ら, 1986; Cohen ら, 1987; Mathers ら, 1987; Lindquist ら, 1988) がなされている。我国では1988年以

降, 年とともにしだいに症例報告 (石橋ら, 1988; 塩田・水井, 1988; 伊藤ら, 1989; 加畑ら, 1992; 吉野ら, 1992; 中川ら, 1993; 藤井・稲田, 1993; 長浜ら, 1994; 塩田ら, 1994; 鎌田ら, 1995) が増加して来ている。

この角膜炎の治療に対する特効薬はまだ開発されていない。したがって視力予後をよくするためには, 現存するある程度有効な薬物を用いて初期に治療を開始することが不可欠となる。またできれば, 治療開始に先立ち確定診断を下したい。確定診断を下すためには, アカントアメーバの存在を証明する必要があるが, 角膜病巣部の擦過物標本を直接鏡検しても初期患者では検出できないことも多い (Mannis ら, 1986; 塩田ら, 1990)。このような場合, 分離培養が重要な手段となってくる。分離培養は病巣材料のみならず, 患者が使用しているコンタクトレンズやその保存液も調べることができるので, アカントアメーバ角膜炎が疑われる症例では有用な検査法である。

一般的にアカントアメーバの分離培養には, アメーバ用 non-nutrient (NN) 寒天培地を用いる (石井・石橋, 1989) が, この培地はいつでもどこでも容易に手に入るものではない。そこでもっと簡単に, しかも手近にあるもので代用できないかという発想のもとに, サブロー・ブドウ糖寒天培地によるアカントアメーバ分離培養の可能性を検討した。

**実験材料および方法**

**1. 基礎実験**

**(1) 分離培地の作製**

NaCl 12 g, KCl 0.35 g, CaCl<sub>2</sub> 0.3 g, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.4 g, 100 mM Tris-HCl buffer を 500 ml 加え pH 6.8 に調整し, 蒸留水を加えて 1000 ml にしたものをオートクレイブにかけ, 冷めたところで冷蔵庫 (+4℃) に保存した。使用時これを蒸留水で 100 倍に希釈して, アメーバ・生食とした。

Bacto agar (DIFCO LABORATORIES) 1.5 g に, アメーバ・生食 100 ml を加え, オートクレイブにかけて滅菌した後, 直径 10 cm 厚さ 1.5 cm のシャーレ (ファルコン社, No. 1001) に各 20 ml 流し込み固め, 一般にアカントアメーバの分離培養に用いられるアメーバ用 NN 寒天培地を作製した。次に真菌分離用サブロー・ブドウ糖寒天培地 (栄研化学) を用いて, 同様に培地を作製した。次にアカントアメーバの餌となる大腸菌 (W3110 株, 徳島大学医学部細菌学講座 大西克成教授から分与) をペプトン・イーストエクストラクト

液体培地 {Bacto pepton (DIFCO LABORATORIES) 8.0 g, Yeast extract (DIFCO LABORATORIES) 5.0 g, NaCl 5.0 g, 蒸留水 1000 ml} で 3~4 時間増殖させたものを,  $2.68 \times 10^3 \times g$  で 5 分間遠心分離にかけた後, 上澄を捨てアメーバ生食を 5 ml 加えてピペッティングして再び遠心分離にかけて洗浄した。これを 2 回行った。

血球計算板を用いて本実験に用いる大腸菌の濃度を, 1 ml あたり  $10^6$  個に調整した。このようにして作製した菌液を, 先端を丸くした滅菌濾紙 (東洋濾紙 No. 6, 1 cm × 2 cm) に浸して, 鑷子で予め作製したアメーバ

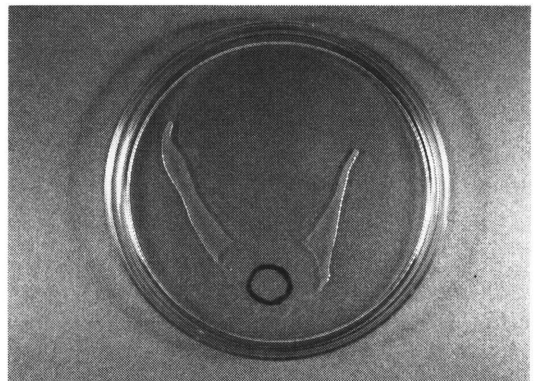


図1 アカントアメーバ接種後5日目のサブロー・ブドウ糖寒天培地。アメーバを接種した場所 (マジックで裏側から黒い円として印をつけている) を中心に, 透明に大腸菌が消失した所が見られる。これはアカントアメーバが大腸菌を食食して生じたもので, 時間の経過とともに左右周辺部に広がっていった。

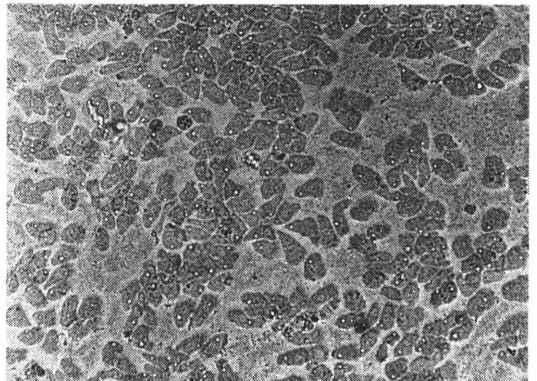


図2 アカントアメーバ接種後5日目の, 最初に接種した部位。多数のトロホゾイトが見られ, シストはまだ認められない (×120)。

用 NN 寒天培地とサブロー・ブドウ糖寒天培地にU字型に塗布し, 37°Cの恒温室に1時間入れて大腸菌を培養した後, これをアカントアメーバの分離増殖用培地とした。

## (2) アカントアメーバの接種

アカントアメーバ角膜炎患者から分離した *Acanthamoeba castellanii* 野田株をアメーバ生食に浮遊し, 血球計算板で1 mlあたりシスト(嚢子)が200個になるように調整して, その0.05 mlつまりアメーバシスト10個を, U字型に大腸菌を塗布したその中央部に接種した。それを25°Cの暗室に保ち, 14日間にわたり顕微鏡下で毎日観察した。

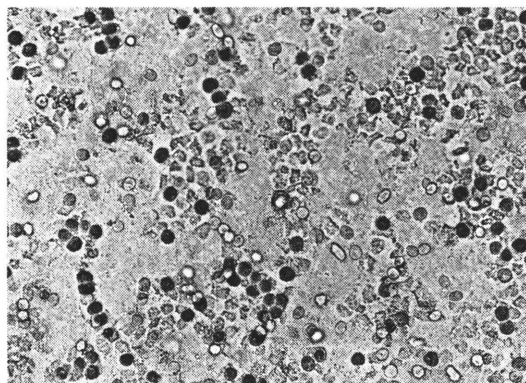


図3 アカントアメーバ接種後8日目のサブロー・ブドウ糖寒天培地。7日目より大腸菌を食べ尽くし, 最初の接種部位ではアカントアメーバのシスト化が観察され始め, トロホゾイトとシストの混在が見られる(×120)。

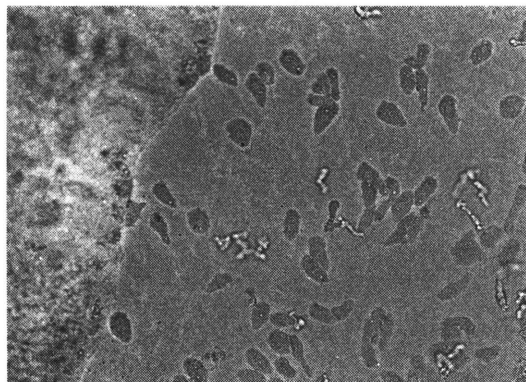


図4 図3(8日目)よりさらに中央部外側の, 大腸菌との境界部位。大腸菌コロニー(図では左)の中へ侵入しているアカントアメーバのトロホゾイトが見える。この部位では, まだシストは出現していない(×120)。

## 2. 臨床応用実験

某病院で, ソフトコンタクトレンズを使用している23歳の男性患者にアカントアメーバ角膜炎に特徴的な輪状の浸潤病巣が認められ, さらに臨床所見に比べて非常に強い痛みを訴えていたことからアカントアメーバ角膜炎が疑われた。角膜病巣部の擦過物標本を鏡検したがアカントアメーバは検出できなかった。確定診断補助のため, この患者が使用していたコンタクトレンズ保存液が我々に送られてきた。そしてこの保存液にアカントアメーバがいるかどうかの判定を依頼された。そこで基礎実験で述べたごとく, 大腸菌をU字型に塗布したサブロー・ブドウ糖寒天培地を準備した。

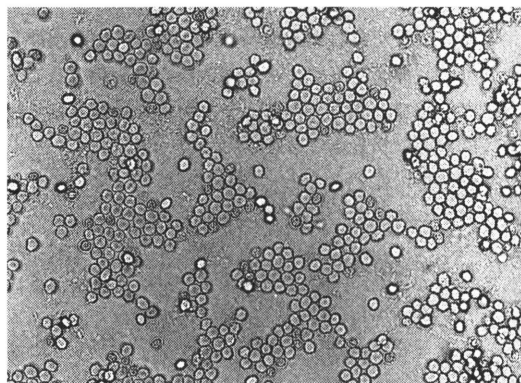


図5 アカントアメーバ接種後14日目の, 最初の接種部位。すべてシストに変化している(×120)。

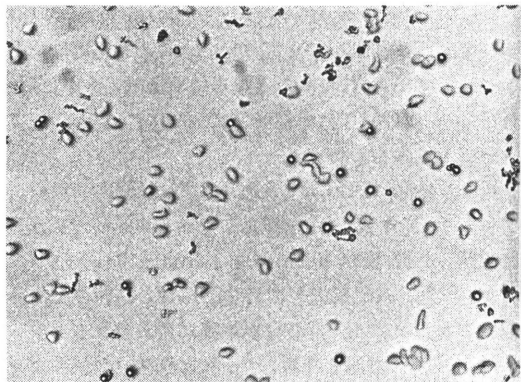


図6 アカントアメーバ角膜炎と診断された患者が使用していたコンタクトレンズ保存液からサブロー・ブドウ糖寒天培地を用いて分離されたアカントアメーバ。多数のトロホゾイトが見られる(×70)。

表1 アメーバ用 NN 寒天培地とサブロー・ブドウ糖寒天培地における、経時的アカントアメーバの分離培養結果の比較

接種後 日数	アメーバ用 NN 寒天培地*	サブロー・ブドウ糖 寒天培地*
2日目	T(+)	(-)
3日目	T(+)	T(+)
4日目	T(2+) C(+)	T(3+)
5日目	T(+)	T(4+)
7日目	T(+)	T(3+) C(3+)
14日目	T(-)	T(-~+) C(4+)

T: Trophozoite C: Cyst

- : アカントアメーバが、培地に見られないもの

+ : 1mm<sup>2</sup> 当たりアカントアメーバの個体数が99まで

2+ : 1mm<sup>2</sup> 当たりアカントアメーバの個体数が100から399

3+ : 1mm<sup>2</sup> 当たりアカントアメーバの個体数が400から1599

4+ : 1mm<sup>2</sup> 当たりアカントアメーバの個体数が1600以上

\* 大腸菌がU字型に塗布されている

次にコンタクトレンズ保存液の入った容器をよく振った後に、パスツールピペット（井内盛栄堂, No. 55-4033-02）で保存液を吸い上げ、一滴をサブロー・ブドウ糖寒天培地上のU字型の中央部に滴下し、25℃に保って観察した。

結 果

1. 基礎実験

アメーバ用 NN 寒天培地は、アカントアメーバ接種後2日目からアメーバのトロホゾイト（栄養型）が見られ、4日目からはシストに変化し始め、8日目にはほとんどトロホゾイトは見られなくなった。しかし大腸菌を塗布したサブロー・ブドウ糖寒天培地では、アカントアメーバ接種後2日目までは大腸菌の盛んな増殖が見られるものの、アメーバトロホゾイトは、まだ見られなかった。しかし3日目からはトロホゾイトの増殖が観察された。5日目にはアメーバの非常に激しい増殖が観察された（図1）（図2）。7日目にはアカントアメーバを接種した中央部から次第にシストに変化し始めた。この傾向は8日目にはさらに顕著になり、中央部ではトロホゾイトよりもシストのほうが多くなった（図3）（図4）。アカントアメーバは14日目には

培地に塗布された大腸菌を食べ尽くし、すべてシストに変化していた（図5）。これらの結果をまとめたものが表1である。

2. 臨床応用

3日目にアカントアメーバのトロホゾイトが多数出現した（図6）。5日目には二重壁を有するシストも観察された。この結果、本患者が使用していたコンタクトレンズ保存液はアカントアメーバに汚染されていることが判明した。これにより本患者は、臨床所見のみでなく、今回の臨床応用実験の結果を加味してアカントアメーバ角膜炎と診断を下すことができ、早期に治療が行われ患者の視力低下を招かず角膜炎を癒すことができた。

考 察

アカントアメーバは自由生活アメーバの1属で、湿った土壌中や水中など至る所で普通に見られる原生動物である。Culbertsonら（1958）により猿などを使った動物実験から、これらの中に病原性を有するものがあることが初めて証明され、医学的に注目されるようになった。原発性アメーバ髄膜脳炎（Primary amoebic meningoencephalitis）は、いままでにかなり多数症例が報告され一般に知られるところとなった（Fowler, Carter, 1965; Butt, 1966）。ついで Nagingtonら（1974）により、アメーバに起因する最初の眼感染症が報告され、それ以降世界各地から続々と症例報告がされるようになった。

このアカントアメーバによる眼科領域の感染症は角膜炎が主であり、ソフトコンタクトレンズ装用者に多数発症している（Jones, 1986）。

アメーバは一般増殖時にトロホゾイトの形態をとるが、生活環境が変化しトロホゾイトとして生活に適さなくなった場合、運動と捕食をやめて外表に外壁と内壁からなる二重の強靱な被膜を作りシストとなる。このシストは環境変化に対して抵抗力が非常に強いので、薬物療法に抵抗性で再発をくりかえし、治療を困難にするので難治症例となることが多い。さらに初期の角膜病変は、角膜ヘルペス等とよく似た角膜上皮病巣を示す症例が多く、重症化してから診断されることも多い。したがって早期に診断を確定する必要がある。確定診断を下すためには、アカントアメーバの存在を証明する必要がある。そのひとつの方法としてアカントアメーバの新しい分離培養法を考えた。

現在アメーバの分離培養には、アメーバ用 NN 寒天培地が用いられるが、この寒天培地は市販されておら

ず、アメーバの研究を行っている施設で必要に応じて作製しており、一般の病院では手に入らない。そこでどの病院にも置いてある何か別の培地でアcantアメーバが分離培養できないものかと考え、一般細菌に対し栄養の少ない真菌分離用のサブロー・ブドウ糖寒天培地に気付き、これでアcantアメーバが分離培養できないものかと思いつき今回の実験を行った。

アメーバの分離培養に通常使用される NN 寒天培地と、通常は真菌の分離培養に用いられるサブロー・ブドウ糖寒天培地とを用いて、両培地のアcantアメーバに対する分離培養を比較してみた。その結果をまとめたものが表1である。培地に塗布する大腸菌濃度を予備実験では  $10^3$ /ml,  $10^6$ /ml,  $10^9$ /ml と変えて実施したところ、サブロー・ブドウ糖寒天培地では  $10^3$ /ml 塗布したものは大腸菌量が少ないためアメーバの増殖が悪く、 $10^9$ /ml 塗布したものでは大腸菌が非常に盛んに増殖して培地上を流れ出すこともあり、今回の実験では大腸菌濃度を  $10^6$ /ml に調整して行った。

アメーバ用 NN 寒天培地では、アメーバ接種後2日目からトロホゾイトが観察され、4日目からシストが出現したが、サブロー・ブドウ糖寒天培地ではトロホゾイトが3日目から見え始め、5日目には非常に激しい増殖が観察された。7日目になってシストが出現した。これは各培地の大腸菌量の差によるものと思われる。つまりアメーバ用 NN 寒天培地では大腸菌は増殖できないが、サブロー・ブドウ糖寒天培地では塗布された大腸菌が増殖できる。したがってサブロー・ブドウ糖寒天培地ではアメーバにとって餌となる大腸菌が多いため、トロホゾイトの生存環境に適したトロホゾイトの形態をとる期間がアメーバ用 NN 寒天培地に比べて長くなったと考えられる。さらにサブロー・ブドウ糖寒天培地では2日目まで増殖した大腸菌が多く、アメーバの観察が困難であったことも原因と考えられる。つまり大腸菌の量が多すぎると菌が繁殖し過ぎて流れ出すこともあり、それによりアメーバの観察が行い難くなるためである。培地に含まれる水分が多いと塗布した大腸菌の増殖が盛んになり、逆に少ないと菌の増殖が少なくなるが、経験的には塗布する大腸菌の量は  $10^6$ /ml ぐらいが適当と思われた。

今回の基礎実験において、サブロー・ブドウ糖寒天培地を用いても、アcantアメーバの分離培養が可能であることが示された。しかも臨床材料を用いて、アcantアメーバの分離が可能であるかどうか調べる機会があり、サブロー・ブドウ糖寒天培地に大腸菌を塗

布して調べれば、臨床材料からでも分離が可能であることを実際に示すことができた。これらのことは、アcantアメーバの早期診断に役立つものと考えられる。

## 結 語

アメーバ用 NN 寒天培地とサブロー・ブドウ糖寒天培地を用いてアcantアメーバの分離培養を比較した結果、サブロー・ブドウ糖寒天培地を用いてもアcantアメーバの分離培養が可能であることが示された。サブロー・ブドウ糖寒天培地に大腸菌を塗布して調べれば、臨床材料からもアcantアメーバが実際に分離でき、この方法はアcantアメーバ角膜炎の診断方法の一つとして臨床応用できることが判明した。

## 文 献

- 1 Butt, C. G. (1966): Primary amebic meningoencephalitis. N. Eng. J. Med., 274, 1473-1476
- 2 Cohen, E. J., Parlato, C. J., Arentsen, J. J., Genvert, G. I., Eagle, R. C. Jr., Wieland, M. R. and Laibson, P. R. (1987): Medical and surgical treatment of *Acanthamoeba* keratitis. Am. J. Ophthalmol., 103, 615-625
- 3 Culbertson, C. G., Smith J. W. and Minner, J. R. (1958): *Acanthamoeba*: Observations on animal pathogenicity. Science, 127, 1506
- 4 Fowler, M. and Carter, R. F. (1965): Acute pyogenic meningitis probably due to *Acanthamoeba* sp.: a preliminary report. Br. Med. J., 2, 740-742
- 5 藤井智仁・稲田晃一郎 (1993): フルコナゾール・ミコナゾールで治療したアcantアメーバ角膜炎の1例. 眼紀, 44, 1434-1438
- 6 Hirst, L. W., Green, W. R., Merz, W., Kaufman, C., Visvesvara, G. S., Jensen, A. and Howard, M. (1984): Management of *Acanthamoeba* keratitis. A case report and review of the literature. Ophthalmology, 91, 1105-1111
- 7 石橋康久・松本雄二郎・渡辺亮子・本村幸子・安羅岡一郎・石井圭一・小山 力・遠藤卓郎・八十田健司 (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
- 8 石井圭一・石橋康久 (1989): 両性アcantアメーバによる角膜炎. 原性動物学雑誌, 22, 4-9

- 9 伊藤陽一・月川一恵・佐藤憲夫・神田尚孝・八子恵子・紺野謙治・五十嵐誠治 (1989): 重症化した *Acanthamoeba* 角膜炎の 1 例. あたらしい眼科, 6, 1362-1366
- 10 Jones, D. B. (1986): *Acanthamoeba*—The ultimate opportunist? *Am. J. Ophthalmol.*, 102, 527-530
- 11 Jones, D. B., Visvesvara, G. S. and Robinson, N. M. (1975): *Acanthamoeba polyphaga* keratitis and *Acanthamoeba* uveitis associated with fatal meningoencephalitis. *Trans. Ophthalmol. Soc. UK.*, 95, 221-232
- 12 加畑隆通・石橋康久・本村幸子・松本雄二郎・石井圭一 (1992): コンタクトレンズ非装用者にみられたアカントアメーバ角膜炎の 1 症例. *臨眼*, 46, 93-97
- 13 鎌田泰夫・塩田 洋・片山智子・矢野雅彦・三村康男・盛 重知 (1995): Polyhexamethylene biguanide (PHMB) 点眼液で治癒した両眼性のアカントアメーバ角膜炎の 1 例. *眼科*, 37, 1449-1453
- 14 Lindquist, T. D., Sher, N. A. and Doughman, D. J. (1988): Clinical signs and medical therapy of early *Acanthamoeba* keratitis. *Arch. Ophthalmol.*, 106, 73-77
- 15 Mannis, M. J., Tamaru, R., Roth, A. M., Burns, M. and Thirkill, C. (1986): *Acanthamoeba* sclerokeratitis. *Arch. Ophthalmol.*, 104, 1313-1317
- 16 Mathers, W., Stevens, G. Jr., Rodrigues, M., Chan, C. C., Gold, J., Visvesvara, G. S., Lemp, M. A. and Zimmerman, L. E. (1987): Immunopathology and electron microscopy of *Acanthamoeba* keratitis. *Am. J. Ophthalmol.*, 103, 626-635
- 17 Moore, M. B., McCulley, J. P., Luckenbach, M., Gelender, H., Newton, C., McDonald, M. B. and Visvesvara, G. S. (1985): *Acanthamoeba* keratitis associated with soft contact lenses. *Am. J. Ophthalmol.*, 100, 396-403
- 18 長浜宗信・松村 哲・早川和久・山川良治・長瀬重智 (1994): ミコナゾール点眼, フルコナゾール内服, 角膜掻爬で治癒したアカントアメーバ角膜炎. あたらしい眼科, 11, 399-402
- 19 Nagington, J., Watson, P. G., Playfair, T. J., McGill, J., Jones, B. R. and Steele, A. D. (1974): Amoebic infection of the eye. *Lancet*, 2, 1537-1540
- 20 中川 尚・風見宣生・伊在井久美子・岩崎美紀・内田幸男・山浦 常・白坂龍曠・堀上英紀・石井圭一 (1993): 初期アカントアメーバ角膜炎の 2 例. *日眼会誌*, 97, 544-550
- 21 Samples, J. R., Binder, P. S., Luibel, F. J., Font, R. L., Visvesvara, G. S. and Peter, C. R. (1984): *Acanthamoeba* keratitis possibly acquired from a hot tub. *Arch. Ophthalmol.*, 102, 707-710
- 22 塩田 洋・水井研治 (1988): 眼科領域の日和見感染症. あたらしい眼科, 5, 1697-1703
- 23 塩田 洋・内藤 毅・小西裕美子・谷 英紀・大谷知子・三村康男・伊藤義博・下村嘉一 (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*, 44, 302-303
- 24 塩田 洋・矢野雅彦・鎌田泰夫・片山智子・三村康男 (1994): アカントアメーバ角膜炎の臨床経過の病期分類. *臨眼*, 48, 1149-1154
- 25 Wilhelmus, K. R., Osato, M. S., Font, R. L., Robinson, N. M. and Jones, D. B. (1986): Rapid diagnosis of *Acanthamoeba* keratitis using calcofluor white. *Arch. Ophthalmol.*, 104, 1309-1312
- 26 Wright, P., Warhurst, D. and Jones, B. R. (1985): *Acanthamoeba* keratitis successfully treated medically. *Br. J. Ophthalmol.*, 69, 778-782
- 27 吉野圭子・高村悦子・高野博子・荒木博子・中川尚・山浦 常・白坂龍曠 (1992): 偽樹枝状角膜炎で発症したアカントアメーバ角膜炎の 1 例. *眼臨*, 86, 1022-1025