

平成 24 年 3 月

池田欣史 学位論文審査要旨

主 査 清 水 英 治
副主査 福 本 宗 嗣
同 井 上 幸 次

主論文

Assessment of real-time polymerase chain reaction detection of *Acanthamoeba* and prognosis determinants of *Acanthamoeba* keratitis

(Real-time polymerase chain reactionによるアカントアメーバの検出とアカントアメーバ角膜炎の予後決定因子の評価)

(著者：池田欣史、宮崎大、矢倉慶子、川口亜佐子、石倉涼子、井上幸次、水戸毅、

白石敦、大橋裕一、檜垣史郎、板橋幹城、福田昌彦、下村嘉一、八木田健司)

平成24年 Ophthalmology 掲載予定

学 位 論 文 要 旨

Assessment of real-time polymerase chain reaction detection of *Acanthamoeba* and prognosis determinants of *Acanthamoeba* keratitis

(Real-time polymerase chain reactionによるアcantアメーバの検出とアcantアメーバ角膜炎の予後決定因子の評価)

アcantアメーバ角膜炎は多彩な臨床像を呈し、特効薬がないなど、診断・治療が難しく、視力予後不良な疾患である。そのため早期診断・治療の重要性が言われている。しかし、従来アcantアメーバの診断方法は正確性に乏しく、現在最も効果的な診断方法である角膜擦過物のCalcofluorやFungiflora Y[®]染色でも、擦過場所や染色により偽陰性を生じることもあり、未だに十分ではない。また培養や検鏡では治療経過に伴うアcantアメーバ数の減少を判定して、治療効果を判定することは困難である。そのため、アcantアメーバの鋭敏な定量分析方法が望まれていた。

一方、アcantアメーバは細菌を貪食して増殖するため、アcantアメーバ角膜炎の成立過程で細菌が関与してくる可能性が考えられる。しかし、アcantアメーバ角膜炎において病巣部における細菌の関与について検討した報告はない。

そこで本研究では、アcantアメーバの定量分析方法としてreal-time PCR法を構築し、その感度・特異性を検討するとともに、アcantアメーバ角膜炎におけるアcantアメーバと細菌のDNAコピー数の相関関係を検索し、合わせて予後不良となる因子を統計学的に検討した。

方 法

2006年1月より2010年12月までに鳥取大学、近畿大学、愛媛大学にて診断されたアcantアメーバ角膜炎および細菌性角膜炎を含む感染性角膜炎103例104眼を対象とした。アcantアメーバ角膜炎は臨床所見、Fungiflora Y[®]染色による検鏡、培養、PCRにより診断した。

Real-time PCRはアcantアメーバでは18S rDNA領域を特異的に認識するプライマーとTaqMan probeを用い、細菌ではuniversal probeと16S rDNAのプライマーを用いて構築し、アcantアメーバ角膜炎の予後不良となる危険因子の検索をロジスティック解析により評価した。

結 果

103例（男性49例、女性54例、平均年齢 48.2 ± 2.2 歳）のうちアcantアメーバ角膜炎は28例29眼（男性11例、女性17例、平均年齢 26.4 ± 1.7 歳）で、27例（96.4%）はコンタクトレンズ装用者であった。Real-time PCRによるDNAコピー数は検鏡によるアメーバ栄養体数より300倍、シスト数より50倍感度がよく、アcantアメーバDNA（平均 4.7×10^5 コピー）は29眼中25眼（86.2%）に認められた。一方、Fungiflora Y[®]染色ではシストが26眼中20眼（76.9%）、培養は22眼中12眼（54.5%）で陽性であった。細菌性角膜炎（75例）ではアcantアメーバDNAは認められなかった。また、細菌DNAは細菌性角膜炎75例中55例で検出された（平均細菌DNA数は 8.8×10^4 コピー）が、アcantアメーバ角膜炎では28眼中15眼（53.6%）で検出され、平均 5.8×10^2 コピーと細菌性角膜炎の1/100以下であった。

初診時のアメーバコピー数はアcantアメーバ角膜炎の病期（重症度）と有意な相関があり、さらには初診時視力とも有意に相関してした。しかし、細菌コピー数にはこれらとの相関は認められなかった。またアメーバコピー数とステロイドの使用やコンタクトレンズ装用とは相関はなかった。視力予後良好なアcantアメーバ角膜炎では治療開始1ヶ月後にコピー数が90%以上減少する割合が100%であったが、視力予後不良な場合は28.6%であった。視力予後不良と初診時の病期およびアメーバコピー数に有意な関連が見られた。また、治療に伴いコピー数が減少しない（1ヶ月で90%以下の減少）ことと初診時の病期が有意に関連していた。なお細菌コピー数はこれらと有意に関連する因子ではなかった。

考 察

Real-time PCRは感度が高く、アcantアメーバを定量的かつ比較的迅速に測定できるため、アcantアメーバ角膜炎の診断および治療効果判定に有用である。アcantアメーバのコピー数は病期の進行と関連があり、初診時のアcantアメーバ角膜炎の病期（重症度）とコピー数が予後不良決定因子となるため、早期に診断し、治療を開始することの重要性が明確となった。しかし、サンプル量や採取箇所により検鏡陽性でも、real-time PCRは陰性となる場合が時に認められた。また個々の症例では臨床所見は重症であっても、コピー数が少ない症例や治療に伴いコピー数が減少する場合があり、このような症例ではアメーバの量ではなく、強い免疫反応が臨床所見を悪化させていると考えられた。

結 論

Real-time PCRは感度・特異度が高く、臨床的に有用である。アcantアメーバ角膜炎の初診時のアcantアメーバコピー数と角膜炎の重症度は視力予後不良決定因子である。