

アカントアメーバの電子顕微鏡による形態学的観察 第2報 抗アメーバ剤による培養アカントアメーバの形態変化

矢野 雅彦, 塩田 洋, 加藤 俊彦, 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23日受付)

Electron microscopic studies of Acanthamoeba *2 Morphological changes of cultured Acanthamoeba due to anti-* *amoebic agents*

Masahiko Yano, Hiroshi Shiota, Toshihiko Kato, and Yasuo Mimura

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

(Director: Prof. Yasuo Mimura)

SUMMARY

Morphological changes of *Acanthamoeba* in Peptone-Yeast-Glucose medium containing anti-amoebic agents were studied with transmission electron microscope.

In fradiomycin-treated amoeba, decrease of acanthopodia, vacuolar formation in the ectoplasm and cell collapse were observed. In polyhexamethylene biguanide (PHMB)-treated amoeba, rupture of plasma membrane and degeneration of mitochondria were observed at the early stage. These results indicate that PHMB is more effective than fradiomycin for the treatment of *Acanthamoeba* keratitis.

(received January 23, 1996)

Key words: *Acanthamoeba*, electron microscope, fradiomycin,
polyhexamethylene biguanide (PHMB)

アカントアメーバ角膜炎は、原生動物であるアカントアメーバ属によって発症する角膜感染症であり Nagington ら (1974), Jones ら (1975) によって初めて報告された。わが国においては、石橋ら (1988) が初めて報告し、我々も本症の6例を経験し報告した (塩田ら, 1988, 1990, 1991, 1994; 鎌田ら, 1995)。

本疾患の治療には、薬物療法と手術療法とがあるが、まず第一に薬物療法を充分に行なうことが重要で、現在までにフラジオマイシン、フルコナゾール等の種々の薬剤が有効であったと報告されている (Wright ら, 1985; 石橋ら, 1988; 塩田ら, 1991)。しかし特効薬的な薬剤は無く、失明に至る症例も多かった。近年、コンタクトレンズの洗浄やプールの消毒に使用される、

polyhexamethylene biguanide (以下 PHMB と略す) が、アカントアメーバ角膜炎の治療に有効であることが報告された (Larkin ら, 1992; Varga ら, 1993)。これらの薬剤によるアカントアメーバの形態変化を電子顕微鏡 (以下電顕と略す) 的に検討することを目的として、我々は、先に *in vitro* における培養アカントアメーバの形態を観察し報告した (矢野ら, 1995)。今回、フラジオマイシンおよび PHMB 添加による培養アカントアメーバの形態変化を検討した。

実験材料及び方法

プラスチック製組織培養用フラスコ (岩城硝子社製, 75 ml 用) を用いて、アカントアメーバ角膜炎の患者角

膜から分離した *Acanthamoeba castellanii* を, 37°C の Peptone-Yeast-Glucose (以下PYG と略す) 液体培地で培養した。培養後, 栄養体は分裂を繰り返して7~10日間で約 $10^6/\text{mm}^3$ の濃度になる。約2週間で増殖は停止し, 栄養体は次第に嚢子に変化する。前報(矢野ら, 1995)では, この培養開始から2週間目の栄養体を検体とした。臨床的にフラジオマイシンは, 0.5~1%, PHMB は, 0.02%で, アカントアメーバに有効とされている(塩田ら, 1988; Larkinら, 1992; Jonesら, 1993; Vargaら, 1993)。今回, この培養2週間目の栄

養体にフラジオマイシンを0.05%, 0.1%, 0.3%になるように, また, PHMBを0.002%, 0.006%, 0.02%になるように加え, +25°Cに保ちながら1日, 3日, 7日, 21日目に透過型電顕で観察した。ただし, 0.02% PHMBのみはアメーバの変性が早く起こるため, 培養8時間後にも観察を行なった。なお参考のため, 光学顕微鏡(以下光顕と略す)にても平行してこれら薬剤添加後のアカントアメーバを観察した。

アカントアメーバは, 前報と同様にPYG培地から低速の遠沈(120 G, 10分間)で集め, pH 7.4の磷酸

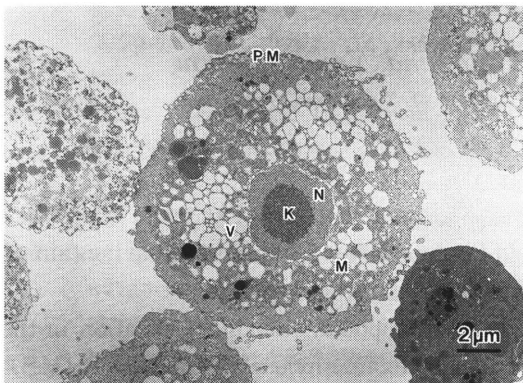


Fig. 1 Trophozoites 7 days after exposure to 0.3% fradiomycin. A number of small vacuoles(V) appeared around the nucleus (N). K: karyosome, M: mitochondria, PM: plasma membrane

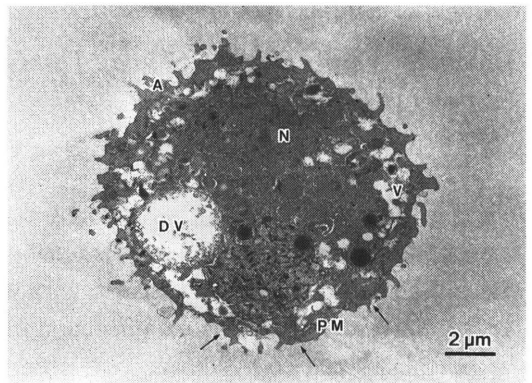


Fig. 3 Trophozoite 3 days after exposure to 0.002% PHMB. A number of small vacuoles(V) appeared beneath the plasma membrane(PM). The plasma membrane was disrupted at some places (arrows). A: acanthopod, DV: digestive vacuole, N: nucleus

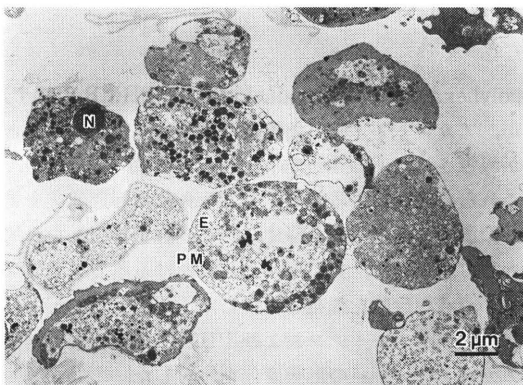


Fig. 2 Trophozoites 21 days after exposure to 0.3% fradiomycin. Trophozoites became smaller. However, the plasma membrane (PM) was maintained. E: ectoplasm, N: nucleus

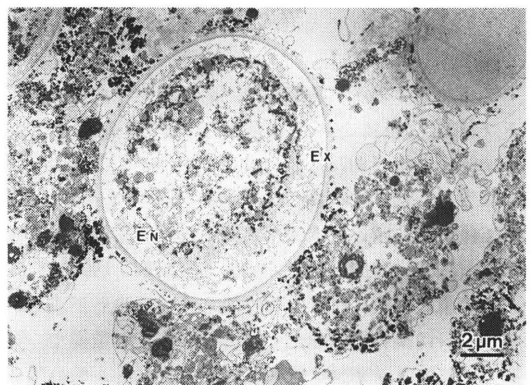


Fig. 4 Cyst 1 day after exposure to 0.006% PHMB Exocyst(Ex) and endocyst(En) were thin and intracellular structures were degenerated.

緩衝食塩水 (phosphate buffered saline) で2回洗浄遠沈した後、BSA (bovine serum albumin) で懸濁、遠沈した。次に、この沈渣に2.5%グルタルアルデヒドを加え、ヘマトクリット遠沈器 (10,000 G, 5分間) で pellet とした。この pellet を1%オスミウム酸で後固定、エタノールの系列を用いて脱水し、アセトン・エポック 812 を用いて包埋した。薄切された切片は、酢酸ウラン、クエン酸鉛で染色し、日本電子 JEM-1200EX 型透過型電子顕微鏡を用いて観察した。

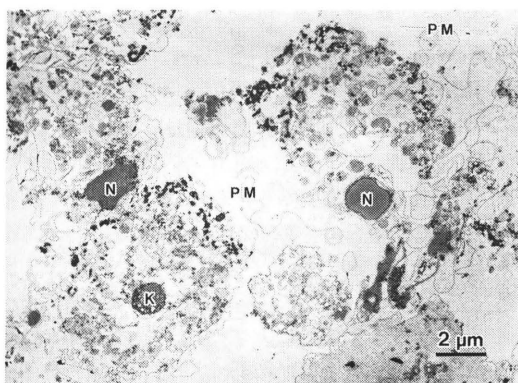


Fig. 5 Trophozoites 8 hours after exposure to 0.02% PHMB. The plasma membrane (PM) was disrupted. K: karyosome, N: nucleus

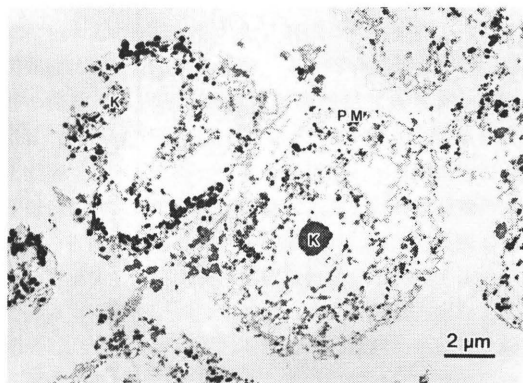


Fig. 6 Trophozoites 3 days after exposure to 0.02% PHMB. The plasma membrane (PM) was almost lost and intracellular organelles were also lost except karyosome (K).

結 果

1 フラジオマイシンによる変化

1・1 0.05%フラジオマイシン添加

薬剤を添加しない場合、培養後2週間目では、光顕で観察すると多くの栄養体は培地底に付着していた。0.05%フラジオマイシンを加えて1日目には、ほとんどの栄養体が培地底から浮遊した。電顕による観察では、アカント突起の減少が見られたが、細胞内の形態変化はあまり認められなかった。7日目には、少数の栄養体に細胞質内の軽度の空胞形成が見られた。21日目には多くの細胞が小型化し、ミトコンドリアや脂肪滴の消失、核の変性などが認められたが、ほぼ正常に嚢子化するものも認められた。

1・2 0.1%フラジオマイシン添加

0.1%フラジオマイシンを加えて1日目には、培地底からの浮遊とアカント突起の減少が見られたが、細胞内の形態変化は顕著ではなかった。3~7日目になると、細胞質内に空胞形成が認められる細胞が出現した。

空胞形成はまず核の周囲に著明で、やがて徐々に細胞表面に向かって増加した。アカント突起は減少したが形質膜は保たれており、細胞表面付近の細胞質も比較的正常に保たれていた。薬剤無添加の栄養体の細胞質内に認められた多くのミトコンドリアや脂肪滴は減少したが、核や核小体は保たれているものが多かった。また、嚢子化するものが少数認められた。21日目には細胞の小型化が著明で、栄養体の大きさは通常30~40μであるものが、10μ以下に縮小していた。

アカント突起、ミトコンドリア、脂肪滴はほとんど認められず、核も変性するものが多かったが、形質膜は保たれていた。

1・3 0.3%フラジオマイシン添加

0.1%フラジオマイシン添加の場合と同様に、1日目には培地底からの浮遊、7日目には核周囲の細胞質内の空胞形成 (図1)、21日目には細胞の小型化が認め

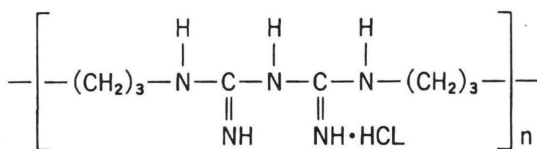


Fig. 7 General formula for polyhexamethylene biguanide. n=2 to 40

Table 1 アカントアメーバの薬剤による形態変化

薬剤	薬剤添加後の時間および日数				
	8時間	1日	3日	7日	21日
0.05%フラジオマイシン	n. d.	培地底からの浮遊(光頭) アカント突起の減少	アカント突起の減少	核周囲の細胞質に空胞形成 形質膜は保たれる 正常嚢子(+)	細胞の小型化 形質膜は保たれる 正常嚢子(+)
0.1%フラジオマイシン	n. d.	培地底からの浮遊(光頭) アカント突起の減少	アカント突起の減少 核周囲の細胞質に空胞形成	核周囲の細胞質に空胞形成 形質膜は保たれる 正常嚢子(+)	細胞の小型化 形質膜は保たれる 正常嚢子(+)
0.3%フラジオマイシン	n. d.	培地底からの浮遊(光頭) アカント突起の減少	アカント突起の減少 核周囲の細胞質に空胞形成	核周囲の細胞質に空胞形成 形質膜は保たれる 正常嚢子(+)	細胞の小型化 形質膜は保たれる 正常嚢子(+)
0.002% PHMB	n. d.	培地底からの浮遊(光頭) アカント突起の減少 ミトコンドリアの変性	形質膜の部分的欠損 形質膜付近の細胞質に空胞形成 変性嚢子(+)	細胞質の空胞の増加 細胞質成分の漏出 変性嚢子(+)	細胞質の空胞の増加 細胞質成分の漏出 変性嚢子(+)
0.006% PHMB	n. d.	培地底からの浮遊(光頭) 形質膜の断裂 細胞質の顆粒状変性 ミトコンドリアの変性	形質膜が徐々に消失 細胞質の顆粒状変性 変性嚢子(+)	細胞質の顆粒状変性 細胞の輪郭は保たれる 変性嚢子(+)	細胞質の顆粒状変性 細胞の輪郭は保たれる 変性嚢子(+)
0.02% PHMB	n. d.	培地底からの浮遊(光頭) 形質膜の断裂 細胞質の顆粒状変性 ミトコンドリアの変性	形質膜の消失 細胞質の顆粒状変性 カリオソームのみ残存 嚢子を認めない	細胞の形態を認めない	細胞の形態を認めない

PHMB=polyhexamethylene biguanide

n. d.=not done

られた(図2)。

2 PHMBによる変化

2・1 0.002% PHMB 添加

光顕で観察すると、0.002% PHMB を加えて1日目には、フラジオマイシンを加えた時と同様に、ほとんどの栄養体が培地底から浮遊した。電顕による観察では、1日目からアカント突起の減少やミトコンドリアの変性が認められた。3日目頃から形質膜の部分的な欠損(図3, 矢印)が現われ、細胞表面付近の細胞質中に空胞形成が起こり徐々に増加した(図3)。嚢子化するものも少数認められたがその嚢子の壁は薄く、内部構造も細胞質が顆粒状になって粗く、ミトコンドリアや脂肪滴が見られないなど正常(矢野ら, 1995)とは異なっていた。

2・2 0.006% PHMB 添加

光顕で観察すると、0.006% PHMB を加えて1日目には、ほとんどの栄養体が培地底から浮遊した。電顕による観察では、多くの栄養体が形質膜の断裂を起こしていた。

ミトコンドリアや脂肪滴はほとんど認められず、細胞質は顆粒状に変性していた。核やカリオソームは比較的保たれていたが、3日目以後には消失するものが多くなった。また嚢子化する細胞も少数見られたが、その嚢子の壁は薄く、内部構造も正常とは異なり栄養体と同様の顆粒状の変性が認められた(図4)。その後21日経過しても、なお変性した細胞の輪郭は保たれていた。

2・3 0.02% PHMB 添加

0.02% PHMB を加えると、その直後に、アメーバは培地底から浮遊し、光顕でも明らかに形態が桑実様に変化するのが認められた。電顕による観察では、8時間後には、形質膜の断裂、ミトコンドリア、脂肪滴、核の変性、細胞質の顆粒状の変性が認められた(図5)。これらの所見は、0.006% PHMB 添加後1日目と同様であった。また少数の嚢子が見られたがその嚢子壁は非常に薄く、内部構造も正常とは異なり栄養体と同様の変性が見られた。1~3日目には、形質膜がほとんど消失し、細胞質は顆粒状の成分が残存するのみであった(図6)。ミトコンドリア、脂肪滴、核などは消失し、カリオソームのみはしばしば認められた。嚢子化する細胞は全く無く、7日目以後には細胞の形態が全く認められなくなった。

これらの結果を表1にまとめた。

考 察

アカントアメーバ角膜炎は、原生動物であるアカントアメーバ属によって発症する角膜感染症であり、Nagingtonら(1974)、Jonesら(1975)が、初めて報告している。その後次第に症例が増加し、米国では1988年までに200例以上が報告され、発症の3大危険因子は、角膜外傷、汚染された水との接触、コンタクトレンズ装用とされている(Stehr-Greenら, 1989)。

治療法としては、薬物療法と手術療法とがある。本疾患は、角膜やコンタクトレンズからアメーバを分離同定することが困難で、細菌、真菌などの他の角膜感染症、特に単純ヘルペスウイルスの感染と誤診されることも多く、失明に至り摘出された眼球や角膜の病理組織検査で初めてアメーバ感染と診断された症例も報告されている(Nagingtonら, 1974)。たとえアメーバ感染と確定診断され、種々の抗生物質や抗真菌剤が使用されても、進行した症例では薬物治療が非常に困難である(Jonesら, 1975; Mooreら, 1985)。その原因は、アカントアメーバには栄養体と嚢子の2つの形態があり、飢餓、pHの変化などによって栄養体は容易に嚢子に変化し、この嚢子は外壁と内壁から成る厚い二重壁を持つため乾燥や薬剤に抵抗し、環境が再び適当な条件になると脱嚢して栄養体になるためである。そのため、1980年代前半にアメーバを除去する目的で、角膜移植術を施行された症例もあるが、移植片に再発を起こすことが多い(Mooreら, 1985)。

1980年代後半になり、アカントアメーバ角膜炎の初期症状や分離同定法が一般に認識されるようになると、他疾患との誤診も減少し早期診断が可能になった。Wrightら(1985)は初めて薬物のみでの治療に成功し、アカントアメーバ角膜炎の治療においては薬物療法を充分に行い、角膜内のアカントアメーバを根絶してから角膜移植術を行なうべきであると述べている。本邦では石橋ら(1988)が初めて報告したが、やはり薬物療法を徹底的に行なうことと病巣部の debridement が重要であると強調している。我々も、本症治療の第一選択は薬物療法であると考えており、まず種々の抗生物質や抗真菌剤を投与することとしている。

フラジオマイシンは、アミノ配糖体系抗生物質で、リボソームに作用し遺伝暗号の翻訳を障害して蛋白合成を阻害する。今回、フラジオマイシンによるアカントアメーバ栄養体の形態変化を光顕によって検討したところ、0.05%、0.1%、0.3%すべてで、1日目から多くの栄養体が培地底から浮遊している。電顕による

観察では, 1日目には, 薬剤無添加の栄養体と比較してアcant突起の減少が認められたのみで, 細胞内にはあまり変化は見られない。薬剤を無添加の場合, 培養後2週間目では顕微鏡で観察すると多くの栄養体は培地底に付着しており, その後次第に培地中に浮遊する栄養体が増加し, 嚢子化していくことが多い。したがって, 大きな形態変化は見られないものの栄養体の活動性が低下し, 培地底への付着力が弱まり浮遊するのではないかと考えられる。

7日目以後には, 細胞質内に空胞を生じる栄養体が少数出現する。この空胞は最初, 核の周辺に多く次第に細胞質の表面に増加する。0.1%と0.3%では, 3~7日目から同様の空胞形成のある栄養体が明らかに増加し, 21日経過すると細胞全体が著明に収縮する。これらは, フラジオマイシンの蛋白合成阻止の結果と考えられる。フラジオマイシン添加の場合, PHMB添加時と異なって形質膜は最後まで保たれており, 細胞内の成分が漏出することはなく, 栄養体の形態変化はPHMBよりも, より緩徐に起こる。

また少数ではあったが, ほぼ正常に嚢子化するものも認められる。作用発現が緩徐なため, 栄養体が嚢子に変化する時間的余裕があるため, これがアcantアメーバ角膜炎をフラジオマイシンで治療した場合の再発の原因となるものと考えられる。

Larkinら(1992)は, 新しい種類の抗アメーバ剤であるPHMBを使用し, 6例中5例に良好な結果を得たと報告している。われわれも最近経験した本症の1例に対し, 米国ペイラー医科大学眼科Jones教授から供与されたPHMBを使用し, 良好な結果を得ている(鎌田ら, 1995)。

PHMBは, 図7に示すような構造式を持つ多因子のbiguanideで, 米国では一般にプールや下水の消毒剤, コンタクトレンズの消毒薬などとして使用されていたが, これまで感染症の治療薬として使用されたことはなかった。大腸菌を用いた実験で, PHMBはその形質膜に作用し, 細胞成分を漏出させ生存に必要な呼吸酵素を阻害すると言われている(Jonesら, 1993)。大腸菌を用いた別の実験では, 陽性に荷電したPHMB分子が, 形質膜の陰性に荷電した酸性磷脂質と結合し, 形質膜の二層構造を歪めることが報告されている(Broxtonら, 1984; Ikedaら, 1984)。

今回, PHMBによるアcantアメーバ栄養体の形態変化を顕微鏡によって検討したところ, 0.002%の濃度では, 3日目頃から形質膜の部分的欠損と付近の細胞質中に空胞形成が認められた。空胞はフラジオマイ

シン添加の場合まず核の周辺から出現したが, PHMBの場合細胞表面から出現した。これは, PHMBにより形質膜が障害され, その部分から細胞成分が漏出したためではないかと考えられる。0.006%ならびに0.02%では, 形質膜の障害がさらに高度で明らかな断裂が認められるようになり, 細胞内の脂肪滴, ミトコンドリア, 核の変性もより高度になる。

さらにPHMBでは, フラジオマイシンと比較して正常な嚢子化が起こりにくいように思われる。アcantアメーバ角膜炎が難治性である原因は, 嚢子が種々の薬剤に対して抵抗力を持つためである。したがって, 栄養体の正常な嚢子化を阻害したり, 嚢子そのものを死滅させられる薬剤は, アcantアメーバ角膜炎の早期治療や再発の防止に有効である。多くの抗生物質や抗真菌剤は, アメーバの栄養体には有効であっても嚢子に対しては効果の弱いものが多い。しかし, PHMBは低濃度でも嚢子を死滅させることが可能であると報告されており(Larkinら, 1992), このことはPHMBがアcantアメーバ角膜炎の有用な治療薬になりうることを示唆している。しかし, いずれにしても進行した症例の治療は困難で, たとえ薬物療法でアメーバを根絶できても, 高度な角膜混濁が残れば最終的には角膜移植術が必要になる。アcantアメーバ角膜炎の完成期に出現する特徴的な輪状浸潤, 輪状潰瘍, 円盤状角膜炎, 円盤状角膜潰瘍やコンタクトレンズ装用の既往に留意すれば, 本症の診断は決して困難ではない。したがって薬物療法のみで本症を治癒可能にするためには, 早期診断, 早期治療が最も重要であると考えられる。

結 語

PYG培地中の培養アcantアメーバにPHMBおよびフラジオマイシンを加え, アcantアメーバの形態変化を透過型電子顕微鏡を用いて観察した。PHMBは, 早期から形質膜の断裂を起こし栄養体の変性が著明で, かつ嚢子にも有効であり, アcantアメーバ角膜炎の有効な治療薬になるものと考えられた。

謝 辞

本研究を行なうに当たり, 試料作製に助言をいただきました伊藤義博博士, PHMBならびにフラジオマイシンを提供していただきましたJones教授と日本化学薬株式会社に深謝致します。

文 献

- 1 Broxton, P., Woodcock, P. M., Heatley, F. and Gilbert, P. (1984): Interaction of some polyhexamethylene biguanides and membrane phospholipids in *Escherichia coli*. J. Appl. Bacteriol., 57, 115-124
- 2 Dawson, M. W., Brown, T. J. and Till, D. G. (1983): The effect of Baquacil on pathogenic free-living amoebae (PFLA). 1. In axenic conditions. N. Z. J. Mar. Freshwater Res., 17, 305-311
- 3 Dawson, M. W., Brown, T. J., Biddick, C. J. and Till, D. G. (1983): The effect of Baquacil on pathogenic free-living amoebae (PFLA). 2. In simulated natural conditions—in the presence of bacteria and/or organic matter. N. Z. J. Mar. Fresh water Res., 17, 313-320
- 4 Ikeda, T., Ledwith, A., Bamford, C. H. and Hamm, R. A. (1984): Interaction of a polymeric biguanide biocide with phospholipid membranes. Biochim. Biophys. Acta., 769, 57-60
- 5 石橋康久・松本雄二郎・渡辺亮子・本村幸子・安羅岡一男, 石井圭一・遠藤卓郎・小山 力・八木田健一 (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
- 6 Jones, D. B. (1993): 感染性角膜炎の治療における最近の進歩。あたらしい眼科, 10, 405-410
- 7 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
- 8 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
- 9 Larkin, D. F. P., Kilvington, S. and Dart, J. K. G. (1992): Treatment of *Acanthamoeba* keratitis with polyhexamethylene biguanide. Ophthalmol., 99, 185-191
- 10 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
- 11 Nagington, J., Watson, P. G., Playfair, T. J., McGill, J., Jones, B. R. and Steele, A. D. M. (1974): Amoebic infection of the eye. Lancet, 2, 1537-1540
- 12 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
- 13 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
- 14 塩田 洋 (1991): アカントアメーバ角膜炎の臨床。眼科, 33, 707-712
- 15 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
- 16 Stehr-Green, J. K., Bailey, T. M. and Visvesvara, G. S. (1989): The epidemiology of *Acanthamoeba* keratitis in the United States. Am. J. Ophthalmol., 107, 331-336
- 17 Varga, J. H., Wolf, T. C., Jensen, H. G., Parmley, V. C. and Rowsey J. J. (1993): Combined treatment of *Acanthamoeba* keratitis with propamidine, neomycin, and polyhexamethylene biguanide. Am. J. Ophthalmol., 115, 466-470
- 18 矢野雅彦・塩田 洋・加藤俊彦・工藤英治・三村康男 (1995): アカントアメーバの電子顕微鏡による形態学的観察 第1報—培養アカントアメーバについて—。眼紀, 46, 142-145
- 19 Wright, P., Warhurst, D. and Jones, B. R. (1985): *Acanthamoeba* keratitis successfully treated medically. Br. J. Ophthalmol., 69, 778-782