

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 4 月 1 日現在

機関番号：13301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2011～2012

課題番号：23890072

研究課題名（和文） 生体共焦点顕微鏡と前眼部光干渉断層計を用いた重症感染性角膜炎の迅速診断法の開発

研究課題名（英文） Early diagnosis with in vivo laser confocal microscopy in cytomegalovirus corneal endotheliitis and Acanthamoeba keratitis

研究代表者

横川 英明 (YOKOGAWA HIDEAKI)

金沢大学・大学病院・助教

研究者番号：70608695

研究成果の概要（和文）：本研究では、重症感染性角膜炎（アcantアメーバ角膜炎、サイトメガロウイルス角膜内皮炎）において、生体レーザー共焦点顕微鏡を用いた解析を行った。その結果、サイトメガロウイルス角膜内皮炎患者において、サイトメガロウイルス感染細胞(owl's eye cell)の広範囲マップを作成し、その配列を明らかにした。さらに細隙灯顕微鏡でのコインレーションの配列との相同性を証明した。一方、アcantアメーバ角膜炎において、アcantアメーバシストのボウマン層への侵入が遷延感染に関与していることを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：In this study, we performed in vivo laser confocal microscopic analysis in patients with cytomegalovirus corneal endotheliitis and *Acanthamoeba* keratitis. In cytomegalovirus corneal endotheliitis, a two-dimensional reconstruction map of the owl's eye cells was created using acquired confocal images; the maps showed circular patterns. Also, we demonstrated that there is an association between owl's eye cells observed by confocal microscopy and coin-shaped lesions observed by slit-lamp biomicroscopy. In patients with persistence of *Acanthamoeba* keratitis, invasion of cysts into Bowman's layer was characteristically observed. This finding suggests that invasion of *Acanthamoeba* cysts into Bowman's layer may be a useful predictor for a persistent clinical course.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2011年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2012年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,300,000	690,000	2,990,000

研究分野：眼科学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・眼科学

キーワード：サイトメガロウイルス角膜内皮炎、アcantアメーバ角膜炎、レーザー共焦点顕微鏡

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。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。細隙灯顕微鏡所見による病期分類（初期、移行期、完成期）が提唱されており、移行期や完成期では感染が遷延し難治となることが多い。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、臨床所見のみからで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。最近我々は角膜専用レーザー生体共焦点顕微鏡を用いると早期診断が可能であることをCORNEA誌に報告した。さらに、本装置での診断率を高めるために、培養したアメーバシストを世界で初めて生体観察を行った。

「角膜内皮炎」では、角膜の5層構造（上皮細胞層、ボウマン層、実質層、デスメ膜、内皮細胞層）のうち内皮細胞が炎症で障害されるために角膜が膨潤して混濁し、その結果視力が低下する。従来、単純ヘルペスウイルスや水痘帯状疱疹ウイルスが原因で角膜内皮炎が起きることが分かっていたが、サイトメガロウイルスも角膜内皮炎を引き起こすことが2006年に本邦より初めて報告された。診断率の向上に伴い、本疾患と診断される症例は当院においても急速に増加傾向にあり、病態や長期的な予後についての研究が求められている。我々は生体レーザー共焦点顕微鏡を用いるとサイトメガロウイルスに感染した内皮細胞（Owl's eye cell）を全例において観察できることを既に見出した。

今回、両疾患（アカントアメーバ角膜炎、サイトメガロウイルス角膜炎）において、生体レーザー共焦点顕微鏡を用いて、更に詳細な病期分類が提唱出来るのではないかと着想するに至った。

2. 研究の目的

本研究では、レーザー共焦点顕微鏡を用いてアカントアメーバ角膜炎・サイトメガロウイルス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。さらに早期診断法の開発と病期分類の確立を目指した。

3. 研究の方法

対象はそれぞれ約10人程度のアカントアメーバ角膜炎患者とサイトメガロウイルス角膜炎患者を予定していた。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する。更にコンピュータプログラム（Adobe Photoshop）を用いて画像データの電子トレース像を作成し、2次元構造を解析する。なお、サイトメガロウイルス角膜炎の所見として、コインリージョンが知られているが、コインリージョンの部位の共焦点画像をソフトウェアを用いて広範囲マッピングを試みた。

4. 研究成果

サイトメガロウイルス角膜炎患者2名において、owl's eye cellの広範囲マップを作成し、その配列を初めて明らかにした。さらに、スーパーインポーズ法にてowl's eye cellの配列と細隙灯顕微鏡でのコインリージョンの配列との相同性を証明した。本結果は、本疾患の病態解明に役立つと思われた。

また、ヒトヘルペスウイルス6型とサイトメガロウイルスが同時に検出された角膜内皮炎症例について報告した。ヒトヘルペスウイルス6型の角膜内皮炎への関与については初めての報告であり、意義深いと思われた。

一方、17名のアカントアメーバ角膜炎のレーザー生体共焦点顕微鏡所見を解析し、アカントアメーバシストのボウマン層への侵入が感染の遷延にかかわっていることを発見した。

今後は、両疾患において、疾患の再発を抑えながらかつ治療薬の副作用を最小限にする標準治療法についての研究を行いたい。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 16 件)

- ① Yokogawa H, Kobayashi A, Sugiyama K. Mapping of owl's eye cells by *in vivo* laser confocal microscopy in patients with cytomegalovirus corneal endotheliitis. Jpn J Ophthalmol. 57:80-84. (2013) (査読有り) DOI 10.1007/s10384-012-0189-5
- ② Yokogawa H, Kobayashi A, Yamazaki N, Sugiyama K. Identification of cytomegalovirus and human herpesvirus-6 DNA in a patient with corneal endotheliitis. Jpn J Ophthalmol. 57:185-90. (2013) (査読有り) DOI 10.1007/s10384-012-0223-7
- ③ Murata N, Yokogawa H, Kobayashi A, Yamazaki N, Sugiyama K. Clinical features of single and repeated globe rupture after penetrating keratoplasty. Clin Ophthalmol. 7:461-5. (2013) (査読有り) DOI: 10.2147/OPHTH.S42117
- ④ Hatta Y, Yokogawa H, Kobayashi A, Torisaki M, Sugiyama K. A Case of Bilateral Descemet's Membrane and Subepithelial Opacity: In vivo Laser Confocal Microscopic Study. Case Rep Ophthalmol. 4:46-52 (2013) (査読有り) DOI: 10.1159/000350315
- ⑤ Yokogawa H, Kobayashi A, Yamazaki N, Ishibashi Y, Oikawa Y, Tokoro M, Sugiyama K. Bowman's layer encystment in cases of persistent Acanthamoeba keratitis (AK). Clin Ophthalmol. 6:1245-1251 (2012) (査読有り) DOI: 10.2147/OPHTH.S34695.
- ⑥ Yokogawa H, Kobayashi A, Saito Y, Yamazaki N, Masaki T, Sugiyama K. Rationale for performing penetrating keratoplasty rather than DSAEK in patients with bullous keratopathy in Japan. Ophthalmic Surg Lasers Imaging. 43:446-451. (2012) (査読有り) DOI: 10.3928/15428877-20120726-04
- ⑦ Yamazaki N, Kobayashi A, Yokogawa H, Ishibashi Y, Oikawa Y, Tokoro M, Sugiyama K. Ex vivo laser confocal microscopy findings of cultured Acanthamoeba trophozoites. Clin Ophthalmol. 6:1365-1368. (2012) (査読有り) DOI: 10.2147/OPHTH.S35258
- ⑧ Kobayashi A, Yokogawa H, Sugiyama K. A sliding technique to load thin endothelial donor lamella onto Busin glide for Descemet-stripping automated endothelial keratoplasty Clin Ophthalmol. 6:1229-1231. (2012) (査読有り) DOI: 10.2147/OPHTH.S34197
- ⑨ Kobayashi A, Yokogawa H, Sugiyama K. In vivo laser confocal microscopy findings in patients with map-dot-fingerprint (epithelial basement membrane) dystrophy. Clin Ophthalmol. 6:1187-1190. (2012) (査読有り) DOI: 10.2147/OPHTH.S34196
- ⑩ Kobayashi A, Yokogawa H, Sugiyama K. Management of a Small Paracentral Corneal Perforation Using Iatrogenic Iris Incarceration and Tissue Adhesive. Case Report Ophthalmol. 3:226-229. (2012) (査読有り) DOI: 10.1159/000341094
- ⑪ Kobayashi A, Yokogawa H, Sugiyama K. No Touch Technique and a New Donor Adjuster for DSAEK. Case Rep Ophthalmol. 3:214-220. (2012) (査読有り) DOI: 10.1159/000339835
- ⑫ Kobayashi A, Yokogawa H, Sugiyama K. Clinical Results of the Neusidl Corneal Inserter(®), a New Donor Inserter for Descemet's Stripping Automated Endothelial Keratoplasty, for Small Asian Eyes. Ophthalmic Surg Lasers Imaging. 3:1-8. (2012) (査読有り) DOI: 10.3928/15428877-20120426-04.
- ⑬ Masaki T, Kobayashi A, Yokogawa H, Saito Y, Sugiyama K. Clinical evaluation of non-Descemet stripping automated endothelial keratoplasty (nDSAEK). Jpn J Ophthalmol.

56:203-7. (2012) (査読有り) DOI:
10.1007/s10384-012-0123-x.

- ⑭ Yokogawa H., Kobayashi A, Sugiyama K. Clinical evaluation of a new donor graft inserter for Descemet's stripping automated endothelial keratoplasty. *Ophthalmic Surg Lasers Imaging.* 43:50-6. (2012) (査読有り) DOI: 10.3928/15428877-20111129-08.
- ⑮ Kobayashi A, Yokogawa H., Higashide T, Nitta K, Sugiyama K. Clinical significance of owl eye morphologic features by in vivo laser confocal microscopy in patients with cytomegalovirus corneal endotheliitis. *Am J Ophthalmol.* 153:445-53. (2012) (査読有り) DOI: 10.1016/j.ajo.2011.07.026.
- ⑯ Kimura M, Nishimura A, Yokogawa H., Okuda T, Higashide T, Saito Y, Sugiyama K. Subfoveal Choroidal Thickness Change Following Segmental Scleral Buckling for Rhegmatogenous Retinal Detachment. *Am J Ophthalmol.* 154:893-900 (2012) (査読有り) DOI: 10.1016/j.ajo.2012.05.010.

[学会発表] (計5件)

- ① 横川 英明 小角膜眼に対する小直径ドナーを用いた角膜内皮移植術 角膜カンファレンス2013 2013年2月14日 白浜町立総合体育館 (和歌山県)
- ② 横川 英明 代表的な角結膜疾患と角膜移植術. 石川県視能訓練士会講演会 2012年9月9日 浅ノ川総合病院 (石川県)
- ③ 横川 英明 角結膜疾患に対する薬物療法と角膜移植術について. 石川県薬剤師会PS講座 2012年6月10日 小松市民センター (石川県)
- ④ 横川 英明 ヒトヘルペスウイルス6型とサイトメガロウイルスが同時に検出された角膜内皮炎症例 第116回日本眼

科学会総会 2012年4月5日 東京国際フォーラム (東京都)

- ⑤ 横川 英明 サイトメガロウイルス角膜内皮炎における owl's eye cell の広範囲マップ 角膜カンファレンス2012 2012年2月25日 ホテルニューオータニ (東京都)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

横川 英明 (YOKOGAWA HIDEAKI)

金沢大学・大学病院・助教

研究者番号: 70608695