

(平成2年度 第94回総会)

## 特別講演 (I)

### 外眼部ウイルス感染症

内田 幸男

東京女子医科大学眼科学教室

#### 研究協力者

中川 尚, 高村 悦子, 中川 裕子, 風見 宣生, 佐々木淳子, 中川ひとみ,  
高野 博子, 吉野 圭子, 荒木 博子, 村田真由美, (東京女子医科大学),  
林 皓三郎 (神戸市環境保健研究所), 山崎 修道, 宮村紀久子 (国立予防衛生  
研究所)

#### 要 約

外眼部ウイルス感染症の迅速診断に免疫組織化学的方法が有用かどうかを試みた。試料は角膜、結膜から採取したが、**impression** 標本には **immunoblotting** 用のニトロセルロース膜を用い、擦過標本にはスライドグラスを用いた。染色は **peroxidase-antiperoxidase (PAP)** 法、**ABC** 法 (**Vectastain**®), 免疫蛍光法を行った。対象としたのは頻度の高い4疾患である。

単純ヘルペスウイルス (**HSV**) 角膜炎については、**impression** に **PAP** 法を施した場合、樹枝状病巣そのままの形が膜上にレプリカとして得られた。これは **HSV-1** 抗原陽性を呈する細胞からなっていた。強拡大で多核巨細胞、核クロマチンの辺縁化、核内封入体などが認められた。ヘルペス性上皮性角膜炎27例中25例において陽性結果を得た。微小な病巣の検査も可能で、**impression** 法は擦過法よりも優れると考えた。

水痘・帯状ヘルペスウイルス (**VZV**) によって起こる偽樹枝状角膜炎は **HSV** の樹枝状病巣とは異なる形状をもち、この **impression** 標本を蛍光標識モノクローナル抗体で染めると、**VZV** 抗原が認められる。水痘後の円板状角膜炎、または皮疹を欠く眼部帯状ヘルペスに上皮性病変を伴った場合、ここから抗原を証明し、病因を確定できる。

アデノウイルス (**Adv**) による結膜炎において **impression** の **PAP** 法は、結膜上皮細胞内に **Adv** 抗原を示した。64例について分離培養法と比較すると、感度は69%、特異性97%であった。型別の検出率では3型が33%と低く、4, 8, 37型はそれぞれ75, 91, 100%であった。

急性出血性結膜炎 (**AHC**) の病原であるエンテロウイルス70型 (**EV70**) とコクサッキーウイルス A24型変異株 (**CA24v**) のそれぞれについて高抗体価をもつモルモット血清を得た。この希釈液を一次抗体として感染培養細胞に免疫蛍光法と **ABC** 法を行い、細胞質内に抗原を認めた。**EV70** の **AHC** では、発病1~3日の試料にのみ陽性例があった。最近、**EV70** は患者からの分離は困難であり、診断は血清反応によっている。従って抗原を証明できることは意義がある。わが国で **CA24v** による結膜炎の流行は沖縄以外では知られていない。しかし散発例があり、既に侵入していることがわかる。(日眼会誌94: 889-902, 1990)

別刷請求先: 162 東京都新宿区河田町8-1 東京女子医科大学眼科学教室 内田 幸男

(平成2年8月7日受付, 平成2年8月7日受理)

Reprint requests to: Yukio Uchida, M.D. Department. of Ophthalmology., Tokyo Women's Medical College, 8-1 Kawada-cho, Shinjuku-ku, Tokyo 162, Japan

(Received August 7, 1990 and accepted August 7, 1990)

キーワード：免疫組織化学，単純ヘルペス角膜炎，水痘・帯状ヘルペス角膜炎，アデノウイルス結膜炎，急性出血性結膜炎。

## Viral Diseases of the Outer Eye —Rapid Diagnosis by Immunohistochemistry—

Yukio Uchida

*Department of Ophthalmology, Tokyo Women's Medical College*

### Abstract

Rapid diagnosis of viral diseases of the outer eye was attempted by means of immunohistochemical methods. Specimens were obtained with a nitrocellulose membrane, used as a blotter for immunoblotting test. An impression of the corneal or conjunctival surface was obtained by anesthetizing the eye and lightly pressing the membrane against the tissues. In some cases, scraping materials were taken on a slide glass. Viral antigens in the specimens were detected by peroxidase-antiperoxidase (PAP) method, ABC system (Vectastain<sup>®</sup>), or immunofluorescence. Four common diseases were studied.

Dendritic corneal lesions caused by herpes simplex virus (HSV) were impressed on the membrane, and exhibited exact duplicates of lesions which were composed of PAP-positive epithelial cells. Under a high magnification, pathologic changes such as margination of chromatin, intranuclear inclusion bodies, and multinucleated giant cells were observed. Of 27 cases of epithelial herpetic keratitis, 25 showed positive results. The impression can permit examination of a minute lesion, therefore, is superior to scraping.

Dendritic lesions caused by varicella-zoster virus (VZV) have a characteristic morphology different from those of HSV. Impressions showed the virus antigen, when treated with fluorescein-labeled anti-VZV monoclonal antibody. Appearance of such a dendrite in disorders of unknown cause indicates the etiology.

Conjunctival impressions of adenovirus (Adv) conjunctivitis examined by the PAP method revealed Adv-antigen containing cells. Of 64 cases analyzed, 24 PAP-positive cases were compared with the 35 culture-proven cases. The sensitivity of PAP method was 69%, and the specificity was 97%. The detection rate varied according to serotype, and was especially low (33%) in type 3.

Guinea pig antisera with high titers against enterovirus type 70 (EV70) and a variant of coxsackievirus A type 24 (CA24v), the causative viruses of acute hemorrhagic conjunctivitis (AHC), were obtained. Using these sera as the primary antibody, the antigen of each virus was localized in the cytoplasm of infected HeLa cells by either ABC, or immunofluorescence. Conjunctival cells from patients with EV70 AHC were antigen-positive for 3 days after the onset of disease. Though epidemics of CA24v AHC have only been experienced in Okinawa, sporadic cases have been observed in other districts of Japan. (*Acta Soc Ophthalmol Jpn* 94: 889—902, 1990)

**Key words:** Immunohistochemistry, Herpes simplex keratitis, Varicella-zoster keratitis, Adenovirus conjunctivitis, Acute hemorrhagic conjunctivitis

## I 緒 言

眼のウイルス感染症は、細菌に対する抗生物質のような決定的な原因療法がないため、治療的に難物である。範囲を外眼部に限って見た場合、おもに結膜炎、

角膜炎ということになるが、これに視力をおびやかすものでは単純ヘルペス角膜炎、水痘・帯状ヘルペス角膜炎がある。また視力予後はよいものの生活能率を低下させ、伝染病として流行や集団発生を起こすものにアデノウイルス角結膜炎、エンテロウイルスによる急

性出血性結膜炎のようなものがある。麻疹やムンプスのように頻度の高い疾患であり、外眼部も侵すものの重篤な障害はきたさず、全身症状が主に扱われて、眼科診療に登場することは減らない疾患もある。ほかにウイルス診断法の進歩によって、多種のウイルスが外眼部に感染し、疾患を起こすことがわかって来ている<sup>1)</sup>。風疹、ニューキャッスル病、インフルエンザ、EB、パピローマなどのウイルスもそうである。しかし日常の眼科診療の対象として重要な疾患といえ、最初にあげた4疾患ということができ、今回はこの4疾患を検討の対象とした。

眼のウイルス疾患は局所的の傾向が強く、全身感染を扱う他科とは異なった部分が少なくない。最近ではウイルス学と、これに関連した免疫学の進歩は目覚ましく、診断法、検査法も複雑化している。検査を専門とする企業の増加もあって、臨床医が関係する機会は減るのみである。眼科領域でもこの趨勢にもれず、感染症の病因的診断の検査に臨床医がかかわることは少なくなった。眼脂の塗抹標本の染色、鏡検も顧みられない傾向にある。検査を他に依頼した場合、結果を正しく評価して治療に還元する能力が医師から次第に失われるおそれがある。著者は臨床教室の検査室で可能な感染症の検査は眼科医の身近にとどめたいと望んでいる。ウイルス性疾患においても簡易な検査で、その場で原因ウイルスが判明するものがあれば理想的である。またその検査結果が百パーセント確実なものでもなく、その先の時間を要する詳しい検査の方向づけを示せば、それでも有用である。著者らは免疫学的な細胞診をとりあげ、前出の4疾患に対して、これが適用できるかを試みた。またこれら疾患の最近の動向についてもふれる。

## II 実験方法

ウイルス疾患の診断法としては、主なものでも表1に示すように多くのものがある。ウイルスの検出と血清学的な証明と2つの面からなされる。中でも最も基準的かつ重要なのはウイルスの分離培養と同定である。しかし設備を要し、数日ないし数週間の期間がかかる。臨床医として望ましいのは迅速な診断であり、その理由で回復期に抗体価の上昇を証明する血清学的方法も消去される。Rao<sup>2)</sup>は迅速な診断法として、ネガティブ染色による電顕的ウイルス粒子の検出、免疫組織化学または免疫蛍光法、酵素免疫アッセイ、核酸ハイブリダイゼーションなどをあげているが、1～6時

表1 ウイルス感染症の診断法

1. ウイルス分離培養と同定	4. ウイルス抗原の検出
2. ウイルス粒子の電顕による観察	a. 蛍光抗体法
3. ウイルスDNAの検出	b. 酵素抗体法
a. Hybridization	c. ELISA (酵素免疫吸着法)
b. PCR	5. ウイルス抗体の検索
	a. 中和試験 (NT)
	b. 補体結合反応 (CF)
	c. ELISA
	d. 間接赤血球凝集反応
	e. その他

間の所要時間である。

ウイルス粒子の検出は電顕の設備と技術をもつ場合は有力な方法である<sup>3)</sup>。しかし著者らは僅かな経験しかない<sup>4)</sup>。また酵素免疫アッセイは資料中のウイルス抗原を液の呈色によって量的に示し、多数例を扱うのに便利である。著者らは過去の経験から、形態学的にもウイルス抗原の所在がわかるという利点を考え、免疫学的な細胞診を主とする方針をとった。

### 1. Impression cytology

結膜と角膜から上皮細胞の試料をとるに当たって、従来のスパーテルによる擦過と並行して、できるだけ侵襲を少なくする目的で impression cytology を用いた。圧迫標本、スタンプ標本などの名称もあるが、ここでは impression と呼ぶことにする。採取する支持物としてはガラス、プラスチックなどに始まり<sup>5)</sup>、cellulose acetate のミリポアフィルターが多い<sup>6)7)</sup>。Gerhardt<sup>8)</sup>は immunoblotting 用のニトロセルロース膜を用いており、著者らもこれを選んだ<sup>9)</sup>。抗原の吸着性がよいことを期待したわけである。Bio-Rad 社製ポアサイズ  $0.45\mu$  のものを  $3 \times 10\text{mm}$  の小片にし、0.4%塩酸オキシプロカインで点眼麻酔後、結膜または角膜にのせ、硝子棒で膜の上から軽く圧迫してから静かにはがす。被検者には全く苦痛を与えない。

### 2. 酵素抗体染色法

ニトロセルロース膜は室温で空気乾燥し、固定は行わない。酵素抗体法には市販のキットを用いた。単純ヘルペスウイルス (HSV) を例にとると、PAP (peroxidase-antiperoxidase) 法を行ったが、DAKO社のウサギ抗 HSV-1抗体と、ウサギユニバーサル PAP キットを使用した。操作としてはまず標本に  $\text{H}_2\text{O}_2$  を作用させて内在性ペルオキシダーゼを破壊し、次いで正常ブタ血清で非特異反応を阻止する。一次抗体を反応させ、さらにブタ抗ウサギ IgG 抗体を結合させ、これにウサギ抗ペルオキシダーゼ IgG とペルオキ

シダーゼの複合物を加える。最後に  $H_2O_2$  と発色剤のアミノエチルカルバゾールを作用させると HSV 抗原のある部は赤褐色に染まる。操作途中の膜の洗浄には 0.05% Tween-20PBS を用いた。蒸留水で洗浄後マイヤーのヘマトキシリンで核染色を施し、グリセリンゼリーで封入した。

一次抗体がモルモットであるエンテロウイルスの場合は、Vector Laboratories の Vectastain<sup>®</sup> ABC kit を用いた。

### 3. 免疫蛍光法

ウイルスによっては蛍光標識モノクローナル抗体で直接法を行い、または間接法を行った。Impression 標本の場合には蛍光顕微鏡の落射照明で観察、写真撮影を行い、スライドグラスに塗抹した標本は透過照明で行った。

### 4. ウイルス分離培養と血清抗体測定

Special Reference Laboratories (SRL) 社に依頼した。

## III 単純ヘルペス角膜炎

### 1. 症例と結果

症例 1. 60歳, 男性。

1982年に右眼角膜ヘルペスと診断され治療をうけたことがある。1985年の初診時はびまん性実質型角膜炎に樹枝状角膜炎を合併していた。IDU とステロイドの点眼で実質混濁を残して治癒した。しかしその後、年に 2~3 回樹枝状角膜炎の再発をみている。1990年 3月 19日、今回は約 1 週間前から霧視が起こった。右眼には角膜中央から耳側にかけて不規則形の混濁があるが、実質浮腫、膨化は認められない。瞳孔縁に樹枝状の表層病変があり、フルオレセイン、ローズベンガル両者に染まる (図 1)。この部の impression 標本に抗 HSV-1 の PAP 法を行った。ニトロセルロース膜は灰褐色にうすく染まるが、顕微鏡の透過光式照明で充分に細胞のレベルで観察ができる。弱拡大で観察すると病巣の形がそのままレプリカのように標本上に認められる (図 2)。これは赤褐色に染まる細胞からなっており、その形は樹枝状病変のうち、耳側の部分であることがわかる。標本を細胞付着面の側から観察すると鏡像として認められる。細胞のうち赤褐色を呈する大型のものは多核巨細胞である。

症例 2. 49歳, 男性。

1975年に右眼角膜ヘルペスに罹患し、以後ときどき再発を反復してきた。1990年 2 月に実質炎が再発し、

治療中の 1 ヶ月後に樹枝状病巣が出現した。突起の末端に膨大部 terminal bulb をもった典型的な HSV による上皮性病変である。一部は拡大して地図状潰瘍への移行を思わせた (図 3)。Impression 標本の PAP 染色の一部を拡大すると大部分が赤褐色すなわち抗原陽性の細胞であることがわかる (図 4)。抗原を細胞質と核の両方にもつ細胞が多い。クロマチンの辺縁化がみられ、また封入体として核内に塊状に濃く赤褐色を示す細胞がある。多核巨細胞も認められ、その細胞質、核ともに抗原が陽性である。

症例 3. 18歳, 女性。

2 日前から口唇に水疱性発疹を生じ 38°C の発熱が起こった。同様の発疹は左眼周囲の皮膚に及び、左眼が充血したため 1985年 8 月 17日、紹介で来院した。患者には幼時からアトピーがある。診察時、球結膜に充血があり、細隙灯顕微鏡下で輪部結膜に小さい浸潤による隆起が数個認められる。下方 6 時の輪部から約 1mm 入った角膜にローズベンガルに染まる楕円形の小さい病巣がある。反帰照明でみると上皮内浸潤ともいふべき病変であり、大きさは 0.3mm である (図 5)。この部の impression 標本の PAP 染色は細隙灯顕微鏡でみられた形そのままを示し、HSV 抗原陽性の細胞からなっている (図 6)。

本症例は皮診の分布、角結膜の所見で初感染を思わせたが、初診時の抗 HSV IgG は既に陽性で抗 HSV IgM は陰性であり、否定された。

症例 4. 50歳, 女性。

1989年 12月 28日、左眼に充血、異物感があり 3 日後近くの眼科医を訪ね治療を受けた。しかし改善せず 90年 1月 19日当科を受診した。角膜に浅いが広い地図状の潰瘍があり、フルオレセインとローズベンガル両者に染まる。その辺縁はローズベンガルに濃く染まり、偽足様に突起を出し、先端は膨大する傾向がある (図 7)。Impression 標本では潰瘍の辺縁部に抗原陽性細胞が集まっているが、これに囲まれた潰瘍の中に陽性細胞はほとんどなく、抗原陰性の細胞やヘマトキシリンに染まる物質が認められる (図 8)。すなわち地図状潰瘍の場合ウイルスの活動は潰瘍の辺縁部にあることがわかる。

その他の症例について

樹枝状角膜炎を impression cytology を用いて病因診断をしたのち、病巣を擦過除去し、抗ウイルス剤の点眼によって治療した 1 例では、3 日後に樹枝状病巣は消失したが、あとは点状のフルオに染まる病変と

表2 Impression 標本の PAP によるヘルペス性  
角結膜病変からの HSV 抗原検出成績

病 型	検体数	PAP	
		抗原(+)	抗原(-)
角 膜			
星状・樹枝状潰瘍	25	23	2
地図状潰瘍	2	2	0
栄養障害性潰瘍	1	0	1
非典型的角膜炎 (フリクテン様変化, KSD など含む)	9	1	8
結 膜			
濾胞性結膜炎	2	0	2
地図状潰瘍	1	1	0

なった。このときの impression 標本には僅かであるが抗原陽性細胞がみられ、病巣局所にまだウイルスの活動が残っていることを示した。また10年のヘルペスの既往をもつ角膜の混濁の中に潰瘍を生じた例で、辺縁が滑らかなことから栄養障害性潰瘍 trophic ulcer と診断した。Impression 標本に PAP 染色で抗原は陰性であった。少量のステロイド点眼を用いて経過を追ったところ潰瘍はいくぶん縮小したが、潰瘍の縁の2カ所から樹枝状にフルオに染まる上皮性病変が伸び始めた。この部の impression 標本では HSV 抗原陽性細胞が認められた。

著者らが行った impression 標本に抗 HSV 酵素抗体法を適用した方法による成績を表2に示した。対象は単純ヘルペス角膜炎と臨床的に診断した症例、またはそれを疑った症例である。診断病名別に検体の陽性、陰性の数をまとめた。角膜ヘルペス基本型といわれる樹枝状角膜炎とその類型では25中23が陽性。地図状潰瘍の2はいずれも陽性、栄養障害性潰瘍の1は陰性であった。単純ヘルペスとしては非定型的な輪部のフリクテン様浸潤巣、ピマン性表層角膜炎様病変などの9例からは1例のみ陽性であった。結膜では角膜炎を合併した濾胞性結膜炎の瞼結膜からは2例において陰性、結膜の地図状潰瘍1は陽性であった。

もうひとつの抗原証明法として免疫蛍光法が impression cytology に適用できるかどうかを試みた。標本は同様にニトロセルロース膜にとり固定を行わず、抗 HSV の間接法を施した。膜は不透明なため透過照明は行えず、落射照明で観察した。樹枝状角膜炎からの impression 標本に特異蛍光をもった上皮細胞が観察された。この方法も有用と思われたが、観察によって蛍光が速やかに褪せること、永久標本が得られ

ないなどの難点があり、impression cytology に関する限り、酵素抗体法がまさを認めた。

## 2. 考按

Impression cytology は角膜、結膜の細胞を侵襲を少なく、かつ組織学的な細胞構築を余り乱さずに膜上に写しとることができる。採取する細胞層は表層の一層のみとは限らず下層も含まれることがある<sup>7)</sup>。ウイルス性疾患の診断に応用するには、この impression 標本に免疫組織化学が適用できないか否かを考えた。免疫蛍光法も適用可能であるが、観察による蛍光の退色が速やかで、永久標本が得難いことから、主として酵素抗体法を使用した。

免疫組織化学も現在は市販のキットの種類が多く、特殊なものを除けば一次抗体も入手できる。問題はその特異性である。免疫学的および化学的反応が、一次、二次と回が重なるごとに非特異性因子の介入の可能性が増す。この意味では反応が一回で済む免疫蛍光法の直接法が特異性では最も信頼できる。HSV 角膜炎の今回の PAP 染色の特異性は臨床例への応用のほかに、HSV 接種培養細胞で確かめた。すなわち非接種の細胞が染色陰性であることを対照としている。赤褐色の呈色は顕微鏡の視野において細胞内にある場合は HSV 抗原陽性と判定したが、細胞の形態を示さないエレメントの発色には抗原との判定は下さなかった。PAP 法を HSV 角膜炎の擦過物に用い、診断に有用とした論文もある<sup>10)</sup>。

試料採取に用いた immunoblotting 用のニトロセルロース膜は染色過程で若干着色するが顕微鏡の透過光による観察は、充分可能であった。Gerhardt ら<sup>8)</sup>は affinity membrane を用いて角膜の樹枝状病巣のレプリカを写しとり、酵素抗体法で染色して、診断法として評価している。しかし病巣と標本の形の一致を示しているが、細胞レベルでの観察は行っていないようである。

細胞レベルでの HSV による病変としては、核の膨化、クロマチンの辺縁化、核内封入体などが認められ、これらの部位、およびこれら細胞の細胞質には HSV 抗原が陽性であった。また多核巨細胞は常に抗原陽性を示した。以上の変化は発色による抗原の提示に加えて、HSV による変化であることの証拠を与える。

樹枝状角膜炎は今回の検査法に最も適した病変である。樹枝状を形作るウイルスにより変性した細胞は容易に剝がれ落ちる。そのため膜上に忠実に病巣の形が写しとられることになる<sup>9)</sup>。なお impression の操作に

よって病変部の細胞が全部除かれるわけではなく、再度の施行でも、減少はするが細胞はある程度採取可能であり、場合によってはこれを対照や別の染色に適用することもできる。

小さい病巣も impression cytology の対象となりうる。約0.3mmのものも膜に写しとれたが、病変部位をよく確認、記録すればさらに小さくても可能と思われる。従来スパーテルやピンセットでのこの程度の病変の採取はまず不可能であり、この点が今回の方法の大きな特色であり長所である。Impression 標本で抗原の存在部位までわかるということは臨床上の意義が大きいと考えられる。なお本法に要する時間は約2時間であり、患者を待たせたままで結果を知ることができる。

表1において樹枝状角膜炎とその類型、および地図状潰瘍などの上皮性または表層型角膜ヘルペスからは大部分の例で抗原が陽性であり、これらがHSVの活動による病変であることがわかる。地図状潰瘍は角膜でも結膜でも、ともに潰瘍周辺部の上皮にウイルスの活動があることが示された。これらは従来から知られたことと一致した成績である<sup>11)</sup>。栄養障害性潰瘍にはウイルスの活動はないとされる。これは臨床的に病変の形状から診断可能である。しかしときに地図状潰瘍の陳旧化したものなどとの鑑別に苦しむことがある。そのような場合、impression 標本のPAP染色で抗原の有無を知ることは治療法の選択上に重要である。また樹枝状角膜病巣が消失したあとの細かい上皮病変、円板状角膜炎に合併する上皮病変などにHSV抗原の有無を知るのに、本法は擦過などと違って侵襲を少なく適用ができ、経過を追って回復して施行し、抗原の消長の追跡が可能である。今後、HSV角膜炎の病態の解明に役立つことと考えられる。

## IV 水痘・帯状ヘルペス角膜炎

### 1. 症例と結果

症例1. 42歳、男性。

1990年3月21日左の眼痛が起り、2日後に左の前額と上眼瞼に水疱性の発疹が生じた。3月26日外来を訪れ、皮疹の性状と分布から左眼部帯状疱疹と診断された。眼所見としては左眼の球結膜は充血し、上方輪部にローズベンガルに染まるフリクテン様の浸潤巣が数個並んでいた。これらに接する上部角膜の周辺部に細かい樹枝状様の上皮性病変が認められた(図9)。角膜病変のimpression 標本をとったが、HSVにおけるようにPAP染色のキットが得られないため、市販の

水痘・帯状ヘルペスウイルス(VZV)のモノクローナル蛍光抗体(ORTHO)を用いた、落射照明で観察すると、特異蛍光を示す細胞群があり、蛍光は細胞質および細胞膜に認められた(図10)。角膜の上皮性病変はVZVの活動で生じていることがわかる。

症例2. 23歳、女性。

1989年8月下旬、左眼が充血し、異物感が起こった。9月7日近くの眼科を訪れ、左眼は虹彩炎に緑内障が合併しているといわれた。治療を受けているうちに角膜実質炎が加わり、9月26日当科外来を紹介され受診した。角膜裏面に豚脂様の沈着物が多数附着している。瞳孔領下部の角膜上皮に浮腫と多発性びらんがあり、フルオに染まる。その中央にローズベンガルに染まる分岐した線状の部分が認められる(図11)。この部のimpression 標本の免疫蛍光法ではVZV抗原陽性の細胞が認められた。この症例では全経過を通して皮疹をみていないが、眼の病変はVZVによるものである。いわゆる皮疹を欠いた帯状ヘルペス zoster sine herpete の概念に入る例である。

### 2. 考按

VZVが樹枝状角膜炎を作るかどうかはかつて問題とされた。眼部帯状ヘルペスの角膜にみられる場合は、HSVの混合感染という説もあった。1970年代前半にこの疑問に発表が集中し、VZVによる樹枝状病変の性状の特徴<sup>12)13)</sup>と、ここからVZVが分離培養<sup>12)</sup>や免疫蛍光法<sup>14)</sup>などで示された。形態的にHSVの樹枝状病変と異なり、末端の拡大部がなく、パターンが断裂する。溝状の陥凹がなく、むしろ表面から隆起する(図12)。その表面に粘液物質が附着しフルオレセインには弱く、ローズベンガルには強く染まる。病巣下の実質浅層の浸潤は少ない。処置を加えなくても自然と消失する傾向があるなどである<sup>15)16)</sup>。HSVの樹枝状病巣と異なることから偽樹枝状角膜炎 pseudodendritic keratitis と呼ばれる。VZVではHSVほど分離培養が容易でなく、そのためにも免疫蛍光法による病因診断の必要性が大きい。

眼病変が眼部帯状ヘルペスのそれと酷似していながら、皮疹を欠く症例が経験される<sup>17)18)</sup>。ぶどう膜炎に眼圧上昇を伴い、虹彩に脱色萎縮巣を作る。血清中の抗VZV CF抗体価の高値はVZVの病因性を示唆する。VZVの初感染で水痘が起り、CF抗体価は上昇するが、その後徐々に低下して測定レベル以下になるとされる。帯状ヘルペスは体内に潜伏したVZVの活性化によるが、その発病によって1週以内にCF値は急速

に上昇する。したがって抗体価の高値は上述のような症例の診断に意味がある。

前房水等からVZVが分離培養されれば病因診断として確定的であるが、培養は困難である。免疫蛍光法も感染細胞が試料中に含まれねば有効でない。ぶどう膜炎、円板状角膜炎などの症例の角膜に、偽樹枝状角膜炎が出現すると、その形状からVZV性が疑われる。さらに免疫蛍光法をimpression標本、擦過標本に適用すると病因的確定診断を下すことができる。Zoster sine herpetteは確立された概念である<sup>19)</sup>。臨床的には皮疹のdermatomeに相当した深部の臓器、組織にも病変が起こり、深部痛を生じ、これが診断の参考になるといふ。

水痘の場合にも同様のことが起こる。急性期に角膜炎が合併すれば偽樹枝状病変も起こると思われるが、通常眼科医の目にふれない。治癒後、数週から数カ月して円板状角膜炎を起こす例がある<sup>20)</sup>。この場合HSVによるものとの鑑別は困難である。このような例の経過中に偽樹枝状病変が現れ、VZVの確定診断が免疫蛍光法によってつけられることがある<sup>21)</sup>。

## V アデノウイルス角結膜炎

### 1. 症例と結果

症例1. 38歳、男性。

両眼に急性汙胞性結膜炎が起こり、耳前リンパ節炎を伴った。2週前から子供が結膜炎にかかっていた。発病3日目に右眼下瞼結膜のimpression標本をPAP染色したところ、アデノウイルス(Adv)抗原陽性の細胞が認められた。細胞は変性が進んでいるが抗原は核と細胞質の両者に含まれているものが多い(図13)。同時に行った結膜擦過物からの分離培養によってAdv4型が証明された。

症例2. 21歳、女性。

右眼に充血と汙胞が生じ、耳前リンパ節炎を伴った。発病3日目に耳側上方の球結膜から採取したimpression標本のPAP染色で陽性細胞が認められたが、いずれも細胞は融解しかけており、形態は明瞭でない(図14)。この症例の結膜炎は片眼のみで経過し、多数の点状角膜混濁が生じた。8型が分離された。

1988~89年に外来を訪れたAdv性疑の結膜炎患者64例のうち、分離培養によってAdv性と確定診断がつき、かつ結膜impression標本をPAPでしらべたのは35例である。血清型は3, 4, 8, 37型であり、PAP陽性率は型によって異なり、全体として69%であった

表3 アデノウイルス結膜炎における結膜impressionのPAPによる抗原の血清型別検出結果

分離陽性群 N=35					
	3型	4型	8型	37型	計
PAP陽性率 ( )=%	4/12 (33)	6/8 (75)	10/11 (91)	4/4 (100)	24/35 (69)

表4 臨床診断によるアデノウイルス結膜炎における分離培養とimpression PAPとの一致率

		PAP		計
		+	-	
分離培養	+	24	11	35
	-	1	28	29
計		25	39	64

陽性一致率 24/35×100=69%

陰性一致率 28/29×100=97%

(表3)。PAPを分離培養と比較すると陽性一致率(感度)69%、陰性一致率(特異性)97%である(表4)。

### 2. 考按

Adv結膜炎は現在も依然として急性伝染性結膜炎の主座を占め、発生をくり返している。病院内感染の危険も常に医療従事者を悩ませている。Advには約40の血清型があるが、結膜炎を起こす型は時とともに変動がある。かつては流行性角結膜炎(EKC)の病因はAdv8型とされたが、近年これに19, 37型も同様病態をとるということで加えられた。咽頭結膜熱(PCF)は3型が中心であることは変わりがないが、4型による例が約10年前から増加した<sup>22)</sup>。最近EKCの角膜上皮下混濁が軽く、発生率が低くなったと巷間でいわれる。これは結膜炎を起こすAdvの型が多様化したためと思われる。1986年に院内感染を主とした8型感染40例を経験したが、結膜炎期間平均3週、点状上皮下角膜混濁の発生69%と、従来知られた8型EKCの数値と余り異なっていない<sup>23)</sup>。

Adv結膜炎の診断は臨床像からも流行時には可能である。しかし散発例では結膜炎、たとえば細菌性、アレルギー性などの鑑別が必ずしも容易でない。病因的迅速診断が可能であれば、感染源としての対処ができ、予後を知ることができる。この意味でELISAを用いた抗原検出法もあるが<sup>24)~27)</sup>、著者らは従来を経験をもとに結膜の細胞診に免疫組織化学を適用した。

著者ら<sup>28)</sup>はかつて臨床的EKCにおいて、患者回復

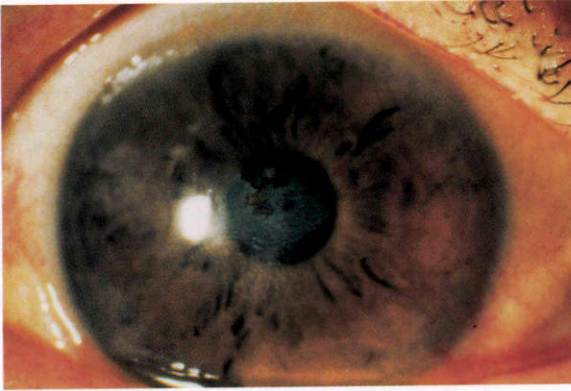


図1 樹枝状角膜炎, ローズベンガル・フルオレセイン重染色

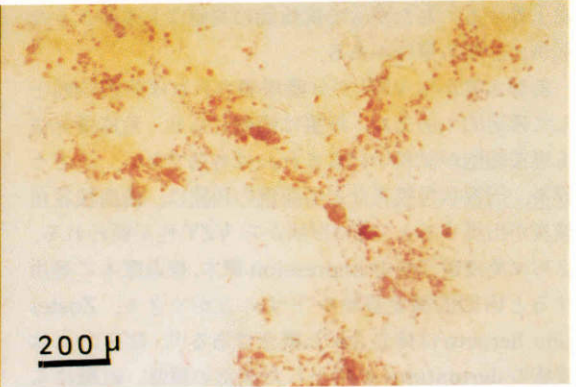


図2 図1の症例の impression 標本の PAP 染色, 瞳孔上の樹枝状病巣の鏡像の形, 弱拡大 ( $\times 42.8$ )

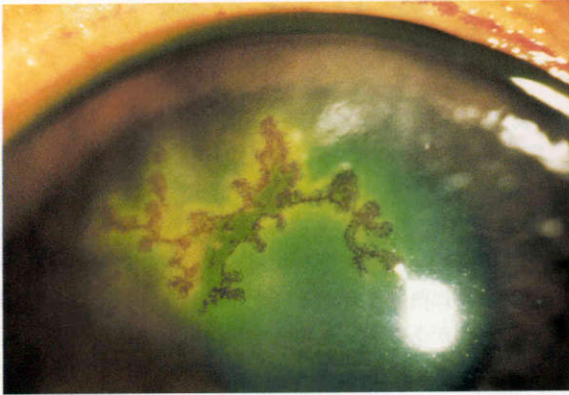


図3 樹枝状角膜炎, ローズベンガル・フルオレセイン重染色

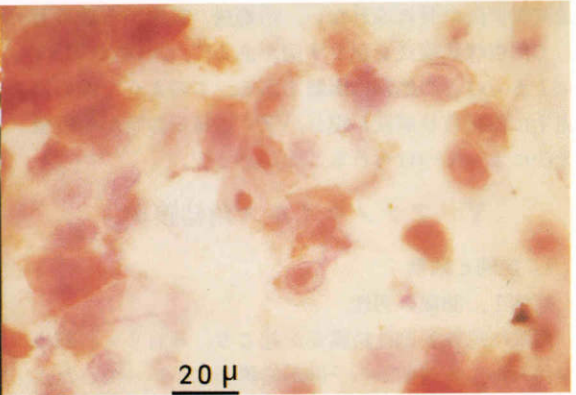


図4 図3の症例の impression 標本の PAP 染色, 強拡大. HSV-1抗原は赤褐色, 核内封入体, 核クロマチン辺縁化, 多核巨細胞などの変性像 ( $\times 428$ )



図5 6時輪部から約1mm 角膜内の点状のヘルペス性上皮病巣 (矢印)

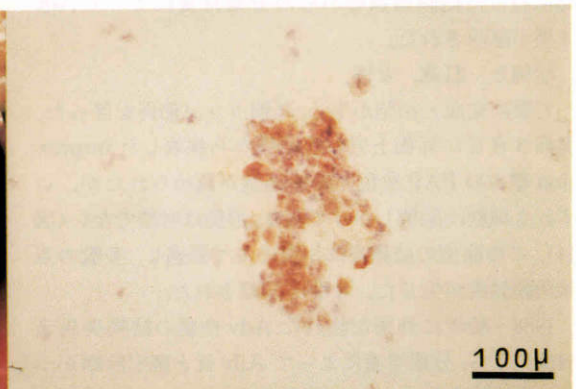


図6 図5の病巣の impression 標本の PAP 染色 ( $\times 107$ )





図7 地図状角膜炎，ローズベンガル・フルオレセイン重染色

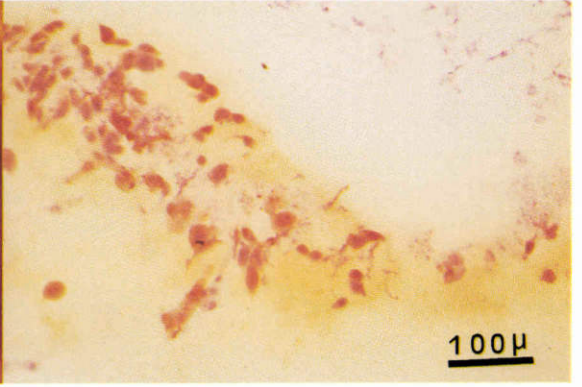


図8 図7の病巣のimpression標本の一部，PAP染色，潰瘍の辺縁部にHSV抗原陽性細胞（×107）



図9 帯状ヘルペス角膜炎，ローズベンガル・フルオレセイン重染色。輪部に数個の点状病巣と接した角膜内に小型の樹枝状病巣

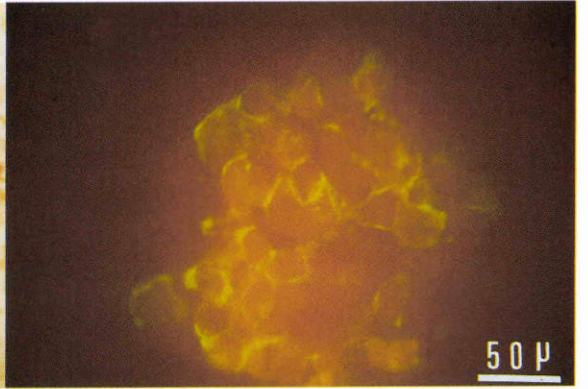


図10 図9の病巣のimpression標本，免疫蛍光法所見，抗原陽性の細胞（×214）

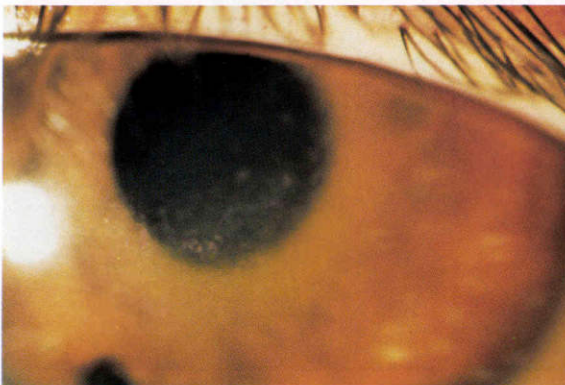


図11 角膜ブドウ膜炎，瞳孔下縁部にローズベンガルに染まる微細な上皮性病巣

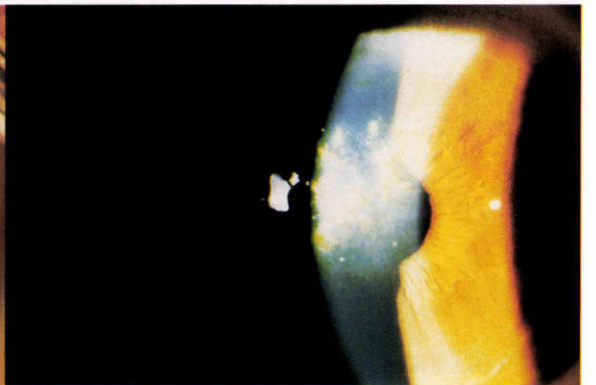


図12 帯状ヘルペスの樹枝状病巣（偽樹枝状角膜炎），フルオレセイン染色

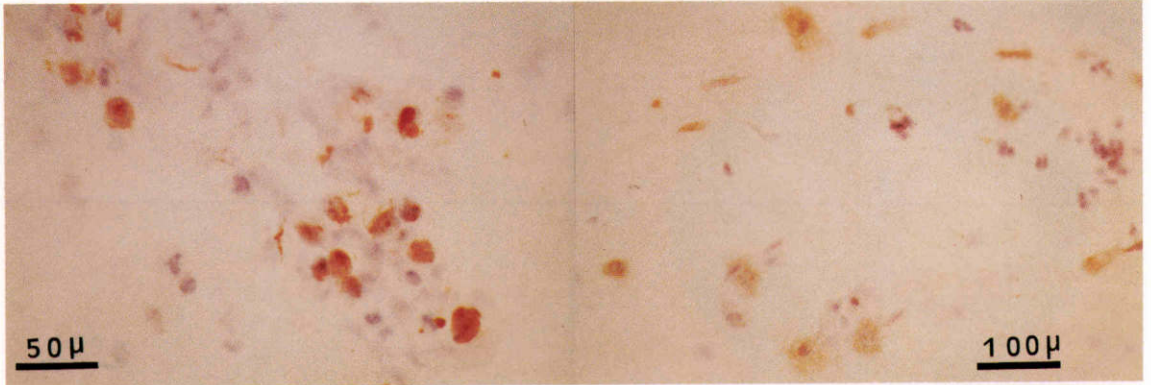


図13 アデノウイルス結膜炎の下瞼結膜 impression 標本, PAP 染色, ウイルス抗原は赤褐色 ( $\times 214$ )

図14 アデノウイルス結膜炎の球結膜 impression 標本, PAP 染色, 抗原陽性細胞は溶解変性 ( $\times 107$ )

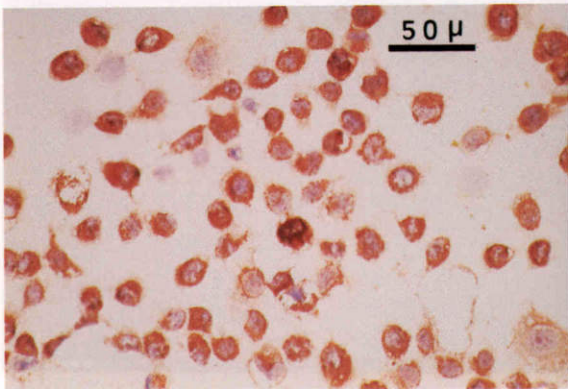


図15 EV70接種 8 時間の HeLa 細胞, ABC 染色, 細胞質が赤褐色 (ウイルス抗原) ( $\times 214$ )

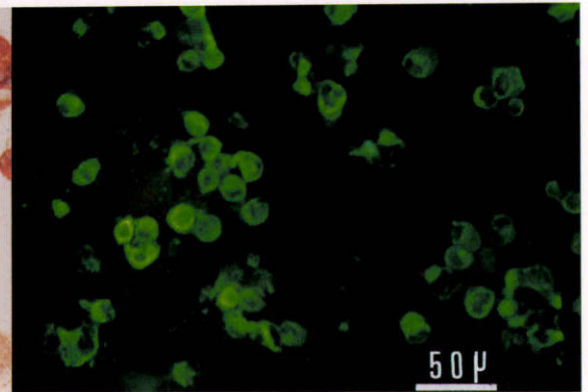


図16 CA24v 接種 8 時間の HeLa 細胞, 間接免疫蛍光法, 細胞質に蛍光 (ウイルス抗原) ( $\times 214$ )

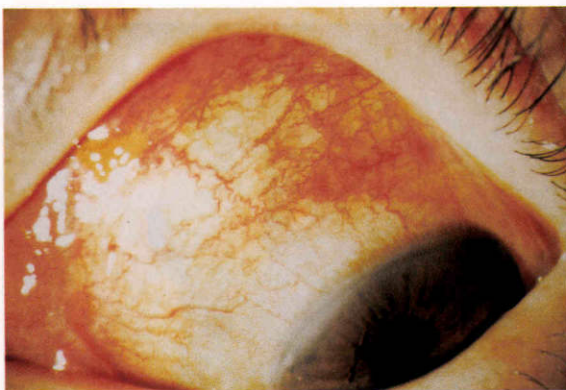


図17 EV70急性出血性結膜炎 (AHC) 所見

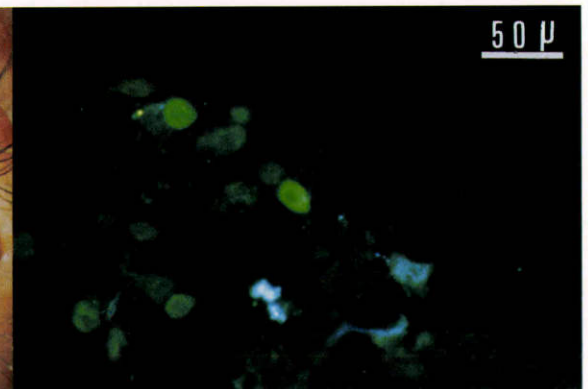


図18 EV70 AHC 結膜擦過物の免疫蛍光法, 細胞質にウイルス抗原, 黄緑色は特異蛍光, 白~青白色は非特異蛍光 ( $\times 214$ )

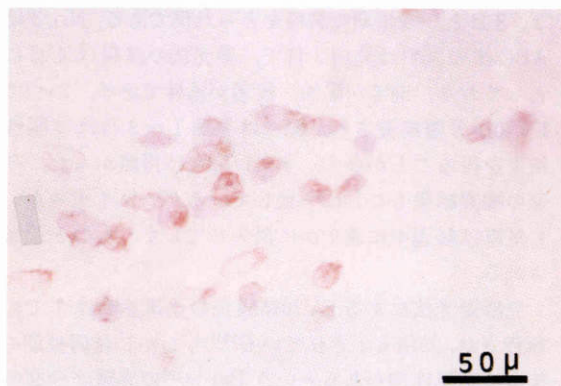


図19 EV70 AHC 球結膜 impression 標本, ABC 染色, 細胞質にウイルス抗原 ( $\times 214$ )

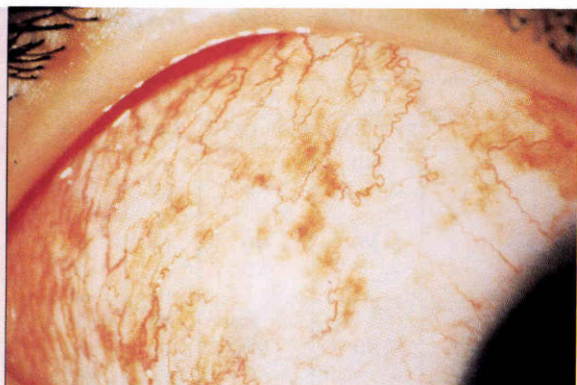


図20 CA24v が分離された患者家族の結膜炎所見

期血清を材料とした免疫蛍光法直接法によって、角結膜擦過物をしらべて報告した。結膜では2週にわたり抗原陽性細胞が認められ、陽性率は第1週に高く、第2週では低かったが、通して約50%という結果であった。Ellisonら<sup>29)</sup>は彼らのAdv 3型結膜接種実験において蛍光抗体法の検出率が低かったことから、著者らの判定に over reading があろうとした。著者らの研究では分離培養を併用しなかったのが弱点であったが、今回の成績からみると当時の結果も大きな誤りはないと考えている。Schwartzらはウサギ抗Adv抗体を用いてEKC全例に特異蛍光を認めたことを報告し、著者らを支持する結果を示している<sup>30)31)</sup>。

今回の成績では3型の検出率が33%と極端に低く、これが全体の平均検出率を低下させている。使用した一次抗体はCambridge Medical Diagnosis社のものであるが、Adv共通抗原の抗体とのことである。しかし作成に用いたAdvの型によって検出率に差が起ったのか、今後の検討を要する。とにかく感度が69%と充分でないが、迅速病因診断法としては利用する価値はあると考えられる。なおimpression cytologyによる検出率は睑結膜よりも球結膜の方がすぐれていた。球結膜では眼脂や粘液などによって観察が妨げられることが少ないのも原因と思われる。電顕によるAdv粒子検出にも球結膜が適するというのと相通じているようである<sup>3)</sup>。

今回の分離された型は3, 4, 8, 37, であった。厚生省の微生物検出情報<sup>32)</sup>では1988~89年に角結膜炎患者の眼ぬぐい液から検出されたAdvの型と年齢を示している。数の多い順では3, 8, 19, 4, 37, 11,

である。3型は0~9歳に多く、その他の型は年齢による偏りは少ない。著者らの成績では19型がないことを除くと傾向は検出情報に近いといえることができる。

## VI 急性出血性結膜炎

### 1. HeLa細胞における抗原の検出

現在、急性出血性結膜炎 (acute hemorrhagic conjunctivitis, AHC) の病因ウイルスにはエンテロウイルス70型 (EV70) とコクサッキーウイルスA24型変異株 (CA24v) の二種がある。国立予防衛生研究所、山崎、宮村両博士の協力によって、それぞれのウイルスに高い抗体価を有するモルモット免疫血清を使用することができた。HeLa細胞にウイルスを接種して8時間後アセトンで固定、乾燥してコントロールスライドを作った。これに上記血清の希釈液を一次抗体として反応させ、さらにVectastain®のABC Kit、または蛍光標識ヤギ抗モルモットIgG抗体を用いた。酵素抗体法でも免疫蛍光法でも、ウイルス抗原はいずれも細胞質内に観察された (図15, 16)。

### 2. 症例と結果

症例1 61歳、男性。

糖尿病性網膜症で通院中のところ初め左眼に、次いで翌日右眼に結膜炎症状を起した。結膜充血、結膜浮腫があり、上皮性角膜炎を生じた。球結膜下出血が認められた (図17)。耳前リンパ節の腫脹、圧痛はない。発病3日目に左眼結膜から擦過物を取り、免疫蛍光法を行ったところ、EV70の特異蛍光を放つ細胞が観察された。蛍光すなわちウイルス抗原は細胞質中に認められた (図18)。結膜ぬぐい液からのウイルス分離は陰性

表5 急性出血性結膜炎におけるウイルス分離、抗原、抗体の検索結果

症例	ウイルス分離	I F		A B C		EV70血清中和抗体価	
		EV70	CA24v	EV70	CA24v	急性期	回復期
1	-		ND	-	-	4>	128
2	-	-	-		ND	4>	8
3	-	-	-	+	-	4	8
4	-		ND		ND	4>	16
5	-	+	-		ND	4>	16
6	-	-	-	-	-	4>	64
7	-	-	-	-	-	ND	128
8	-		ND		ND	4>	32
9	-	+	-	-	-	4>	128
10	-	+	-	-	-	4	ND
I'	CA24v		ND		ND	ND	4>

IF: 免疫蛍光法, ND: 未施行

であった。

症例2. 63歳, 男性。

左眼の血管新生緑内障で通院中, 初め右眼に, 次いで翌日左眼に結膜炎症状を起こした。汙胞は軽度であったが, 上皮性角膜炎は著明で, 眼痛を伴った。発病2日目の右眼の球結膜のimpression標本にABC法でEV70抗原陽性の細胞が観察された。抗原は細胞質中に認められた(図19)。

症例3. 15歳, 男性。

右眼ついで翌日, 左眼に眼脂, 眼痛が起こり受診した。結膜充血, 軽い汙胞, 球結膜下出血がみられた(図20)。この患者の父親が次の日右眼, さらにその翌日左眼に同様症状が発現して受診, 右眼の結膜ぬぐい液からCA24vが分離された。

AHC患者11名の検査成績をまとめて表5に示した。1989年11月に小規模なAHCの院内発生があったが主としてその症例である。上の10はEV70によると診断した例であり, 下の1はCA24vが分離された例である。上の10例では抗EV70の血清中和抗体価が急性期に比べ回復期で4倍以上の上昇を示したのは7例である。No.7は急性期がとってないが, 回復期128という高値からEV70感染といえる。No.3はABC法が, またNo.10は免疫蛍光法が陽性であることから判定した。10例すべてにおいてEV70の分離培養は陰性である。近年EV70は分離培養が困難となりわが国では1985年以降新たに分離された株はない。したがって現在, 確定診断は血清反応によっている。

### 3. 考按

免疫蛍光法, 酵素抗体法の陽性例は, いずれも発病

2, 3日という早期に試料をとった例である。No.3はABC法の試料は発病2日で, 蛍光法の試料は4日にとっており, 前者が陽性, 後者が陰性である。かつてEV70が分離培養された際には発病1~3日には陽性結果を得ることが多く, 4日以降では得難かった。今回の検索結果もこれに一致しているが, ウイルスなし抗原は経過中に速やかに消失してしまうものと想像される。

免疫蛍光法によるEV70結膜炎の迅速診断はすでに報告され, 効用も示されている<sup>33)34)</sup>。しかし発病長期の後も抗原陽性例があるというPalら<sup>33)</sup>の成績は今回のものと大きく異なっている。今回, 間接法によって発病1~3日の初期に行えば診断的価値が高いことを認めた。培養困難なEV70においては, 抗原が証明できることはより意義があることと考えられる。Impression標本にABC法を施しても同様に抗原が証明できることがわかったが, 今後球結膜を採取場所としてさらに検討を加えてみたい。CA24vの免疫蛍光法, ABC法は臨床例に試みる機会がまだないが, EV70の場合と同様の価値をもつと思われる。

EV70によるAHCが1969年ガーナに出現<sup>35)</sup>して以来, 70~71年に世界的な大流行を起こし, 第一次pandemyと呼ばれる。この時のわが国での流行においてEV70が分離されて病原性が確立し<sup>36)</sup>、以来このウイルスに関してはわが国の研究が中心をなして来た。1980~81年には第二次pandemyがあり, それまで経験されなかった西半球に及び, 南米, 中米からカリブ海沿岸諸国, 合衆国の一部まで流行にまきこまれた。フロリダでは西半球で初めてのEV70株が分離されている<sup>37)</sup>。

EV70によるAHCの症状はわが国では大流行時に比べ軽くなったといわれる。しかし今回の10例については結膜下出血90%, 上皮性角膜炎100%, 汙胞90%, などと少数ではあるが(表6), これら出現率は著者が1971~72年に経験したものとほとんど変わらない<sup>38)</sup>。またこの数値は1981年米国での流行の報告によく似ている<sup>39)</sup>。症状, 所見の出現度は病院を受診した個々の症例の集計か, 疫学的調査か, 等によって異なると思われる。とにかく出現から20年経った今日でも眼の臨床症状は本質的にあまり変わっていないのではないかという印象を受ける。

CA24vは1970年シンガポールで流行した結膜炎の病原ウイルスである<sup>40)</sup>。その後世界に広まる傾向が少なく, 東南アジア諸国で流行の発生をくり返していた。

表6 EV70によるAHC患者の臨床所見発現度  
(例数 10)

所見	陽性例数	%
眼瞼腫脹	7	70
球結膜下出血	9	90
上皮性角膜炎	10	100
濾胞	9	90
耳前腺腫脹	7	70
偽膜	0	0
上皮下浸潤	0	0
虹彩毛様体炎	0	0
上気道炎	0	0
倦怠感・頭痛	0	0

ところが1985年7～11月、1986年8～10月の2回、沖縄県下に結膜炎の大流行があり、多数のCA24v株が分離された<sup>41)</sup>。同時期に台湾でも流行があった<sup>42)43)</sup>。この結膜炎はわが国本土では大流行は起こしていない。しかし今回私達が外来患者の中に経験した父子例からわかるように、CA24vは既に本土に侵入して散発例を生じている。

#### 文 献

- 1) Darrell WD: Introduction (Taxonomie of viruses), in Darrell WD (ed): *Viral Diseases of the Eye*, Philadelphia, Lea & Febiger 1-5, 1985.
- 2) Rao NA: A laboratory approach to rapid diagnosis of ocular infection and prospect for the future. *Am J Ophthalmol* 107: 283-291, 1989.
- 3) 瀬川雄三: 外眼部感染症の迅速診断—ネガテヴ染色. *眼臨* 81: 2590-2595, 1987.
- 4) 林 福子: 帯状ヘルペス角膜炎の研究—角膜上皮擦過物からのウイルス粒子の検出. *日眼会誌* 79: 1542-1549, 1975.
- 5) Hershenfeld S, Kazdanz JJ, Mancor K, et al: Impression cytology in conjunctivitis. *Canad J Ophthalmol* 16: 76-78, 1981.
- 6) 大路正人, 切通 彰, 木下 茂, 他: 臨床検査としての impression cytology とその角結膜疾患への応用. *臨眼* 40: 209-212, 1986.
- 7) 瀬口次郎: メンブレンフィルター法を用いた結膜上皮細胞の立体的観察. 第1報. 正常眼における検討. *眼紀* 39: 558-566, 1988.
- 8) Gerhardt BM, Reidy J, Kaufman HE: An affinity membrane test for superficial corneal herpes. *Am J Ophthalmol* 105: 686-687, 1988.
- 9) 中川 尚, 佐々木淳子, 中川裕子, 他: Blotting filter paper を用いた樹枝状潰瘍からのヘルペスウイルス抗原の検出. *あたらしい眼科* 7: 303-305, 1990.
- 10) Herbolt CP, Perentes E, Matter M: Rapid diagnosis of herpetic infection by immunoperoxidase method. *Ophthalmologica* 191: 95-101, 1985.
- 11) 内田幸男: 角膜ヘルペス—主として診断的立場から. *日眼会誌* 76: 1391-1413, 1972.
- 12) Pavan-Langston D, McCulley JP: Herpes zoster dendritic keratitis. *Arch Ophthalmol* 89: 25-29, 1973.
- 13) Piebenga LW, Laibson PR: Dendritic lesions in herpes zoster ophthalmicus. *Arch Ophthalmol* 90: 268-270, 1973.
- 14) Hayashi K, Uchida Y, Ohshima M: Fluorescent antibody study of herpes zoster keratitis. *Am J Ophthalmol* 75: 795-798, 1973.
- 15) 内田幸男, 亀山和子, 金子行子, 他: 帯状ヘルペス角膜炎の病像について. *日眼会誌* 78: 1073-1078, 1974.
- 16) Marsh RJ, Fraunfelder FT, McGill JI: Herpetic corneal epithelial disease. *Arch Ophthalmol* 94: 1899-1902, 1976.
- 17) Uchida Y, Kaneko M, Onishi Y: Ophthalmic herpes zoster without eruption. *Acta 24th International Congress of Ophthalmol, Philadelphia, Lippincott* 876-879, 1982.
- 18) 笠置裕子, 高村悦子, 内田幸男: Zoster sine herpette による眼圧上昇を伴った角膜虹彩炎の1例. *眼臨* 79: 1533-1536, 1985.
- 19) Lewis GW: Zoster sine herpette. *Brit Med J* 2: 418-421, 1958.
- 20) Nesburn AB, Borit A, Pentelei-Molnar J, et al: Varicella dendritic keratitis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 13: 764-770, 1974.
- 21) Uchida Y, Kaneko M, Hayashi K: Varicella dendritic keratitis. *Am J Ophthalmol* 89: 259-262, 1980.
- 22) 青木功喜: アデノウイルス結膜炎の病因と臨床像. *眼科* 29: 123-128, 1987.
- 23) 風見由花子, 鈴木真理, 風見宣生, 他: 院内発生を主としたアデノウイルス8型流行性角結膜炎の臨床像. *眼臨* 83: 212-215, 1989.
- 24) 青木功喜: ウイルス性結膜炎の迅速診断. *臨眼* 42: 1306-1311, 1988.
- 25) 青木功喜, 沢田春美: 眼科領域におけるアデノウイルス感染症の迅速診断. 酵素抗体法と蛍光抗体法. *日眼会誌* 93: 865-869, 1989.
- 26) 岡本茂樹, 斎藤喜博, 吳 雅美, 他: ELISA によるアデノウイルス結膜炎の診断. *眼紀* 40: 1707-1711, 1989.
- 27) Wiley L, Springer D, Kowalski RP, et al: Rapid diagnostic test for ocular adenovirus. *Ophthalmology* 95: 431-433, 1988.

- 28) **Uchida Y, Inoue S**: Fluorescent antibody studies of epidemic keratoconjunctivitis. *Tokushima J Exp Med* 14: 13—17, 1967.
- 29) **Ellison ED, Kaufman HE, Little JM**: Comparison of methods for the laboratory diagnosis of ocular adenovirus type 3 infection. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 8: 484—487, 1969.
- 30) **Schwartz HS, Vastine DW, Yamashiroya HM**, et al: Immunofluorescent detection of adenovirus antigen in epidemic keratoconjunctivitis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 15: 199—207, 1976.
- 31) **Vastine DW, Schwartz HS, Yamashiroya HM**, et al: Cytologic diagnosis of adenoviral epidemic keratoconjunctivitis by direct immunofluorescence. *Invest Ophthalmol Visual Sci* 16: 195—200, 1977.
- 32) 病原微生物検出情報: 11(3), 1990.
- 33) **Pal SR, Szucs GY, Melnick JL**: Rapid immunofluorescence diagnosis of acute hemorrhagic conjunctivitis. *Intervirolgy* 20: 19—22, 1983.
- 34) **Gangwar DN, Grewal SPS, Jain IS**, et al: Enterovirus 70 acute hemorrhagic conjunctivitis—sporadic cases. *Jpn J Ophthalmol* 28: 183—188, 1984.
- 35) **Chatterjee S, Quarcoopome CO, Apenteng A**: Unusual type of epidemic conjunctivitis in Ghana. *Brit J Ophthalmol* 54: 628—630, 1970.
- 36) **Kono R, Sasagawa A, Ishii K**, et al: Pandemic of new type of conjunctivitis. *Lancet* 1: 1191—1194, 1972.
- 37) **Patriarca PA, Onorato IM, Sklar VEF**, et al: Acute hemorrhagic conjunctivitis. *JAMA* 249: 1283—1289, 1983.
- 38) **Uchida Y**: Clinical features of acute hemorrhagic conjunctivitis due to enterovirus 70, in Ishii K, et al (ed): *Acute Hemorrhagic Conjunctivitis*, Tokyo, University of Tokyo Press 213—223, 1989.
- 39) **Sklar VEF, Patriarca PA, Onorato IM**, et al: Clinical findings and results of treatment in an outbreak of acute hemorrhagic conjunctivitis in Southern Florida. *Am J Ophthalmol* 95: 45—54, 1983.
- 40) **Lim KH, Yin-Murphy M**: Epidemic conjunctivitis in Singapore in 1970 and 1971. *Singapore Med J* 14: 86—89, 1973.
- 41) **Miyamura K, Yamashita K, Takeda N**, et al: The first epidemic of acute hemorrhagic conjunctivitis due to a coxsackievirus A 24 variant in Okinawa, Japan in 1985—1986. *Jpn J Med Sci Biol* 41: 159—174, 1988.
- 42) 青木功喜, 沢田春美, 石川秀夫, 他: 日本と台湾におけるコクサッキーウイルス A24型による急性出血性結膜炎の流行. *臨眼* 41: 755—758, 1987.
- 43) **Chen CW, Huang W-L, Hsie Y-F**: Clinical feature of CA 24<sub>v</sub> acute hemorrhagic conjunctivitis, in Ishii K, et al (ed): *Acute Hemorrhagic Conjunctivitis*. Tokyo, University of Tokyo Press 225—234, 1989.