

MTT 法を用いたアデノウイルスに対する抗ウイルス薬の検討

金子 久俊¹⁾, 藤原 聡之¹⁾, 森 修一²⁾, 茂田 士郎²⁾

¹⁾福島県立医科大学医学部眼科学教室, ²⁾福島県立医科大学医学部微生物学教室

要 約

目 的: アデノウイルス(ADV)結膜炎に対して, 現在のところ有効な治療法はない。今回, 我々は4種類の抗ウイルス薬の ADV に対する増殖抑制効果を検討した。

方 法: ウイルスは ADV 4, 8, 37 型を, 抗ウイルス薬はシドフォビル(cidofovir, HPMPC), ザルシタビン(zalcitabine, ddC), ホスカルネット(foscarnet, PFA), アシクロビル(acyclovir, ACV)を用いた。3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide method (MTT 法)により, HEp-2 細胞における ADV の 50% effective concentration (EC₅₀), 50% cytotoxic concentration (CC₅₀) および selectivity index (SI) を決定した。

結 果: HPMPC, ddC において, ADV に対する増殖抑制効果があり, ddC の方が抑制効果が高かった。PFA, ACV は ADV に対する増殖抑制効果はなかった。

結 論: HPMPC, ddC において ADV 4, 8, 37 型に対する抗ウイルス効果があった。MTT 法は, 抗ウイルス薬のスクリーニング法として迅速かつ簡便であり, ADV に対しても大変有用であることがわかった。(日眼会誌 104: 786—791, 2000)

キーワード: アデノウイルス, アデノウイルス結膜炎, シドフォビル, ザルシタビン, MTT 法

Evaluation of Antiviral Agents for Adenovirus Using the MTT Method *In Vitro*

Hisatoshi Kaneko¹⁾, Toshiyuki Fujiwara¹⁾, Shuichi Mori²⁾ and Shiro Shigeta²⁾

¹⁾Department of Ophthalmology, Fukushima Medical University School of Medicine

²⁾Department of Microbiology, Fukushima Medical University School of Medicine

Abstract

Purpose: Currently, there is no effective treatment for adenoviral conjunctivitis. We evaluated the antiviral inhibitory effect of four antiviral agents against adenovirus (ADV) *in vitro*.

Methods: Viruses used for the experiment were ADV type 4 (ADV 4), type 8 (ADV 8) and type 37 (ADV 37). We examined four antiviral agents, i.e., cidofovir (HPMPC), zalcitabine (ddC), foscarnet (PFA), and acyclovir (ACV). 50% effective concentration (EC₅₀), 50% cytotoxic concentration (CC₅₀) and selectivity index (SI) of compounds were determined for ADV infection in HEp-2 cells using the 3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) method.

Results: HPMPC and ddC showed an inhibitory effect against all three ADVs. In particular, ddC showed more potent and selective inhibition against ADV than HPMPC. PFA and ACV were ineffective against ADV.

Conclusions: HPMPC and ddC were inhibitory against ADV 4, ADV 8 and ADV 37 replication *in vitro*. The MTT method is rapid and simple for the screening of antiviral agents. We think this method is also very useful for the screening of anti-ADV agents. (J Jpn Ophthalmol Soc 104: 786—791, 2000)

Key words: Adenovirus, Adenoviral conjunctivitis, Cidofovir, Zalcitabine, MTT method

I 緒 言

流行性角結膜炎, 咽頭結膜熱といったアデノウイルス

(ADV)結膜炎は, 日常よくみられる感染力の強い伝染性疾患である。治療は対症療法のみであるが, 多くの場合は自然治癒するため, ADV 結膜炎に対する有効な抗ウイ

別刷請求先: 960-1295 福島市光が丘 1 福島県立医科大学医学部眼科学教室 金子 久俊
(平成 12 年 2 月 2 日受付, 平成 12 年 5 月 10 日改訂受理)

Reprint requests to: Hisatoshi Kaneko, M.D. Department of Ophthalmology, Fukushima Medical University School of Medicine, 1 Hikarigaoka, Fukushima 960-1295, Japan

(Received February 2, 2000 and accepted in revised form May 10, 2000)

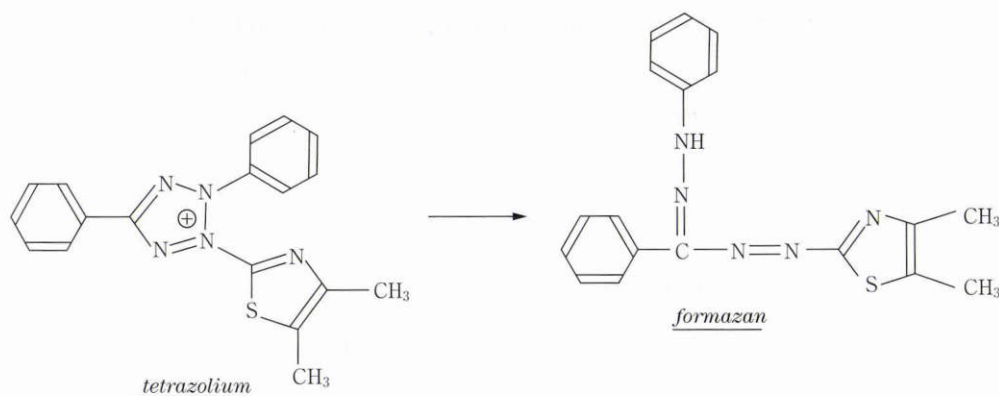


図 1 MTT から formazan への変化.

ルス薬は、これまで積極的に研究、開発はなされていなかった。近年、ADV に増殖抑制効果のある薬剤について、多数報告されてきてはいるものの^{1)~9)}、現在まで臨床使用に至ったものはない。しかしながら、シドフォビル (cidofovir, (S)-1-[3-hydroxy-(2-phosphonylmethoxypropyl) cysteine], HPMPC) は、*in vitro*; *in vivo* 両者においての有効性が報告^{2)4)6)~11)}されており、ADV 結膜炎の治療薬として、現在最も期待されている薬剤であると考えられている。また、ザルシタピン (zalcitabine, 2,3-dideoxycytidine, ddC) は、後天性免疫不全症候群 (acquired immunodeficiency syndrome, AIDS) の治療薬として知られているが、*in vitro* において、ADV に対する増殖抑制効果の報告⁵⁾がある。

一方、ADV の薬剤感受性試験として、これまでは主にプラーク減少法で行われてきた。しかし、プラーク減少法は、ウイルスの細胞への吸着、未吸着ウイルスの洗浄除去、プラークの染色・計測といった多数の操作があるため大変煩雑であり、プラークの判定には熟練を要し、さらに、判定までに 2 週間程度を要するという問題点がある。これに対し、3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide method (MTT 法)^{12)~17)}は形成された formazan (不溶性の着色化合物) の吸光度を測定することにより抑制効果を判定するものであるが、操作が簡便で判定に客観性があり、比較的短期間での判定が可能である。

今回、我々は HPMPC, ddC と、眼科領域で使用頻度の高い抗ヘルペスウイルス薬である、ホスカルネット (foscarnet, phosphonofornic acid, PFA), アシクロビル (acyclovir, 9-(2-hydroxyethoxymethyl) guanine, ACV) を加えた計 4 種類の抗ウイルス薬の ADV に対する *in vitro* での増殖抑制効果について、MTT 法とプラーク減少法の簡便法である 50% tissue culture infective dose method (TCID₅₀) 法を用いて検討したので報告する。

II 実験方法

1. 材 料

1) 細胞とウイルス

培養細胞は、ヒト喉頭癌細胞 (HEp-2 細胞) を用いた。また、増殖培地には 8% ウシ胎児血清加イーグル minimum essential medium (MEM) 培地 (日水製薬)、維持培地には 2% ウシ胎児血清加イーグル MEM 培地を用いた。ADV は国立感染症研究所から分与された標準分離株の ADV 4, 8, 37 型を用いた。これらのウイルス株は、HEp-2 細胞で継代した後、凍結融解を 3 回行い、4°C、3,000 回転、10 分間遠心し、その上清をウイルス液として使用した。

2) 薬剤

用いた抗ウイルス薬は、HPMPC, ddC, PFA, ACV の 4 種類である。HPMPC は Gilead Scientific 社から、ddC, PFA および ACV は SIGMA 社から入手した。

2. 方 法

96 穴平底マルチウェルプレートに単層形成した HEp-2 細胞の増殖培地を除去し、ウイルス感染細胞の well を作製するため、維持培地で 100 μg/ml から 5 倍階段希釈した薬剤 100 μl と 100 TCID₅₀ のウイルス 100 μl をそれぞれの well に加えた。薬剤の 1 希釈につき、各 6 well の細胞を使用した。次に、ウイルス非感染細胞の well を作製するため、薬剤 100 μl とウイルスの代わりに維持培地のみ 100 μl を加え、35°C、5% CO₂ 下で 7 日間培養し、TCID₅₀ 法および MTT 法で各薬剤の抗ウイルス効果を判定した。

1) TCID₅₀ 法

ウイルス感染 7 日後にプレートを取り出し、well 中の細胞に出現する ADV 特有の cytopathic effect (CPE, 細胞変性効果) 発現を観察した。薬剤の各希釈毎に 6 well ずつ観察し、CPE 陽性の well 数の割合を表示した。CPE が発現した well の割合を縦軸に、薬剤の濃度を横軸 (log₁₀ 表示) にしてグラフを描き、その 50% を示す薬剤の濃度を 50% effective concentration (EC₅₀, ウイルスの発現を

表1 アデノウイルス (ADV) に対する薬剤の抑制効果 (MTT 法)

薬剤	EC ₅₀ (μg/ml)			CC ₅₀ (μg/ml)
	ADV4	ADV8	ADV37	
HPMPC	8.86 ± 1.87*	7.50 ± 3.51	4.61 ± 1.92	184.8 ± 10.5
ddC	4.29 ± 1.13	4.00 ± 1.62	3.82 ± 1.49	381.9 ± 15.6
PFA	> 100	> 100	> 100	> 500
ACV	> 100	> 100	> 100	> 500

EC₅₀: 50% effective concentration, CC₅₀: 50% cytotoxic concentration, HPMPC: (S)-1-[3-hydroxy-(2-phosphonomethoxypropyl)cysteinyl]cidofovir, ddC: 2,3-dideoxycytidine, zalcitabine, PFA: phosphonoforsmic acid, foscarnet, ACV: 9-(2-hydroxyethoxymethyl)guanine, acycrovir

*: 平均値 ± 標準偏差

表2 ADV に対する HPMPC, ddC の selectivity index (SI)

薬剤	SI		
	ADV4	ADV8	ADV37
HPMPC	20.8	24.6	40.0
ddC	89.0	95.4	99.9

50% 抑制する薬剤濃度)とした。なお、同一ウイルスに対し5回実施し、その平均を EC₅₀ とした。

2) MTT 法

MTT は黄色い水溶性の物質で、生細胞のミトコンドリア内のみ存在する酵素によって formazan へと変化する(図1)。薬剤のウイルス増殖抑制効果が強い場合は、生細胞の数が多く、したがって、formazan 形成量が多くなり、ウイルス増殖抑制効果が弱い場合は、生細胞が死滅して formazan 形成量も少なくなる。つまり、formazan 形成量と生細胞数とは比例関係にある。

実際の方法は、プレートの各 well に MTT 液 (7.5 mg/ml) を 20 μl ずつ加え、35°C、5% CO₂ 下で3時間培養すると formazan が形成される。次に、その上清 100 μl を除去し、formazan を溶解するための可溶化液(10% トリトン X を酸性イソプロパノールに溶解したもの) 100 μl を加え、室温に24時間放置する。放置後、プレートを最低15分間攪拌し、各 well の吸光度(optical density, OD)を 540 nm および 690 nm の二波長測定し、さらに、その吸光度差を測定する。Formazan 形成量が多いほど吸光度は上がり、formazan 形成量が少ないと吸光度は下がる。その吸光度差の値から EC₅₀、50% cytotoxic concentration (CC₅₀、宿主細胞の増殖を50%抑制する薬剤濃度)、selectivity index (SI、選択阻害指数)を求めた。なお、TCID₅₀ 法と同様に同一ウイルスに対し5回実施し、その平均を EC₅₀、CC₅₀ とした。EC₅₀ の測定は次の式によった。

$$\frac{(OD_T)_V - (OD_C)_V}{(OD_C)_M - (OD_C)_V} \times 100 (\%)$$

ここで、(OD_T)_V、(OD_C)_V、(OD_C)_M はそれぞれ ADV 感染を受け薬剤による治療を受けている細胞、ADV 感染を受け薬剤による治療をされていない細胞、ADV 感染

も薬剤の投与も受けていない細胞による吸光度を示す。この式で50%を示す薬剤の濃度を EC₅₀ として表した。

III 結 果

1. MTT 法による抗 ADV 活性の測定結果

HPMPC, ddC は、3種類すべての ADV について増殖抑制効果を示した。EC₅₀ は、HPMPC が 4.61~8.86 μg/ml、ddC が 3.82~4.29 μg/ml で、ddC の方がより低濃度でウイルスの増殖を抑制していた。したがって、HPMPC と比較し、ddC に高い抗ウイルス効果があった。PFA, ACV は、EC₅₀ がすべて 100 μg/ml 以上であり、ADV の増殖抑制効果がなかった。CC₅₀ は、HPMPC が 184.8 μg/ml、ddC が 381.9 μg/ml で、ddC の方が宿主細胞に対する毒性が弱かった(表1)。SI は、3種類すべての ADV で、ddC が HPMPC よりも高値であった。この結果は、ddC がより選択的に ADV の抑制効果が強く、薬剤としての安全性が高いということを示す(表2)。

2. MTT 法と TCID₅₀ 法による EC₅₀ 値の比較

TCID₅₀ 法による EC₅₀ は、HPMPC が 2.90~4.45 μg/ml、ddC が 1.24~1.91 μg/ml であり、3種の ADV に対する EC₅₀ の平均値では TCID₅₀ 法により MTT 法の約 1/2 の値が得られ、感度は TCID₅₀ 法の方が優っていた。PFA, ACV の EC₅₀ の値は TCID₅₀ 法によってもすべてのウイルスで 100 μg/ml 以上であった。したがって、TCID₅₀ 法では MTT 法と同様に、HPMPC, ddC は ADV に対する増殖抑制効果があり、PFA, ACV は ADV の増殖抑制効果がないことが確認された(表3)。

IV 考 按

MTT 法は、抗癌剤のスクリーニング法として利用されてきた¹²⁾。抗ウイルス薬の感受性試験としては、1988 年に Pauwels ら¹³⁾ が human immunodeficiency virus (HIV) について報告した。その後、単純ヘルペスウイルス (HSV) についても判定可能であると報告^{14)~16)}され、その他のウイルスについても検討された¹⁷⁾¹⁸⁾。ADV については Kodama ら⁴⁾ が、1996 年に ADV 11 型について MTT 法が有用であると報告しているのみである。今回、我々は

表 3 MTT 法と TCID₅₀ 法による ADV に対する EC₅₀ の比較

薬剤		EC ₅₀ (μg/ml)			
		ADV4	ADV8	ADV37	平均
HPMPC	MTT 法	8.86 ± 1.87 *	7.50 ± 3.51	64.1 ± 1.92	6.99
	TCID ₅₀ 法	4.45 ± 2.01	2.95 ± 1.45	2.90 ± 1.26	3.43
ddC	MTT 法	4.29 ± 1.13	4.00 ± 1.62	3.82 ± 1.49	4.40
	TCID ₅₀ 法	1.91 ± 0.80	1.89 ± 0.40	1.24 ± 0.40	1.68

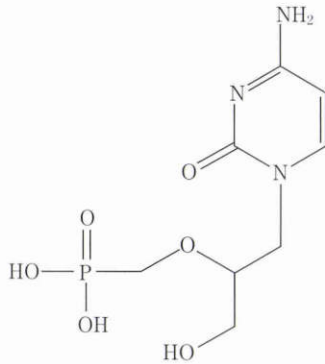
TCID₅₀: 50% tissue culture infective dose method * : 平均値 ± 標準偏差

図 2 (S)-1-[3-hydroxy-(2-phosphonomethoxypropyl)cysteine] (HPMPC) の構造式.

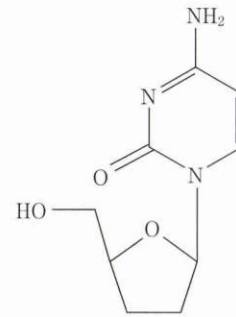


図 3 2,3-dideoxycytidine (ddC) の構造式.

ADV 4, 8, 37 型に対しても MTT 法による判定が可能であることを証明した。

もともと、抗ウイルス薬の薬剤感受性試験は CPE の一種であるプラークを形成させ、そのプラーク数を計測することで EC₅₀ を求めるプラーク減少法で行われていた。しかし、プラーク減少法は操作が大変煩雑で、プラーク形成までに 2 週間程度かかってしまうという欠点がある。さらに、多数のプラーク数を計測するため、測定者の主観が入りやすく、プラーク数が一定せず誤差が生じやすい。また、測定にはかなりの経験、熟練を必要とする。一方、MTT 法はプラーク減少法と比べて、操作が簡便で判定までの期間が短い。そのため、一度に多数のサンプルの判定も可能である。また、器械で吸光度を測定するために客観的な判定となり、再現性も高い。MTT 法には、判定不可能なウイルスがいくつかあり、また吸光度の測定機器などの特殊機器が必要になるという問題点もある。しかし、簡便さ、多数のサンプルが同時に判定可能という点から、MTT 法は圧倒的にプラーク減少法よりも有用であると考えられる。今回の実験ではプラーク減少法の簡便法である TCID₅₀ 法と MTT 法により抗 ADV 活性の比較をしたところ、EC₅₀ 値にやや差があった。TCID₅₀ 法による EC₅₀ 値が MTT 法による EC₅₀ 値より低く出る理由は不明であるが、おそらくは顕微鏡下の観察ではよく確認し得ない細胞死を MTT 法では敏感にとらえるので、ウイルス増殖抑制効果が低く、したがって、EC₅₀ 値が高くなるのであろうと考える。

以上のように、MTT 法および TCID₅₀ 法を用いて我々

は ADV 4, 8, 37 型について検討したところ、HPMPC、ddC においてウイルスの増殖抑制効果を示した。両者とも、3 種の血清型の間で、増殖抑制効果に差がでている。この理由は、我々の報告では明確にはできないが、ADV 4 型は E 亜属であるのに対し、ADV 8, 37 型は D 亜属と異なっていること、それぞれの血清型の感受性の違い、薬剤の ADV への作用機序や感受性の違いなどが考えられる。抗 HSV 剤の ACV、抗サイトメガロウイルス (CMV) 剤の PFA は、細胞毒性は弱いものの ADV に対する増殖抑制効果はなかった。

HPMPC (図 2) は、ヌクレオシドアナログであるシチジンの誘導体である。抗 CMV 剤として欧米では既に臨床使用されており、CMV の DNA ポリメラーゼ活性を阻害することが知られている¹⁹⁾²⁰⁾。その他、HSV などの DNA ウイルスにも有効とされている²¹⁾。HPMPC の抗 ADV 効果については、*in vitro* においては多数の報告^{2)4)6)~9)}があり、既に有効性はわかっている。*In vivo* においても、ADV 5 型を感染させたウサギ実験モデルに HPMPC を点眼することで、結膜擦過物の ADV の感染価が低下したとの報告¹⁰⁾¹¹⁾がある。その一方で、ステロイド薬との併用で作用減弱したという動物実験モデルでの報告²²⁾や、*in vitro* で培養継代を繰り返したところ耐性株が出現した²³⁾との報告もされているが、今後、臨床応用されるにあたり問題にはならないと考えられる。

ddC (図 3) もまた、シチジン誘導体である。ddC は、既に抗 HIV 剤の逆転写酵素阻害剤として使用されている^{24)~32)}。しかし、ADV については、Mentel ら⁵⁾が *in vitro* において、ADV 2, 3 型の抗ウイルス効果を報告しているのみである。今回の我々の報告では、ddC は HPMPC

よりも低濃度での抗ウイルス効果を示し、細胞毒性も低く、*in vitro* における薬剤としての安全性が高かった。また、HIV 感染者における ddC の全身投与後の血中濃度や尿中排泄量といった体内動態の検討では、ddC は速やかに吸収され、24 時間以内にほとんどが尿中から排泄されるという全身投与での安全性も報告²⁷⁾²⁸⁾³¹⁾されている。今後、抗 ADV 薬としての臨床使用へ向けて期待できる薬剤と考える。

HPMPC, ddC とともに核酸誘導体であり、それぞれ CMV, HIV における抗ウイルス効果が知られている。このことから、ADV に対する増殖抑制の作用機序は、DNA ポリメラーゼ活性の阻害ではないかと予想されるが、詳細は現在のところは不明である。また、HPMPC と ddC の間で EC₅₀, CC₅₀ の値に差が生じている。この理由も明らかではないが、ADV の DNA ポリメラーゼに対する親和性の違いや、HPMPC は既に一リン酸化されているのに対し、ddC は非リン酸化物であるため、細胞内での代謝の違いなどが予想される。今後、さらに、研究が望まれるところである。両薬剤は既に臨床的に使用されているが、長期間の投与により HPMPC では腎機能障害、ddC では肝機能障害が報告されている。しかし、ADV 結膜炎などに局所的に投与することでは、重篤な副作用は起こらないのではないかと考える。

今回、ADV 結膜炎に多い型とされる ADV 4, 8, 37 型の標準分離株について抗ウイルス効果を検討した。今後は、ADV の他の血清型や臨床分離株での検討が必要であると考え。また、MTT 法は迅速かつ簡便な薬剤感受性試験であり、今後、ADV の増殖抑制効果の検討に、おおいに役立つものと考え。これまで ADV に対する抗ウイルス効果を示す薬剤、化合物の報告は多数みられるものの、EC₅₀ が高値であったり、宿主細胞への毒性や副作用などの問題で、これまで臨床使用に至ったものはない。今後、HPMPC, ddC の ADV 結膜炎の点眼薬としての研究、開発が待たれるところである。

稿を終えるに当たり、ご校閲いただきました福島県立医科大学眼科学教室加藤桂一郎教授に深謝いたします。

文 献

- 1) **Baba M, Mori S, Shigeta S, De Clercq E**: Selective inhibitory effect of (S)-9-(3-hydroxy-2-phosphonylmethoxypropyl)adenine and 2'-nor-cyclic-GMP on adenovirus replication *in vitro*. *Antimicrob Agents Chemother* 31: 337-339, 1987.
- 2) **Gordon YJ, Romanowski EG, Araullo-Cruz TP, Seaberg L, Erzurum S, De Clercq E, et al**: Inhibitory effect of (S)-HPMPC, (S)-HPMPA, and 2'-nor-cyclic-GMP on clinical ocular adenoviral isolates is serotype-dependent *in vitro*. *Antiviral Res* 16: 11-16, 1991.
- 3) **Hui MBV, Lien EJ, Trousdale MD**: Inhibition of human adenovirus by 1-(2'-hydroxy-5'-methoxy-

- benzylidene) amino-3-hydroxyguani-dine tosylate. *Antiviral Res* 24: 261-273, 1994.
- 4) **Kodama E, Shigeta S, Suzuki T, De Clercq E**: Application of a gastric cancer cell line (MKN-28) for anti-adenovirus screening using the MTT method. *Antiviral Res* 31: 159-164, 1996.
- 5) **Mentel R, Kinder M, Wegner U, Janta-Lipinski M, Matthes E**: Inhibitory activity of 3'-fluoro-2'-deoxythymidine and related nucleoside analoges against adenovirus *in vitro*. *Antiviral Res* 34: 113-119, 1997.
- 6) **内尾栄一, 大野重昭**: アデノウイルス結膜炎. *眼科* 40: 893-898, 1998.
- 7) **内尾栄一, 青木功喜**: 眼科領域における感染対策. *臨床と研究* 75: 2141-2144, 1998.
- 8) **内尾栄一**: アデノウイルス結膜炎の抗ウイルス薬. *日本眼炎症学会誌* 1: 31-34, 1999.
- 9) **中嶋治彦, 伊奈川和香, 伊藤典彦, 内尾栄一, 大野重昭, 青木功喜, 他**: (S)-1-(3-hydroxy-2-phosphonylmethoxypropyl)cystoine のアデノウイルスに対する抗ウイルス効果. *日眼会誌* 104: 77-81, 2000.
- 10) **Gordon YJ, Romanowski EG, Araullo-Cruz TP**: Topical HPMPC inhibits adenovirus type 5 in the New Zealand rabbit ocular replication model. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 35: 4135-4143, 1994.
- 11) **De Oliveira CB, Stevenson D, LaBree L, McDonnel PJ, Trousdale MD**: Evaluation of cidofovir (HPMPC, GS-504) against adenovirus type 5 infection *in vitro* and in a New Zealand rabbit ocular model. *Antiviral Res* 31: 165-172, 1996.
- 12) **Carmichael J, DeGraff WG, Gazder AF, Minna JD, Mitchell JB**: Evaluation of tetrazolium-based, semi-automated colorimetric assay: Assessment of chemosensitivity testing. *Cancer Res* 47: 936-942, 1987.
- 13) **Pauwels R, Barazarini J, Baba M, Snoeck R, Schols D, De Clercq E, et al**: Rapid and automated tetrazolium-based colorimetric assay for detection of anti-HIV compounds. *J Virol Methods* 20: 309-321, 1988.
- 14) **Takeuchi H, Baba M, Shigeta S**: An application of tetrazolium (MTT) colorimetric assay for the screening of anti-herpes simplex virus compounds. *J Virol Methods* 33: 61-71, 1991.
- 15) **Sudo K, Konno K, Yokota Y, Shigeta S**: A sensitive assay system screening antiviral compounds against herpes simplex virus type 1 and 2. *J Virol Methods* 49: 169-178, 1994.
- 16) **Kodama E, Igarashi A, Mori S, Hashimoto K, De Clercq E, Shigeta S, et al**: Evaluation of antiherpetic compounds using a gastric cancer cell line: Pronounced activity of BVDU against herpes simplex virus replication. *Microbiol Immunol* 40: 359-363, 1996.

- 17) Watanabe W, Konno K, Ijichi K, Inoue H, Yokota T, Shigeta S: MTT colorimetric assay system for the screening of anti-orthomyxo- and anti-paramyxoviral agents. *J Virol Methods* 48: 257—265, 1994.
- 18) 茂田士郎: 抗ウイルス剤開発の戦略. 臨床と研究 7: 2027—2035, 1996.
- 19) Neyts J, Snoek R, Schols D, Balzarini J, De Clercq E: Selective inhibition of human cytomegalovirus DNA synthesis by HPMP. *Virology* 3: 85—96, 1990.
- 20) De Clercq E: Therapeutic potential of HPMP as an antiviral drug. *Rev Medic Virol* 8: 261—272, 1993.
- 21) De Clercq E: Therapeutic potential of cidofovir (HPMP, Vistide) for the treatment of DNA virus (i.e. herpes-, papova-, pox-, and adenovirus) infection. *Verh K Acad Geneesk Belg* 58: 19—47, 1996.
- 22) Romanowski EG, Gordon YJ, Araullo-Cruz TP: Topical corticosteroids reverse the antiviral effect of topical cidofovir in the Ad 5-inoculated New Zealand rabbit ocular model. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 38: 253—257, 1997.
- 23) Gordon YJ, Araullo-Cruz TP, Johnson YF, Romanowski EG, Kinchington PR: Isolation of human adenovirus type 5 variant resistant to the antiviral cidofovir. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 37: 2774—2778, 1996.
- 24) Mitsuya H, Jarrett RF, Matsukura M, Di Marzo Veronese F, DeVico AL, Sarngadharan MG, et al: Long-term inhibition of human T-lymphotropic virus type III/lymphadenopathy-associated virus (human immunodeficiency virus) DNA synthesis and RNA expression in T cells protected by 2' 3'-dideoxynucleosides *in vitro*. *Proc Natl Acad Sci USA* 84: 2033—2037, 1987.
- 25) Hao Z, Cooney DA, Hartman NR, Perno CF, Fridland A, et al: Factors determining the activity of 2', 3'-dideoxynucleosides in suppressing human immunodeficiency virus *in vitro*. *Mol Pharmacol* 4: 431—435, 1988.
- 26) 満屋裕明: HIV 関連酵素阻害剤(プロテアーゼ, 逆転写酵素). *日本臨床* 49: 2062—2069, 1991.
- 27) 島田 馨, 木村 哲, 山田兼雄, 山口 剛, 福武勝幸: AIDS または ARC 患者に対する zalcitabine (Ro 24-2027: ddC) の単独療法臨床試験. 化学療法の領域 11: 1802—1815, 1995.
- 28) 島田 馨, 木村 哲, 山田兼雄, 山口 剛, 福武勝幸: HIV 感染症に対する zalcitabine (Ro 24-2027: ddC) と zidovudine (AZT) の併用療法臨床試験. 化学療法の領域 11: 1983—1997, 1995.
- 29) Devineni D, Gallo JM: Zalcitabine. Clinical pharmacokinetics and efficacy. *Clin Pharmacokinet* 28: 351—360, 1995.
- 30) 茂呂 徹, 中島則雄, 笹井清司, 高杉益充: ザルシタピンの物理的・化学的性質および製剤の安定性. 化学療法の領域 12: 1882—1885, 1996.
- 31) 茂呂 徹, 中島則雄, 関根 讓, 有沢幹雄, 車 勇, 高杉益充, 他: 抗ウイルス化学療法剤ザルシタピンの薬効薬理と体内動態. 化学療法の領域 12: 2298—2303, 1996.
- 32) 満屋裕明: 抗 HIV 剤(1) 逆転写酵素阻害剤. *臨床科学* 33: 3—9, 1997.