

インターフェロンと抗ヘルペス剤との相互作用に 関する研究 (図8, 表7)

内 藤 毅 (徳島大学医学部眼科学教室)

Studies on the Interaction of Interferon with Anti-herpetic Agents

Takeshi Naito

Department of Ophthalmology, Tokushima University School of Medicine

要 約

角膜ヘルペスの治療において、インターフェロン (IFN) 単独投与では治療効果はほとんど無く、抗ヘルペス剤と併用した場合にその治療効果を高めることがいくつか報告されている。しかしその相互作用について、はっきりとした結論は出していない。そこで VERO 細胞を用いて、ヒト線維芽細胞インターフェロン (HuIFN- β) と抗ヘルペス剤 (5-iodo-2'-deoxyuridine (IDU), aciclovir (ACV), 9-(1,3-dihydroxy-2-propoxymethyl) guanine (DHPG)) との相互作用について検討してみた。まず単層培養した VERO 細胞の培養液に HuIFN- β を種々の濃度に加えて培養した。24時間後培養液を捨て、単純ヘルペスウイルス 1 型を接種し、種々の濃度に抗ウイルス剤を溶解させた培養液を用いて 48 時間培養し、プラック数を測定した。その結果、プラック形成抑制率を指標として検討してみると、HuIFN- β と IDU, ACV あるいは DHPG との併用は、いずれも相乗効果を示した。(日眼 92: 1177—1184, 1988)

キーワード: 相乗効果, インターフェロン, 抗ヘルペス剤, 角膜ヘルペス

Abstract

To use interferon (IFN) only has little or no therapeutic effect in the treatment of herpetic keratitis. However, to use IFN in combination with anti-herpetic agents has high therapeutic efficacy. Although, the interaction between IFN and anti-herpetic agents has not been decided clearly. In this study, the interaction between human fibroblast interferon (HuIFN- β) and anti-herpetic agents, 5-iodo-2'-deoxyuridine (IDU), aciclovir (ACV) and 9-(1,3-dihydroxy-2-propoxymethyl) guanine (DHPG), was studied in vitro using VERO cells. After the formation of monolayer of VERO cells, HuIFN- β of various concentrations was added in the maintenance medium. After 24 hours incubation, the medium was removed and herpes simplex virus (HSV) type 1 was inoculated on VERO cells. Then, anti-herpetic agents were added in the medium in various concentrations. After 48 hours incubation, plaques were counted and the reduction rate of plaque numbers were calculated. The results showed that each combination of HuIFN- β with IDU, ACV or DHPG worked synergistically in the inhibition of HSV replication. (Acta Soc Ophthalmol Jpn 92: 1177—1184, 1988)

Key words: Synergism, Interferon, Anti-herpetic agents, Herpetic keratitis

別刷請求先: 770 徳島市蔵本町 2—50 徳島大学医学部眼科学教室 内藤 毅 (昭和63年 3 月 7 日受付)

Reprint requests to: Takeshi Naito, M.D. Dept. of Ophthalmol., School of Med., Tokushima Univ.
2-50 Kuramoto-cho, Tokushima 770, Japan

(Accepted for publication March 7, 1988)

I 緒 言

近年、角膜ヘルペスの治療薬としてインターフェロンを併用することが注目されている。インターフェロンは、単独使用の場合には治療効果はほとんど無いが、抗ヘルペス剤と併用した場合には、抗ヘルペス剤の治療効果を高めることが報告されている^{11)~12)}。しかし、その相互作用についてははっきりとした結論は出ていない。そこで今回の研究では、組織培養細胞を用いて、インターフェロンと抗ヘルペス剤を併用することにより、相加効果、相乗効果あるいは拮抗効果のいかなる相互作用を生じるかについて、詳しく検討した。

II 方 法

組織培養細胞はVERO細胞を、ウイルスは単純ヘルペスウイルス (herpes simplex virus, HSV) 1型 PH株を、インターフェロンはヒト線維芽細胞インターフェロン (HuIFN- β) を、抗ウイルス剤には5-iodo-2'-deoxyuridine (IDU)、9-(2-hydroxyethoxymethyl) guanine (aciclovir, ACV)、9-(1,3-dihydroxy-2-propoxymethyl) guanine (DHPG) をそれぞれ用いた。組織培養は温度37°C、5%CO₂ incubatorを用いて行なった。培養液はEagleのMEM培地にL-glutamineを0.3g/l加え、さらに牛胎児血清 (FCS) を細胞増殖の場合には10%、細胞維持の場合には1%の濃度に加えて用いた。組織培養シャーレはNunc社製、直径6cmのものをを用いた。

1) HuIFN- β と IDU を併用した場合

まず単層培養したVERO細胞の培養液に0.01IU/ml, 0.1IU/ml, 1IU/ml, 10IU/ml, 100IU/mlの濃度にHuIFN- β を加え培養した。24時間後培養液を捨て、PBS(-)で細胞表面を洗浄した後、ウイルス液を各シャーレに0.2mlずつ加え37°C、5%CO₂ incubator中で1時間培養してウイルスを吸着させた。その後ウイルス液を除き、PBS(-)で細胞表面を洗浄し、維持用MEM培地に0.5%の濃度にメチルセルロースを加えたものに、 3×10^{-7} Mの濃度にIDUを加えたものを5ml重層し、37°Cの5%CO₂ incubator中で培養した。48時間後上清を捨て、PBS(-)で細胞表面を洗浄した後、10%ホルマリン・クリスタルバイオレット液で室温にて30分間染色固定し、ブラック数を測定した。対照は培養液に何も加えないもの、HuIFN- β のみ使用、またはIDUのみ使用とした。用いたシャーレの数は各薬剤濃度それぞれ3枚ずつとした。また逆にHuIFN-

β の濃度を1IU/mlとし、IDUの濃度を 3×10^{-7} M, 1×10^{-6} M, 3×10^{-6} M, 1×10^{-5} M, 3×10^{-5} Mと変化させた場合も加え、合計4回の実験を行なった。

2) HuIFN- β と ACV を併用した場合

前述のIDUの場合と方法は同様である。HuIFN- β の濃度を0.01IU/ml, 0.1IU/ml, 1IU/ml, 10IU/ml, 100IU/mlと変化させ、ACVの濃度を 10^{-8} Mとした場合と、逆にHuIFN- β の濃度を1IU/mlとし、ACVの濃度を 1×10^{-8} M, 1×10^{-7} M, 3×10^{-7} M, 1×10^{-6} M, 3×10^{-6} M, 1×10^{-5} Mと変化させた場合も含め、合計4回の実験を行なった。なおACVを溶解するとき、50°Cに20分間保温して溶解した。

3) HuIFN- β と DHPG を併用した場合

DHPGの場合も前述の実験方法と同様である。HuIFN- β の濃度を0.01IU/ml, 0.1IU/ml, 1IU/ml, 10IU/ml, 100IU/mlと変化させ、DHPGの濃度を 1×10^{-9} Mならびに 1×10^{-8} Mとした場合と、逆にHuIFN- β の濃度を1IU/mlならびに10IU/mlとし、DHPGの濃度を 1×10^{-9} M, 1×10^{-8} M, 1×10^{-7} M, 3×10^{-7} M, 1×10^{-6} M, 3×10^{-6} Mと変化させた場合で合計4回の実験を行なった。以上の方法にて測定したブラック数をもとにブラック形成抑制率を算出し、抗ウイルス効果の指標とした。たとえば図1に示すように、

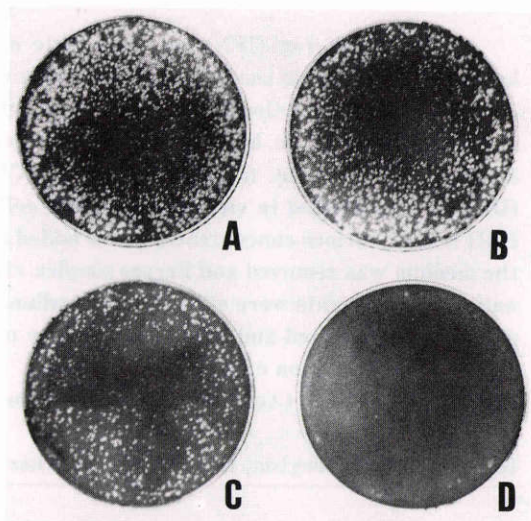


図1 クリスタルバイオレット染色後のシャーレ (HSV接種48時間後)

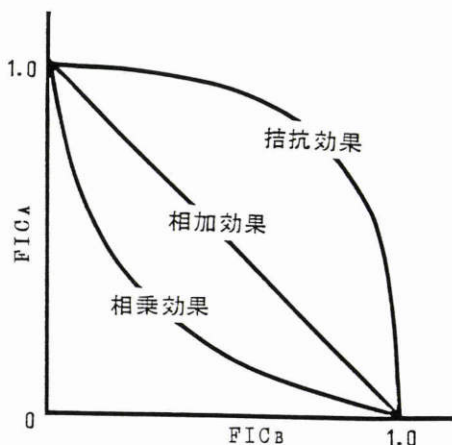
A: コントロール, B: DHPG 10^{-8} M, C: HuIFN- β 0.01IU/ml, D: DHPG 10^{-8} M + HuIFN- β 0.01 IU/ml

Aに示したコントロールのシャーレのブラック数は1,395で、BのDHPGを 10^{-8} M加えた場合のブラック数は1,219で12.6%のブラック形成抑制率を示した。CはHuIFN- β を0.01IU/ml使用したものでブラック数は565あり59.5%のブラック形成抑制率を示し、さらにDは事前にCと同量の0.01IU/mlの濃度のHuIFN- β で処理した後に、Bと同量であるDHPG 10^{-8} Mを加えたものであるが、ブラック数は30に減少しており、ブラック形成抑制率は97.8%となっている。さらに、算出したブラック形成抑制率をもとに、fractional inhibitory concentration index (FIC index) を算出し、効果判定に用いた。FIC index は、『FIC index = 併用時の A 剤の濃度/単独時の A 剤の濃度 + 併用時の B 剤の濃度/単独時の B 剤の濃度』という数式で表現され、ある効果を得るのに必要な薬剤濃度を前述の数式に当てはめることにより算出され、FIC index > 1 のときは拮抗であり、FIC index = 1 のとき相加、FIC index < 1 のとき相乗効果と判定できる。これらの関係を isobologram に表示したものが図 2 である^{13)~15)}。

III 結 果

1) HuIFN- β と IDU を併用した場合

HuIFN- β と IDU を併用した場合の実験結果の 1 例を示したのが表 1 である。HuIFN- β と IDU の双方を加えないときの平均ブラック数ならびに、IDU だけを 3×10^{-7} M 加えたときの平均ブラック数はそれぞれ 686.0 と 629.7 になり、IDU 3×10^{-7} M 単独使用では 8.2% のブラック形成抑制率を示した。さらに前もって 0.01IU/ml の HuIFN- β で処理したものに同じ濃度の IDU を加えると、平均ブラック数は 193.7 に減少、ブラック形成抑制率は 71.8% に増大した。IDU の濃度は一定で、前処置の HuIFN- β の濃度を段階的に濃くしながら加えていくと、ブラック形成抑制率は表 1 に示すように増大していった。この結果をグラフに示したものが図 3 である。縦軸はブラック形成抑制率を、横軸は HuIFN- β の濃度を示している。一番下の点線は IDU 3×10^{-7} M 単独使用時のブラック形成抑制率で、8.2% を示している。中央の破線は HuIFN- β 単独使用の場合を示しているが、0.01IU/ml のときには 59.5% のブラック形成抑制率を示し、0.1IU/ml のときには 62.7%、1IU/ml のときには 69.2%、10IU/ml のときには 79.4%、100IU/ml のときには 89.2% のブラック形成抑制率であった。HuIFN- β と IDU を併用した場合



$$FIC \text{ index} = FIC_A + FIC_B$$

$$FIC_A = \frac{\text{併用時の A 剤の濃度}}{\text{単独時の A 剤の濃度}}$$

$$FIC_B = \frac{\text{併用時の B 剤の濃度}}{\text{単独時の B 剤の濃度}}$$

図 2 FIC index による isobologram

表 1 IDU と HuIFN- β の併用効果

HuIFN- β 濃度	IDU 濃度	平均ブラック数	ブラック形成抑制率
0 IU/ml	0 M	686.0	—
0 IU/ml	3×10^{-7} M	629.7	8.2%
0.01 IU/ml		193.7	71.8%
0.1 IU/ml		136.7	80.1%
1 IU/ml		76.7	88.8%
10 IU/ml		38.7	94.4%
100 IU/ml		12.3	98.2%

には、一番上の実線のごとく、ブラック形成抑制率が増大しているのが分かる。逆に HuIFN- β の濃度を一定にし、IDU の濃度を変化させた場合をも同様に行ない、合計 4 回の実験結果から、end point をブラック形成抑制率 90% に設定して、求めた各薬剤濃度を示したのが表 2 であり、表 2 の薬剤濃度から FIC index を算出した結果を示したものが表 3 である。表 3 の結果を更に isobologram に図示したのが図 4 であるが、HuIFN- β と IDU を併用した場合に、相乗効果を示す結果となった。

2) HuIFN- β と ACV を併用した場合

前述の HuIFN- β と IDU を併用した場合と同様の

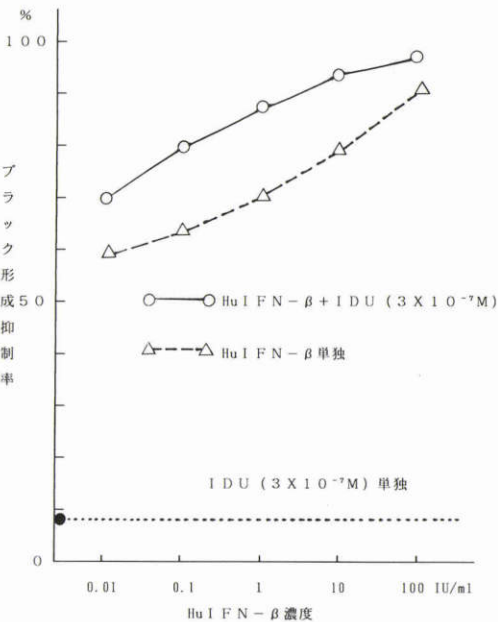


図3 IDU と HuIFN-β の併用効果

表2 90%ブラック形成抑制時の IDU と HuIFN-β の薬剤濃度

IDU	HuIFN-β
$8 \times 10^{-6} \text{M}$	0 IU/ml
0 M	100 IU/ml
$7 \times 10^{-6} \text{M}$	1 IU/ml
$3 \times 10^{-7} \text{M}$	1 IU/ml
$3 \times 10^{-6} \text{M}$	1 IU/ml
10^{-8}M	38 IU/ml

表3 90%ブラック形成抑制時のFIC index

FIC index	FIC _{IDU}	FIC _{IFN}
0.885	0.875	0.01
0.048	0.038	0.01
0.385	0.375	0.01
0.381	0.001	0.38

$$\text{FIC index} = \text{FIC}_{\text{IDU}} + \text{FIC}_{\text{IFN}}$$

$$\text{FIC}_{\text{IDU}} = \frac{\text{併用時の IDU 濃度}}{\text{単独時の IDU 濃度}}$$

$$\text{FIC}_{\text{IFN}} = \frac{\text{併用時の HuIFN-}\beta \text{ 濃度}}{\text{単独時の HuIFN-}\beta \text{ 濃度}}$$

方法で実験を行ない、HuIFN-β と ACV を併用した場合の実験結果の1つを示したものが図5である。ACV

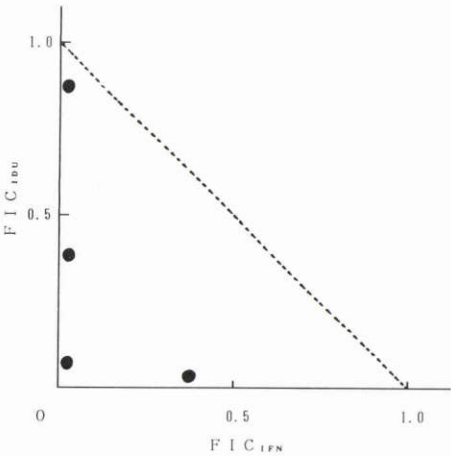


図4 IDU と HuIFN-β 併用時の FIC index

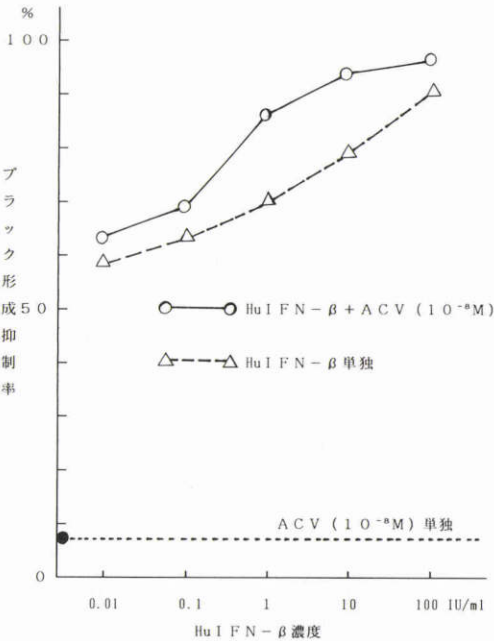


図5 ACV と HuIFN-β の併用効果

を 10^{-5}M の濃度で単独使用した場合には7.0%のブラック形成抑制率を示したが、HuIFN-β 使用にACVを加えることによりブラック形成抑制率が増大し、単独使用時に比べ併用時の方が抑制効果の増大が認められた。IDUの場合と同様に、合計4回の実験結果から、ブラック形成抑制率90%にend pointを設定して、求めた各薬剤濃度を示したものが表4である。表4からFIC indexを算出した結果が表5であり、それをisobologramに示した結果が図6である。HuIFN-β と

表 4 90%ブラック形成抑制時の ACV と HuIFN-β の薬剤濃度

ACV	HuIFN-β
$4 \times 10^{-6} \text{M}$	0 IU/ml
0 M	100 IU/ml
$1.3 \times 10^{-6} \text{M}$	1 IU/ml
$1.8 \times 10^{-6} \text{M}$	1 IU/ml
10^{-8}M	2.5 IU/ml
10^{-9}M	4.8 IU/ml

表 5 90%ブラック形成抑制時の FIC index

FIC index	FIC _{ACV}	FIC _{IFN}
0.335	0.325	0.010
0.460	0.450	0.010
0.028	0.003	0.025
0.048	0.0003	0.048

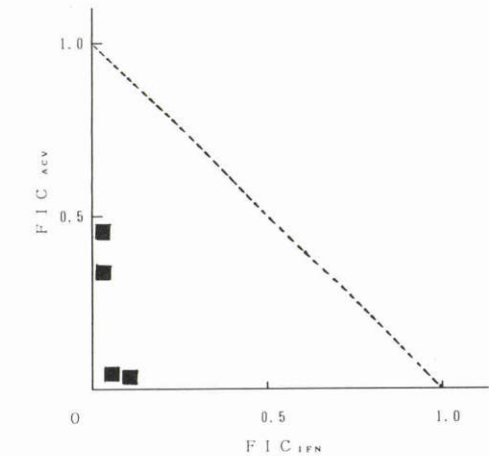


図 6 ACV と HuIFN-β 併用時の FIC index

ACV を併用した場合にも相乗効果を示す結果となった。

3) HuIFN-β と DHPG を併用した場合

HuIFN-β と DHPG を併用した場合の実験結果の一つを示したものが図 7 である。DHPG の濃度を一定にし、HuIFN-β の濃度を変えた場合の実験結果を示しているが、DHPG 10^{-8}M の濃度で単独使用時には 5.3% のブラック形成抑制率を示したが、HuIFN-β 使用に併用することにより実線で示すように著明な併用効果を示した。上記 2 つの組み合わせの場合と同様に、

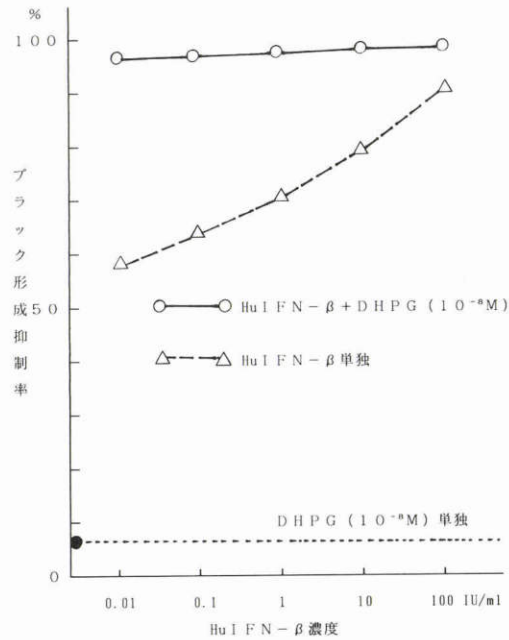


図 7 DHPG と HuIFN-β の併用効果

表 6 90%ブラック形成抑制時の DHPG と HuIFN-β の薬剤濃度

DHPG	HuIFN-β
$8 \times 10^{-7} \text{M}$	0 IU/ml
0 M	100 IU/ml
$3 \times 10^{-8} \text{M}$	10 IU/ml
$7 \times 10^{-7} \text{M}$	1 IU/ml
10^{-8}M	10^{-2} IU/ml
10^{-9}M	8 IU/ml

表 7 90%ブラック形成抑制時の FIC index

FIC index	FIC _{DHPG}	FIC _{IFN}
0.138	0.038	0.1
0.885	0.875	0.01
0.013	0.013	0.0001
0.081	0.001	0.08

合計 4 回の実験結果から、90%ブラック形成抑制率に end point を設定して、各薬剤濃度を求めたものが表 6 である。これをもとに算出した FIC index を示したものが表 7 で、isobologram に図示すると、図 8 のごとくになった。この組み合わせでも相乗効果を示した。

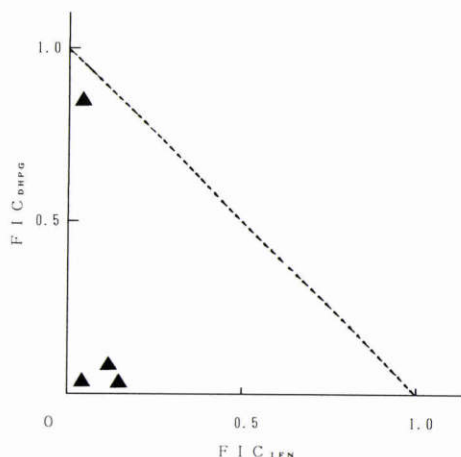


図8 DHPGとHuIFN- β 併用時のFIC index

以上の実験結果から、FIC indexの平均値を求めてみると、HuIFN- β とIDUの組み合わせの場合では、0.425であり、ACVとの組み合わせでは0.218、DHPGとの組み合わせでは0.279となり、相乗効果の程度はACV>DHPG>IDUとなった。

IV 考 按

Naganoら¹⁶⁾やIsaacsら¹⁷⁾によって発見されたインターフェロン(IFN)は広範囲の抗ウイルス作用を持っており、しかも毒性が少ないことから早くから臨床的に注目されてきた。当初、IFNの生産性の困難さから入手困難であったが、最近では生産技術が進歩した結果大量生産が可能となり、ますます多方面において臨床使用されつつある。眼科領域でIFNが臨床的に注目され始めてから既に20年以上の歳月がたっているが、その間に角膜ヘルペスに対する効果も検討された。Tommila¹⁸⁾はIFN単独使用で治療効果を有することを示唆する報告をしているが、当時はIDUなどの抗ヘルペス剤はまだ普及しておらず対照群の治療法がiodine cauteryであるため、そのような結果となったことが推測される。その後、IFNの生産技術の発達やIDUなどの抗ヘルペス剤の普及にともなって研究が発展するに従い、IFN単独使用における有用性が薄れて来て、現在では角膜ヘルペスに対して、IFN単独では発症防止効果ならびに再発防止効果はあるが、治療効果はないという報告がほとんどである¹¹⁻⁷⁾。

しかし、単独使用では治療効果のないIFNを他の抗ヘルペス剤と併用すると、抗ヘルペス効果が著しく高められることが報告されている。角膜ヘルペスの治療

において、Sundmacherら⁸⁾⁹⁾、de Koningら¹⁰⁾は、human leucocyte interferon (HuIFN- α)とtrifluorothymidine (F₃T)を併用することにより、樹枝状角膜炎の治療期間をF₃T単独使用に比べ著しく短縮させることが出来たと報告している。また、de Koningら¹¹⁾、Colinら¹²⁾は、HuIFN- α とACVを併用し、同様に樹枝状角膜炎の治療期間をACV単独使用に比べ著しく短縮できたと報告している。このように、単独使用では治療効果を示さないIFNを他の抗ヘルペス剤と併用することによって、抗ヘルペス剤の効果を著しく高めることができるわけであるが、その相互作用についてはあまり報告されていない。そこで今回の研究は、*in vitro*におけるIFNと抗ヘルペス剤との相互作用を明らかにすることを目的とした。

多剤併用時の相互作用を解析するために今回はFIC indexをもちいたが、この方法によれば*in vitro*の実験系における多剤併用時の相互作用を比較的簡単に、しかも明瞭に調べることが出来る¹³⁾⁻¹⁵⁾。また図2に示したようにisobologramに表示すればその相互作用は明瞭であり、きわめて有用性の高い方法と思われる。

今回の*in vitro*の実験結果は、HuIFN- β とIDU、HuIFN- β とACV、HuIFN- β とDHPGの全ての組み合わせにおいて相乗効果を示したが、Stanwickら¹⁹⁾によればVERO細胞を用いた*in vitro*の実験で本研究結果と同様にHuIFN- β とACVとの併用は相乗効果を示したと報告している。Levin²⁰⁾らは*in vitro*の実験で、HuIFN- α とACVとの併用は相乗効果を示すことを報告している。Janzら²¹⁾は、*in vitro*でIFN- β と9- β -D-arabinofuranosyladeninemonophosphate (ara-AMP)、1- β -D-arabinofuranosylthymidine (ara-T)、5-ethyl-2'-deoxyuridine (EDU)、ACV、F₃T、phosphonoformic acid (PFA)の併用実験で、ara-AMPとの組み合わせでは相加効果を示したが、その他の抗ヘルペス剤との組み合わせでは相乗効果を示すことを報告している。Eppsteinら²²⁾は、*in vitro*での実験でIFNとDHPG、IFNとACVとの組み合わせは各々相乗効果を示したが、前者のほうがその程度がより著明であったと報告しているが、今回の結果ではACV>DHPGであった。しかしその差は著明ではなく、同程度と見なして差支えないと考えられ、この点は今後検討の余地を残すが、ACVとDHPGはよく似た化学構造であり、その作用機序も同様と考えられている点からすると、それほど差はないと考え得る。Moranら²³⁾は*in vitro*の実験で、recombinant human

interferon- α (rHuIFN- α) と ACV, DHPG, vidarabine (ara-A) を併用した場合, rHuIFN- α と ACV, DHPG との組み合わせでは著明な相乗効果を示したが, ara-A との組み合わせでは相加および軽い相乗効果を示したと報告している。さらに Fraser-Smith²⁴⁾ は, マウスを使った動物実験で, mouse interferon beta (MuIFN- β) と DHPG との併用は相乗効果を示すことを報告した。このように IFN と作用機序の異なる抗ヘルペス剤を組み合わせると同時使用すると相乗効果を生むということが、今回の報告のみならず数人が報告しているが、相乗効果を生じる作用機序は未だはっきりしていない。茂田²⁵⁾ は, IFN で処理すると ACV の磷酸化効率が高まることをその理由として報告している。抗ヘルペス剤が抗ヘルペス効果を発揮するためには磷酸化されることが必要であり、その磷酸化効率が高められることは相乗効果を生む理由として充分考えられることである。

さらに相乗効果を生じる薬剤を併用することは、1) 治療期間を短縮できる、2) 使用薬剤量を減らすことができるという長所があり、このことから耐性株の出現防止、副作用²⁶⁾の軽減という可能性も生まれ、今後角膜ヘルペスに対する実際の治療において、IFN と各種抗ヘルペス剤の併用に関しては十分臨床応用が期待できるものと考ええる。

また、今回用いた HSV (PH 株) は、普通 IFN の力価測定に用いられる vesicular stomatitis virus に比べ IFN- β に対して高い感受性を示し、IFN の新しい力価測定システムとして採用できる可能性があると思われた。

本研究に用いた HuIFN- β は東レ株式会社から、IDU はヤマサ醤油株式会社から、ACV は英国ウエルカム社から、DHPG は米国 Syntex 社から供与されたものである。

稿を終えるにあたり、御指導、御校閲を賜りました当教室三村康男教授ならびに塩田洋助教授に深謝いたします。

文 献

- 1) Kaufman HE, Ellison ED, Centifanto YM: Difference in interferon response and protection from ocular virus infection in rabbits and monkeys. *Am J Ophthalmol* 74: 89—92, 1972.
- 2) Sugar J, Kaufman HE, Varnell ED: Effect of exogenous interferon on herpetic keratitis in rabbits and monkeys. *Invest Ophthalmol* 12: 378—381, 1973.
- 3) Sundmacher R, Neumann-Haefelin D, Manthey KF, et al: Interferon in treatment of dendritic keratitis in humans: A preliminary report. *J Infect Dis Suppl* 133: A160—A164, 1976.
- 4) Jones BR, Coster DJ, Falcon MG, et al: Topical therapy of ulcerative herpetic keratitis with human interferon. *Lancet* II: 128, 1976.
- 5) Jones BR, Coster DJ, Falcon MG, et al: Clinical trials of topical interferon therapy of ulcerative viral keratitis. *J Infect Dis Suppl* 133: A169—A172, 1976.
- 6) Shiota H, Yamane S: The effect of human fibroblast interferon on herpetic keratitis in rabbits. In Shiota H, Cheng YC, Prusoff HW, eds: *Herpesvirus—Clinical, Pharmacological and Basic Aspects*. Excerpta Medica, Amsterdam-Oxford-Princeton, 295—301, 1982.
- 7) 塩田 洋, 山根伸太, 藤田善史: 角膜ヘルペスに対する human fibroblast interferon の効果および必要点眼回数. *臨眼* 36: 1047—1051, 1982.
- 8) Sundmacher R, Cantell K, Neumann-Haefelin D: Combination therapy of dendritic keratitis with trifluorothymidine and interferon. *Lancet* II: 687, 1978.
- 9) Sundmacher R, Cantell K, Mattes A: Combination therapy for dendritic keratitis: High-titer α -interferon and trifluridine. *Arch Ophthalmol* 102: 554—555, 1984.
- 10) de Koning EWJ, van Bijsterveld OP, Cantell K: Combination therapy for dendritic keratitis with human leucocyte interferon and trifluorothymidine. *Br J Ophthalmol* 66: 509—512, 1982.
- 11) de Koning EWJ, van Bijsterveld OP, Cantell K: Combination therapy for dendritic keratitis with acyclovir and α -interferon. *Arch Ophthalmol* 101: 1866—1868, 1983.
- 12) Colin J, Chastel C, Renard G, Cantell K: Combination therapy for dendritic keratitis with human leukocyte interferon and acyclovir. *Am J Ophthalmol* 95: 346—348, 1983.
- 13) Berenbaum MC: Synergy, additivism and antagonism in immunosuppression: A critical review. *Clin Exp Immunol* 28: 1—18, 1977.
- 14) Berenbaum MC: A method for testing for synergy with any number of agents. *J Infect Dis* 137: 122—130, 1978.
- 15) Sande MA, Mandell GL: Antimicrobial agents—General considerations. In: Gilman AG, Goodman LS, Rall TW, eds. *The Pharmacological Basis of Therapeutics*, 7th ed, New York: Macmillan, 1066—1094, 1985.
- 16) Nagano Y, Kojima Y: Pouvoir immunisant du virus vaccinal inactivé par des rayons ultra-

- violets. *Compt Rend Soc Biol* 148: 1700—1702, 1954.
- 17) **Isaacs A, Lindenmann J**: Virus interference. I. The interferon. *Proc Roy Soc Ser B* 147: 258—267, 1957.
- 18) **Tommila V**: Treatment of dendritic keratitis with interferon. *Acta Ophthalmol* 41: 478—482, 1963.
- 19) **Stanwick TL, Schinazi RF, Campbell DE**, et al: Combined antiviral effect of interferon and acyclovir on herpes simplex virus types 1 and 2. *Antimicrob Agents Chemother* 19: 672—674, 1981.
- 20) **Levin MJ, Leary PL**: Inhibition of human herpesviruses by combinations of acyclovir and human leukocyte interferon. *Infect Immun* 32: 995—999, 1981.
- 21) **Janz C, Wigand R**: Combined interaction of antiherpes substances and interferon β on the multiplication of herpes simplex virus. *Arch Virol* 73: 135—143, 1982.
- 22) **Eppstein DA, Marsh YV**: Potent synergistic inhibition of herpes simplex virus-2 by 9-[(1, 3-dihydroxy-2-propoxy) methyl] guanine in combination with recombinant interferons. *Biochem Biophys Res Commun* 120: 66—73, 1984.
- 23) **Moran DM, Kern ER, Overall JC Jr**: Synergism between recombinant human interferon and nucleoside antiviral agents against herpes simplex virus: Examination with an automated microtiter plate assay. *J Infect Dis* 151: 1116—1122, 1985.
- 24) **Fraser-Smith EB, Eppstein DA, Marsh YV**, et al: Enhanced efficacy of the acyclic nucleoside 9-(1,3-dihydroxy-2-propoxymethyl) guanine in combination with beta-interferon against herpes simplex virus type 2 in mice. *Antimicrob. Agents Chemother* 25: 563—565, 1984.
- 25) 茂田士郎, 森 修一, 横田智之: IFN 処理後の感染で生産される HSV-チミジンキナーゼの基質親和性の変化. 第2回ヘルペスウイルス研究会抄録集, 17, 1987.
- 26) 内藤 毅, 塩田 洋, 新田敬子他: 角膜ヘルペス治療における副作用の検討. *眼紀* 37: 849—852, 1986.
-