

新しい抗ヘルペス剤 9-(1,3-dihydroxy-2-propoxymethyl)guanine の 家兎角膜に対する毒性研究 (図4)

内藤 毅・塩田 洋 (徳島大学医学部眼科学教室)
兼松 誠二・三村 康男
小 川 剛 史 (国立呉病院眼科)

Studies on the Cytotoxicity of a New Anti-herpetic Agent, 9-(1,3-dihydroxy-2-propoxymethyl) guanine, on the Rabbit Cornea

Takeshi Naito*, Hiroshi Shiota*, Seiji Kanematsu*,
Yasuo Mimura* and Takashi Ogawa**

*Department of Ophthalmology, Tokushima Univ. School of Medicine

**Department of Ophthalmology, National Kure Hospital

要 約

新しい抗ヘルペス剤9-(1,3-dihydroxy-2-propoxymethyl) guanine (DHPG) の家兎角膜に対する細胞毒性を調べた。0.3%, 1%, 3% DHPG 軟膏。一日5回を2週間点眼し、最終点眼の1時間後眼球を摘出し、角膜表面を走査電子顕微鏡を用いて観察して次の結果を得た。1) 0.3%, 1% DHPG 軟膏は全く細胞毒性を示さなかった。2) 3% DHPG 軟膏では dark cell の増加が認められ、極めて軽い細胞毒性を示した。しかしながら、この変化は極めて軽いため、角膜ヘルペスの臨床治療においては無視しても良いと思われる。(日眼 92: 573—577, 1988)

キーワード: DHPG, 抗ヘルペス剤, 細胞毒性, 走査電子顕微鏡, 角膜ヘルペス

Abstract

We have studied the cytotoxicity of a new anti-herpetic agent, 9-(1,3-dihydroxy-2-propoxymethyl) guanine (DHPG), on the rabbit cornea. Dose of 0.3%, 1% and 3% DHPG ointment were applied to the normal rabbit corneas, 5 times a day for 2 weeks. One hour after the last application, the surface of the corneas were observed with a scanning electron microscopy. The 0.3% and 1% DHPG ointments did not show any cytotoxicity in the rabbit cornea. The 3% DHPG ointment showed a very slight cytotoxicity, with an increase of dark cells in the corneal surface. However, this change was very mild and seemed to be negligible in clinical use for the treatment of herpetic keratitis. (Acta Soc Ophthalmol Jpn 92: 573—577, 1988)

Key words: DHPG, Anti-herpetic agent, Cytotoxicity, Scanning electron microscopy, 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62年7月20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 July 20, 1987)

I 緒 言

新しい抗ヘルペス剤として9-(1,3-dihydroxy-2-propoxymethyl) guanine (DHPG) が合成され, in vitro および in vivo において aciclovir (ACV) に匹敵する, あるいはそれ以上の抗ヘルペス作用を持つことが判明しつつある¹⁾²⁾. 本剤の作用機序としては, DHPG が herpes simplex virus (HSV) 由来の thymidine kinase (TK) で磷酸化され, 最終的に DHPG-triphosphate となり HSV の DNA polymerase を阻害するためと言われている³⁾. 細胞由来の TK ではほとんど磷酸化されないため, 正常細胞にはあまり影響を与えないことが推測されるが, この点に関してはまだ詳しく検討されていない. そこで今回我々は, DHPG の家兎角膜に対する細胞毒性について, 走査電子顕微鏡 (走査電顕) を用いて検討してみた.

II 実験材料および方法

実験動物には体重2.5~3.0kgの白色家兎8匹を用いた. 白色ワセリンと流動パラフィンとを3対2に混合した軟膏を基剤として, 0.3%, 1%, 3%DHPG軟膏を作成した. 8匹の白色家兎を4匹ずつ2群に分け, 第1群の右眼には3%DHPG軟膏を, 左眼は対照とし

て基剤のみを, 第2群の右眼には1%DHPG軟膏を, 左眼には0.3%DHPG軟膏を1日5回, 14日間点眼した. この間毎日, 細隙燈顕微鏡を用い, ローゼベンガル染色を併用してこれらの眼を観察した. 最終点眼の1時間後に致死量のペントバルビタールを静脈内注射して家兎を屠殺した後, ただちに眼球を摘出した. 摘出した眼球を2.5%グルタルアルデヒド磷酸緩衝液 (pH7.4, 以下2.5%GAと略す) 中に浸しながら26ゲージ針を付けた注射器を用いて, 前房中に2.5%GAを約30分間灌流し角膜を固定した後, 角膜をカミソリの刃を用いて輪部で切開し摘出した. さらに2.5%GAで約24時間, 1%オスミウム酸液で約2時間二重固定した後, 上昇エタノール系列で脱水し, アセトンで脱アルコールした後, 臨界点乾燥を行ない真空下で金を蒸着し, 日立 S-800型走査電顕を用いて角膜の表層を観察した⁴⁾.

III 結 果

点眼期間中毎日細隙燈顕微鏡を用い, ローゼベンガル染色を併用して家兎の外眼部を観察したが, 角膜びらん, 結膜の充血, 浮腫, 分泌物増加などの臨床的異常所見は一眼にも認められなかった. 走査電顕による観察では, 対照眼, 0.3%および1%DHPG軟膏投与眼

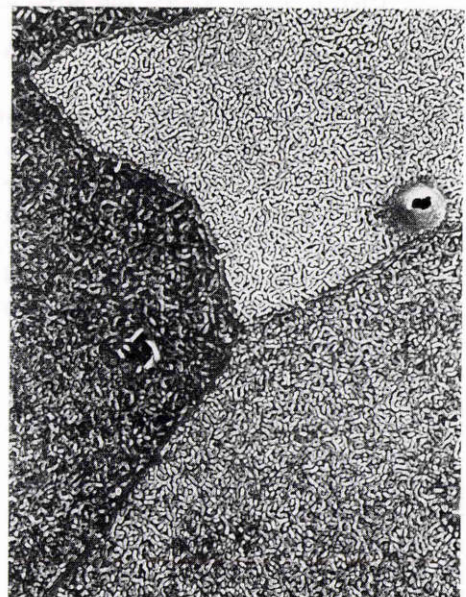
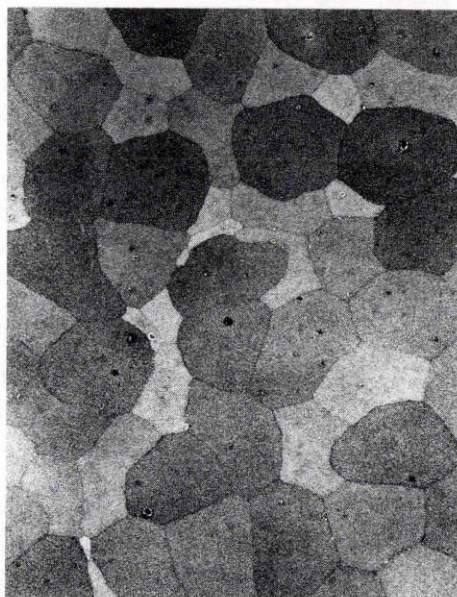
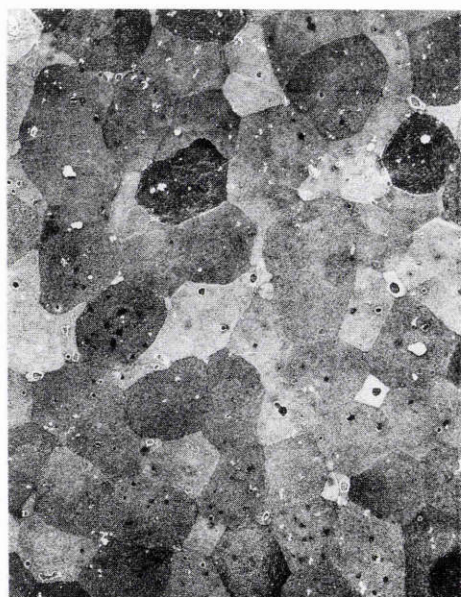
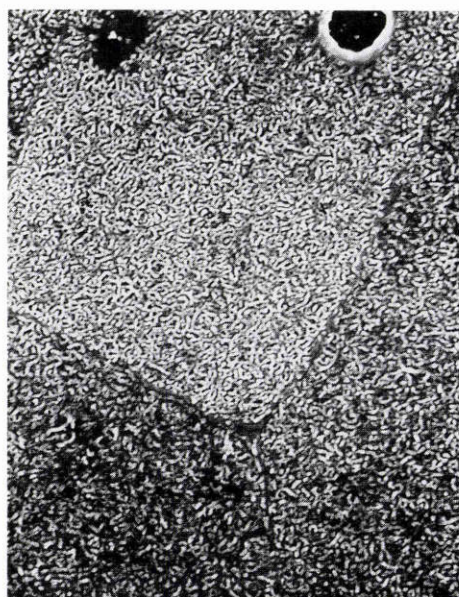


図1 対照: 基剤投与眼

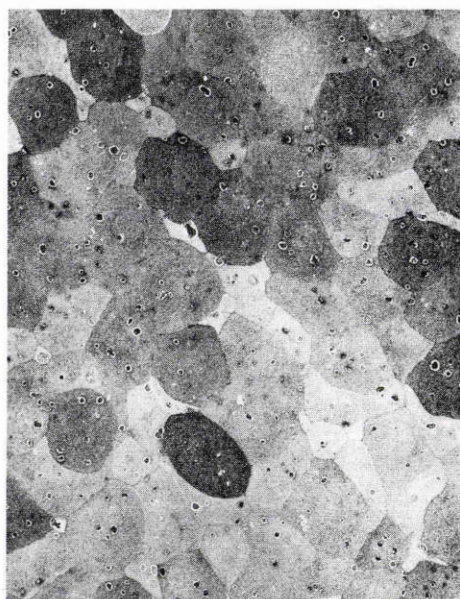


420238 10KV X500 6.0um

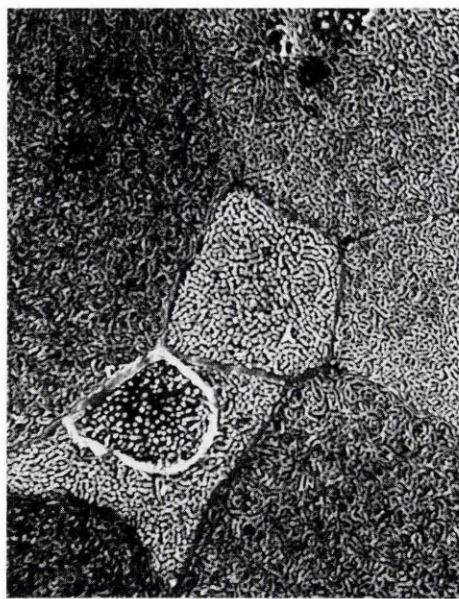


420232 10KV X5.00K 6.0um

図2 0.3%DHPG 軟膏投与眼



420127 10KV X500 6.0um

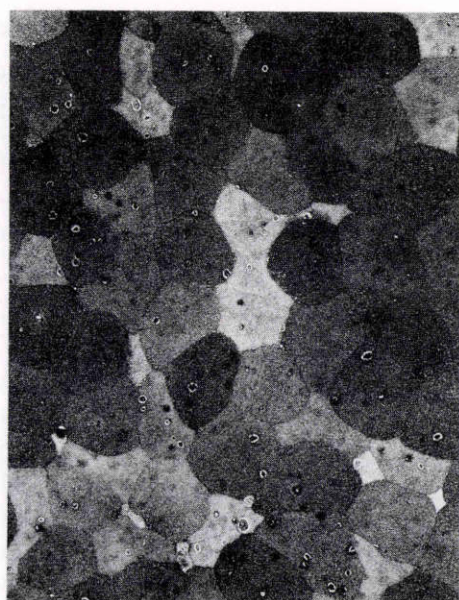


420121 10KV X5.00K 6.0um

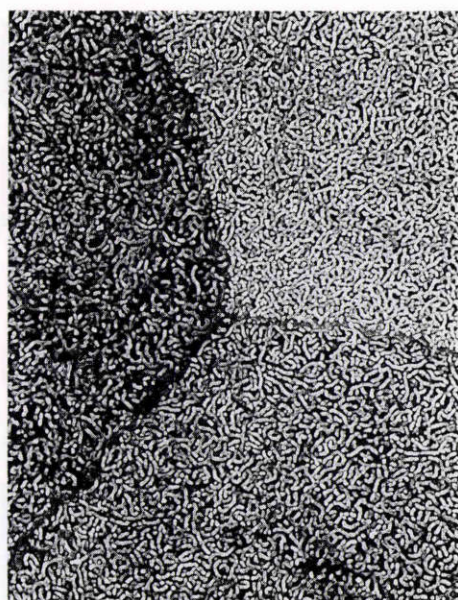
図3 1%DHPG 軟膏投与眼

の角膜表層は, dark cell, medium cell, light cell が正規に配列し, microvilli の性状に異常はなく, 全く正常であった(図1, 図2, 図3). 対照眼, 0.3%およ

び1%DHPG 軟膏投与眼では, dark cell の比率には差が認められなかったが, 3%DHPG 軟膏投与眼では, 対照眼に比べ dark cell の数が約2倍に増加して



591217 10KV X500 6.0um



591236 10KV X5.00K 6.0um

図4 3%DHPG軟膏投与眼

いた。しかし、microvilliの性状には異常はなかった(図4)。

IV 考 按

DHPGはacicolovir (ACV)と同様の作用機序で抗ヘルペス作用を発揮することが知られている。すなわち、DHPGはHSV由来のthymidine kinaseによって磷酸化されてDHPG-monophosphateになり、続いて細胞由来のkinaseによってDHPG-diphosphate, DHPG-triphosphateへと進み、DHPG-triphosphateがウイルスのDNA polymeraseを阻害し、抗ヘルペス作用を発揮する³⁾。したがって、HSVが感染していない正常細胞でのDHPGは磷酸化されず、細胞に影響を及ぼさないため、細胞毒性がほとんど無いと考えられている。

今回我々は走査電顕を用いてDHPGの家兎角膜に対する細胞毒性について検討してみた。0.3%および1%DHPG軟膏使用眼は全く細胞毒性を示さなかったが、3%DHPG軟膏使用眼ではdark cellがやや増加していた。しかしmicrovilliの性状には全く異常は認められなかったため、ごく軽度の細胞毒性の出現と判断した。light cellは若く、dark cellは古い細胞で、medium cellはその中間であると考えらるなら⁴⁾、角膜上

皮細胞のturn overが抑制されていることが想像され、ACVの臨床使用の場合に報告されたような、びまん性表層角膜炎が出現しやすい⁵⁾ことが推測されるが、今回の我々の実験では、細隙燈顕微鏡による観察でそのような所見は認められていないし、走査電顕による角膜表層の観察でも上皮の剝離、脱落を思わせる所見は認められなかった。したがって走査電顕ではごく軽度の細胞毒性が認められたものの、臨床使用にはさしつかえないと判断してよいと思われる。

また塩田ら⁶⁾は、DHPG軟膏は0.3%の濃度で3% ACV軟膏を上回る感染防止効果および治療効果を持つことを報告している。したがって、今後さらに検討された後に臨床応用されることと思われるが、現在市販されているACV眼軟膏の濃度が3%であり、これ以上の効果を持つ0.3%DHPGでは、今回の研究結果により副作用を生じることは非常に少ないことが想像される。さらに、たとえ今回ごく軽度の細胞毒性を示した3%DHPG軟膏を用いたとしても、その副作用の程度は非常に軽く、十分に臨床使用出来るものと思われる。またDHPGはACVに比べ水に溶けやすく(飽和濃度0.7%)¹⁾、眼軟膏だけでなく点眼液としても使用可能と思われ、現在点眼液の抗ヘルペス効果ならびに細胞毒性について検討中である。

なお、本実験に用いた DHPG は、米国の Syntex Research から供与されたものである。

文 献

- 1) **Smith KO, Galloway KS, Donell WL, et al:** A new nucleoside analog, 9-[[2-hydroxy-1-(hydroxymethyl) ethoxy] methyl] guanine, highly active in vitro against herpes simplex virus type 1 and 2. *Antimicrob Agents Chemother* 22: 55—61, 1982.
- 2) **Smee DF, Martin JC, Verheyden JPH, et al:** Anti-herpesvirus activity of the acyclic nucleoside 9-(1,3-dihydroxy-2-propoxymethyl) guanine. *Antimicrob Agents Chemother* 23: 676—682, 1983.
- 3) **Cheng Y-C, Grill SP, Dutschman GE, et al:** Metabolism of 9-1,3-dihydroxy-2-propoxymethyl) guanine, a new anti-herpes' virus compound, in herpes simplex virus-infected cells. *J Biol Chem* 258: 12460—12464, 1983.
- 4) 小川剛史: 走査電子顕微鏡による新しい各種点眼薬の毒性研究. *日眼* 88: 1093—1106, 1984.
- 5) 内藤 毅, 塩田 洋, 新田敬子, 三村康男: 角膜ヘルペス治療上における副作用の検討. *眼紀* 37: 849—852, 1986.
- 6) **Shiota H, Naito T, Mimura Y:** Anti-herpes simplex virus (HSV) effect of 9-(1,3-dihydroxy-2-propoxymethyl) guanine (DHPG) in rabbit cornea. *Curr Eye Res* 6: 241—245, 1987.