

# 電顕的酵素抗体法による単純ヘルペスウイルス感染 細胞中の抗原局在について

—培養細胞における5-trifluoromethyl-2'-deoxyuridine (F<sub>3</sub>TdR)の影響— (図8)

山 根 晃 (広島大学医学部眼科学教室)

## 要 約

培養細胞 (SIRC細胞) に herpes simplex virus (HSV) 1型を感染させ、5-trifluoromethyl-2'-deoxyuridine (F<sub>3</sub>TdR) のウイルス粒子およびウイルス関連抗原の分布に与える影響を、通常電顕ならびに酵素抗体直接法を用いた免疫電顕で観察し、次の結果が得られた。1) F<sub>3</sub>TdR 存在下では細胞変性効果は対照群と比べて弱く、新生ウイルス粒子の数は著明に少なかった。新生ウイルス粒子のコアとカプシドは、形態学的に対照群と比べて差はなかったが、エンベロープを獲得したウイルス粒子はなかった。2) F<sub>3</sub>TdR 存在下では核内のウイルス関連抗原は時間とともに増強し、びまん性に認められたが、細胞質の抗原物質は対照群と比べて少なく、ウイルス関連抗原の核内偏在が認められた。3) 以上のことから、F<sub>3</sub>TdR 存在下では capsid assembly と envelopment が障害されるものと考えられ、これらは産生抗原の偏在に象徴されるような、蛋白合成障害によるものと推測された。(日眼会誌 93:651-664, 1989)

キーワード：トリフルオロサイミジン、単純ヘルペスウイルス、免疫電顕、酵素抗体法直接法、培養細胞

## Effects of 5-Trifluoromethyl-2'-Deoxyuridine (F<sub>3</sub>TdR) on Ultrastructural Localization of Viral Antigens in Cultured Cells Infected with Herpes Simplex Virus (HSV)

Akira Yamane

*Department of Ophthalmology, Hiroshima University School of Medicine*

### Abstract

Changes in localization of virus-associated antigens induced by F<sub>3</sub>TdR were studied using HSV-1 infected monolayer of cultured SIRC cells. A direct enzyme-antibody method was employed for preembedding for immunoelectron and light microscopy. At 3 hours post infection (h.p.i.), immunoreaction products began to appear in cytoplasm and nuclei in both the control and the F<sub>3</sub>TdR-treated group. The amounts increased during the subsequent hours of observation. In the control group, there was an intense diffuse immunoreaction in the cytoplasm and nuclei and dense accumulations of the reaction products were seen on the cell surfaces. In F<sub>3</sub>TdR-treated cells, intranuclear antigens were present as diffuse accumulations of granular deposits, and cytoplasmic stainings were very much reduced in degree; deposits on the cell surface were a rare finding. Progeny virus particles were significantly fewer in the presence of F<sub>3</sub>TdR; nucleocapsids were found but in a greatly reduced number and no enveloped particle was found. The morphology of individual nucleocapsid, however,

別刷請求先：734 広島市南区霞1-2-3 広島大学医学部眼科学教室 山根 晃  
(昭和63年10月25日受付、平成元年5月9日改訂受理)

Reprint requests to: Akira Yamane, M.D. Dept. of Ophthalmol., Hiroshima Univ. School of Med.  
1-2-3 Kasumi, Minami-ku, Hiroshima 734, Japan

(Received October 25, 1988 and accepted in revised form May 9, 1989)

was not significantly altered by treatment with  $F_3$ TdR. A preponderance of antigenic substances in the nuclei over the cytoplasm in treatment group may reflect distorted protein synthesis and may provide morphological evidence of the biochemically assumed hypothesis of  $F_3$ TdR efficacy;  $F_3$ TdR exerts its antiviral effects through abnormal protein synthesis and resultant defects in capsid assembly. Decreased antigenic substances in the membranous structures of cytoplasm may be related to reduced or abnormal production of viral antigens closely associated with envelopment. (Acta Soc Ophthalmol Jpn 93: 651-664, 1989)

**key words:** Trifluorothymidine, Herpes simplex virus, Immunoelectron microscopy, Enzyme antibody method, Cultured cell

## I 緒言

抗ヘルペス剤のひとつである5-trifluoromethyl-2'-deoxyuridine (Trifluorothymidine,  $F_3$ TdR)は、1964年 Heidelberg 等<sup>1)</sup>により抗癌剤として合成された thymidine 類似化合物で、5-iodo-2'-deoxyuridine (IDU)とよく似た構造を有する薬剤である。 $F_3$ TdR は実験的角膜ヘルペスに対して有効なことが示され<sup>2)</sup>、臨床的にも有効性が確認されている<sup>3)</sup>。その作用機序は thymidylate synthetase の阻害<sup>4)</sup>、thymidine kinase の競合阻害<sup>5)</sup>、DNA polymerase の阻害<sup>6)</sup>、DNA に取り込まれてウイルス蛋白の合成を障害すること<sup>7)</sup>などの可能性が示されている。しかし、これらの報告は主に vaccinia virus を用いた実験で行なわれており、herpes simplex virus type 1 (HSV-1) を用いたものの研究は少なく、特に HSV-1 の形態およびウイルス感染細胞中の抗原局在に与える影響を検討した報告は見当たらなかった。これらの点について、今回、通常の電子顕微鏡的観察と電顕的酵素抗体法による観察を行ない検討した。

## II 実験方法

### 1. 培養細胞と herpes simplex virus type 1 (HSV-1)

培養細胞は継代培養された rabbit corneal cell (SIRC 細胞)<sup>8)</sup>を使用した。増殖には10%の calf serum (KC Biological 社) および penicillin (100U/ml)、streptomycin (100 $\mu$ g/ml) を加えた Eagle's minimal essential medium (MEM) を用い、カバーガラス上に monolayer を作成した。維持のためには calf serum を2%とした。ウイルスとしては角膜ヘルペス患者の角膜擦過材料から分離した HSV-1 型ウイルス (Moto 株) を使用した。その感染価は microtiter 法によって  $10^{6.8}$ TCID<sub>50</sub>/ml であった。また、この HSV 株は  $F_3$ TdR 感受性株であり、その最小阻止濃度は吉田ら<sup>9)</sup>の報告した感受性試験に準じて行い、5 $\mu$ g/ml であった。

### 2. $F_3$ TdR 液

Eagle's MEM に  $F_3$ TdR (Thilo 社) を10 $\mu$ g/ml の濃度で含ませたものを作成し、濾過滅菌後-20℃で保存したものを使用した。

**Fig. 1** Photomicrographs of monolayer SIRC cells at three periods of infection. left: HSV infection without  $F_3$ TdR treatment (control), right: HSV infection with  $F_3$ TdR treatment. (Papanicolaou stain,  $\times 320$ )  
(upper) At 3 hours post infection (h.p.i.) nuclear chromatin becomes irregular and nucleoli are distorted. Cytoplasmic vacuolar alterations also noted. The difference between both groups is not significant.  
(middle) At 6h.p.i. cytoplasmic vacuolization is prominent and cells are swollen in control group. In  $F_3$ TdR-treated cells these changes are less in degree.  
(lower) At 12h.p.i. HSV-infected cells are rounded and cytopathological effects are generally more prominent in control group. Nuclei show ground glass appearance in untreated cells, while remnants of chromatin structures are still present in  $F_3$ TdR-treated cells.

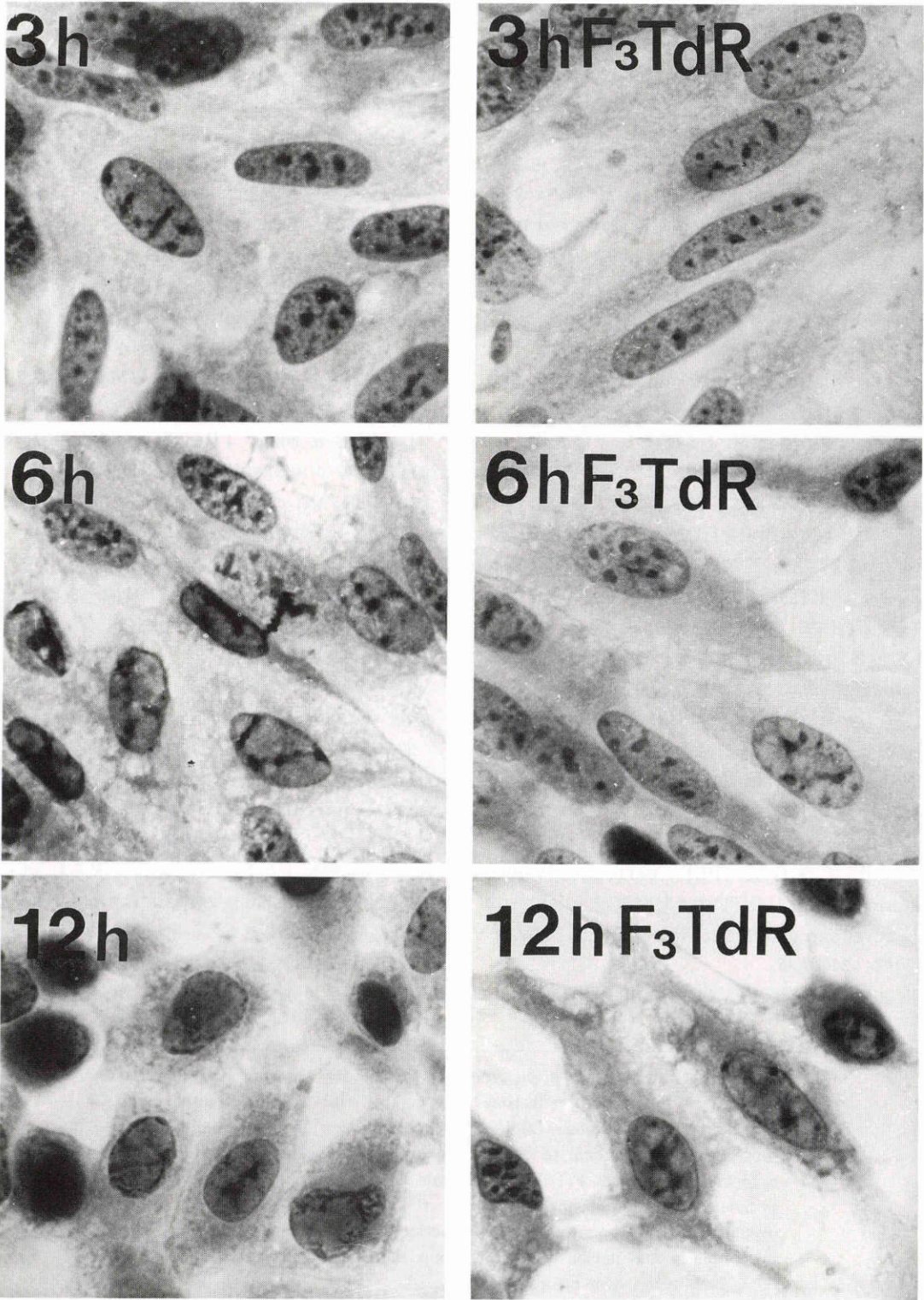


Fig. 1

### 3. HSV の接種

角チューブ中の cover slip (12×18mm) 上に SIRC 細胞の monolayer (3~4×10<sup>5</sup> cells/cover slip) を作成したのち, multiplicity of infection が10前後となるように HSV をふくむ medium 0.5ml を角チューブ中に入れ, 37°C で1時間ウイルスを吸着させた。その後 cover slip を phosphate buffer saline (PBS) で3回洗い, F<sub>3</sub>TdR を含む培養液と含まない培養液中にて 37°C で培養した。培養 3, 6, 12時間後に取り出し, 以下の検索にあてた。

### 4. 観察方法

#### (1) ババニコロウ染色

ババニコロウ染色は cover slip を PBS で洗浄後 95% アルコールで固定し, 型の通り染色した。

#### (2) 通常の電子顕微鏡による観察

通常の電子顕微鏡による観察には, PBS で洗浄後, グルタルアルデヒドによる固定を行なったのち, 2% オスミウム酸再固定を行なった。型通り脱水, 包埋を行ない, 薄切後, 酢酸ウラニール・鉛 2 重染色ののち, 電子顕微鏡の観察を行なった。

#### (3) 酵素抗体法

酵素抗体法は cover slip 上の HSV 感染細胞は PBS で洗浄後, 酵素抗体法を行い, 電顕的観察と光顕的観察を行った。酵素抗体法は Nakane<sup>10)</sup>, 渡辺<sup>11)</sup>の方法に準じて, 直接法 (preembedding direct peroxidase-labelled antibody method) を行なった。操作はすべて約 5°C に氷冷して以下のように行なった。

1) PBS で洗浄後, PLP (periodate-lysine-paraformaldehyde) 液<sup>12)</sup>にて 4 時間固定。

2) cover slip を取り出し PBS (pH7.2, 0.01M) で 1 分間, 3 回洗浄。

3) 10% 蔗糖および 4×10<sup>-5</sup>M digitonin 加 phos-

phate buffer (PB) (pH7.2, 0.05M) に 3 時間浸漬。

4) 15% 蔗糖加 PB に 3 時間浸漬。

5) 20% 蔗糖加 PB に 3 時間浸漬。

6) 20% 蔗糖, 10% グリセリン加 PB に 1 時間浸漬。

7) クライオスタート中で急速に氷結, 自然融解。

8) 10% 蔗糖加 PBS 中で洗浄。

9) 10% 末感作家兎イムノグロブリン (DAKO 社製) で前処理, 30分。

10) 10% 蔗糖加 PBS で洗浄 10分×3 回。

11) ペルオキシダーゼ標識抗 HSV1 型抗体 (DAKO 社製) で 1 晩 incubation (50 倍希釈)。

12) 10% 蔗糖加 PBS で洗浄 30分×4 回。

13) 1% グルタル・アルデヒドで処理, 5 分。

14) PBS 洗浄 5 分×5 回。

15) DAB 液 (30mg, 4-HCl diaminobenzidine+100 ml pH7.7 トリス塩酸緩衝液) に 2 時間浸漬。

16) 0.004% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 加 DAB 液で 5~10 分発色。

17) PBS で洗浄 5 分×3 回。

18) 2% オスミウム酸再固定, 2 時間。

19) 50%, 70%, 80%, 90%, 95%, 99.5%。無水アルコール系列で各 2~5 分脱水。

20) エポン包埋, 重合。

21) ガラス面を軽く加熱し, エポンブロックより cover slip を取り除く。トリミング後薄切。

22) 無染色にて電子顕微鏡の観察, 撮影を行った。

コントロール染色としては, 非標識抗 HSV 1 型抗体による blocking で著しい染色性の低下のあること, ペルオキシダーゼ標識 IgG 抗体, HSV 非接種細胞, 標識抗体の省略によりまったく染色性の見られないことを確認した。Osmophilia の確認には, オスミウム酸による再固定を省略したものをを用いた。

光顕的観察には上記のステップ<sup>17)</sup>までは同様に行い, メチルグリーンにて後染色後, 脱水, 封入を行い

**Fig. 2** Light micrographs of enzyme-antibody method showing HSV-infected cells at three periods of infection. left: control, right: F<sub>3</sub>TdR-treated cells. (direct immunoperoxidase staining with methyl-green counter staining, ×320) (upper) At 3 h.p.i. focal to diffuse fine granular deposits are seen in both cytoplasm and nuclei. F<sub>3</sub>TdR-treated cells show slightly less staining but the difference is not significant. (middle) At 6 h.p.i. in untreated cells, reaction products have increased diffusely in cytoplasm and nuclei. In F<sub>3</sub>TdR group, there is relative predominance of deposits in nuclei over cytoplasm. (lower) At 12 h.p.i. progressive increase of reaction products is noted in both groups. Nuclear predominance of the reaction is apparent in F<sub>3</sub>TdR group.

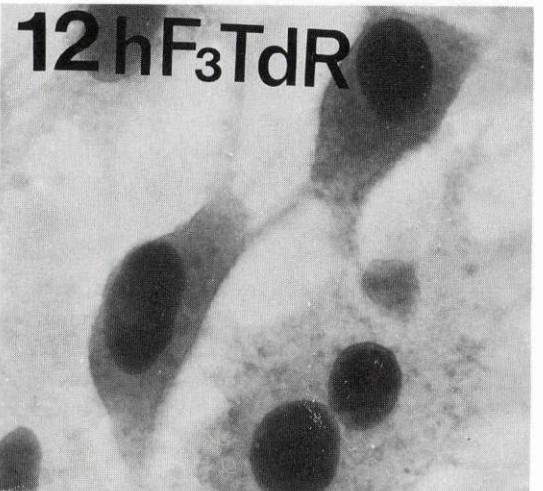
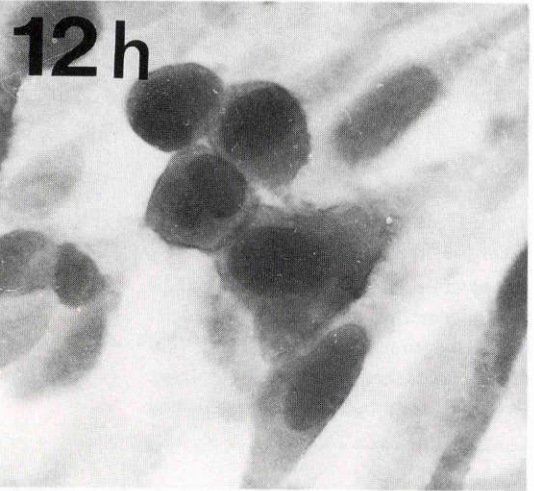
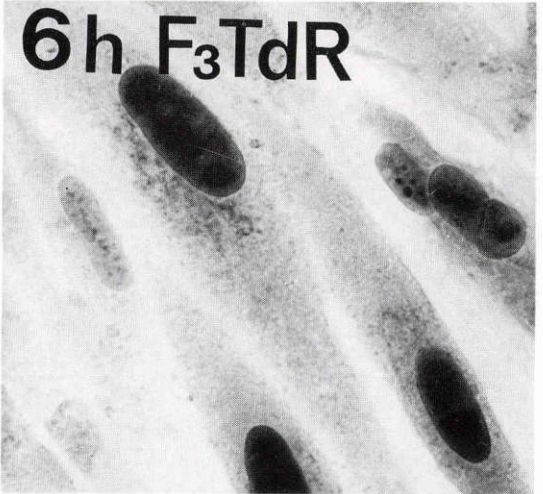
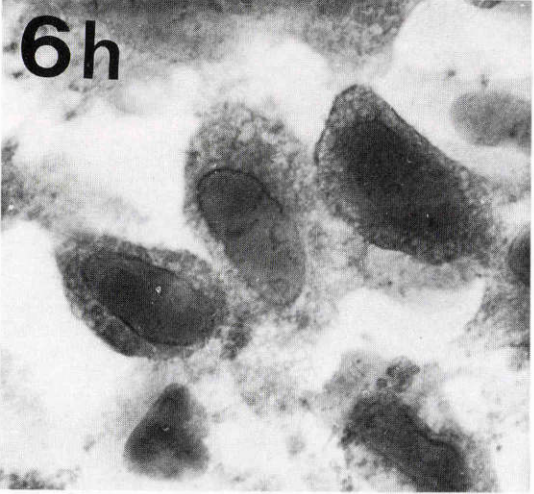
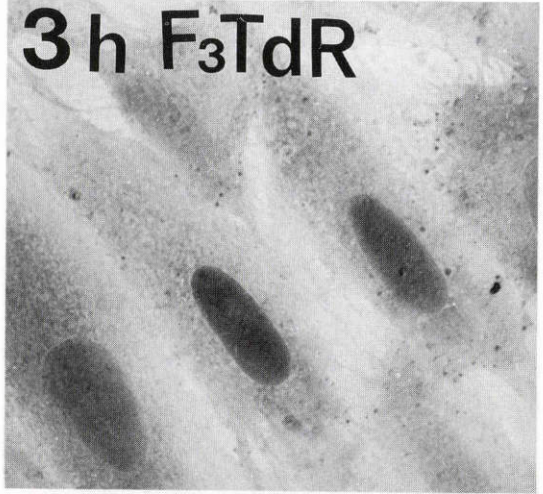
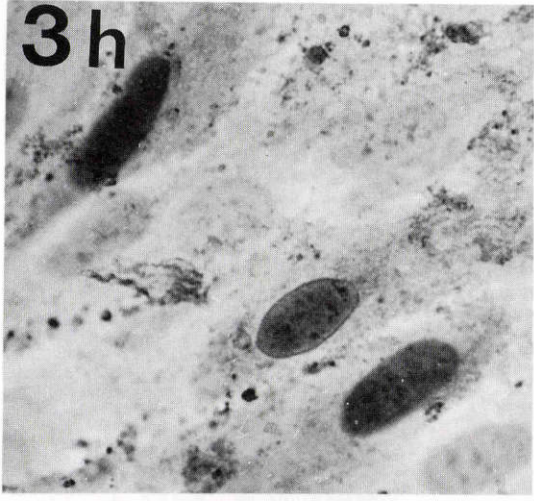
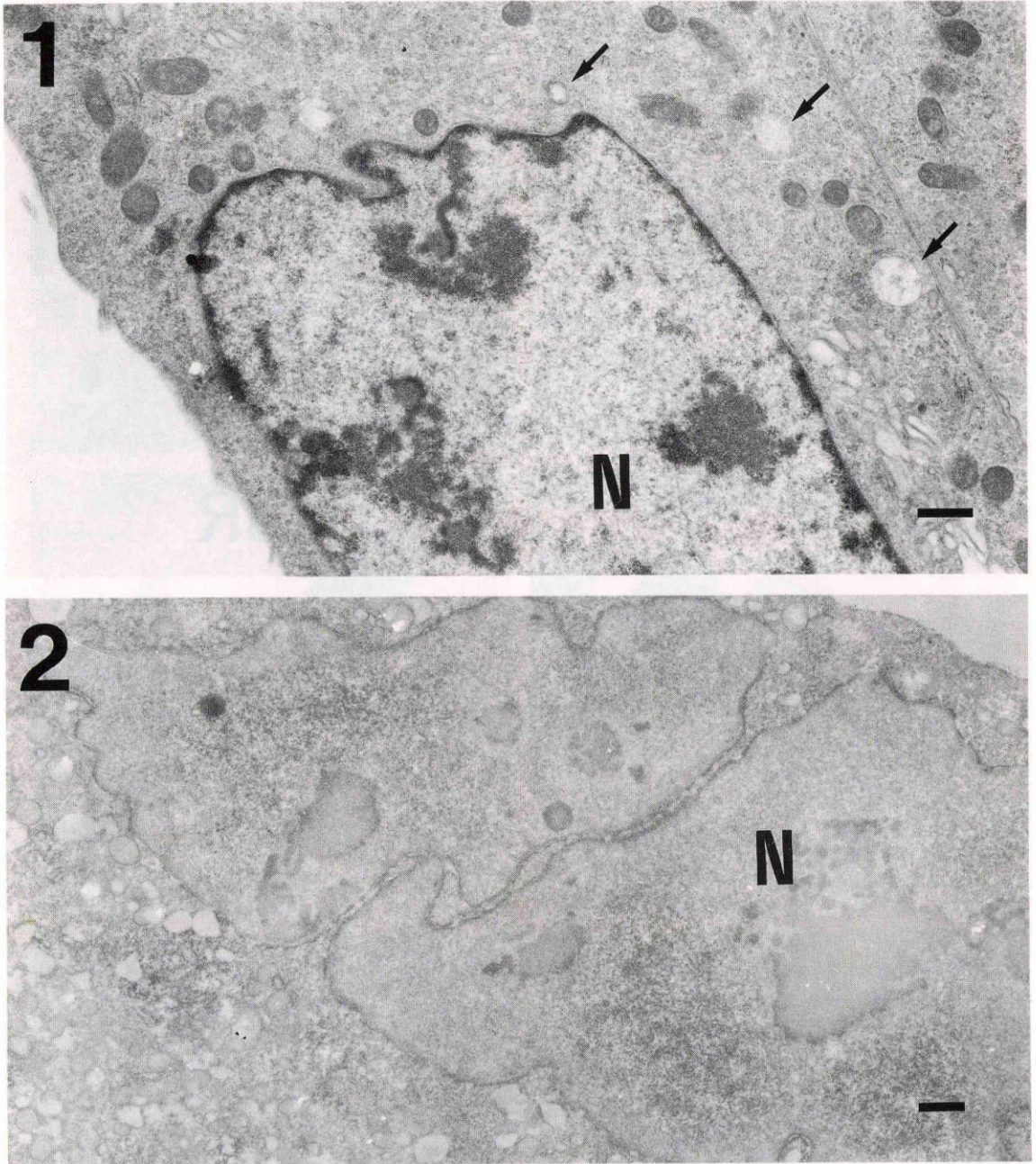
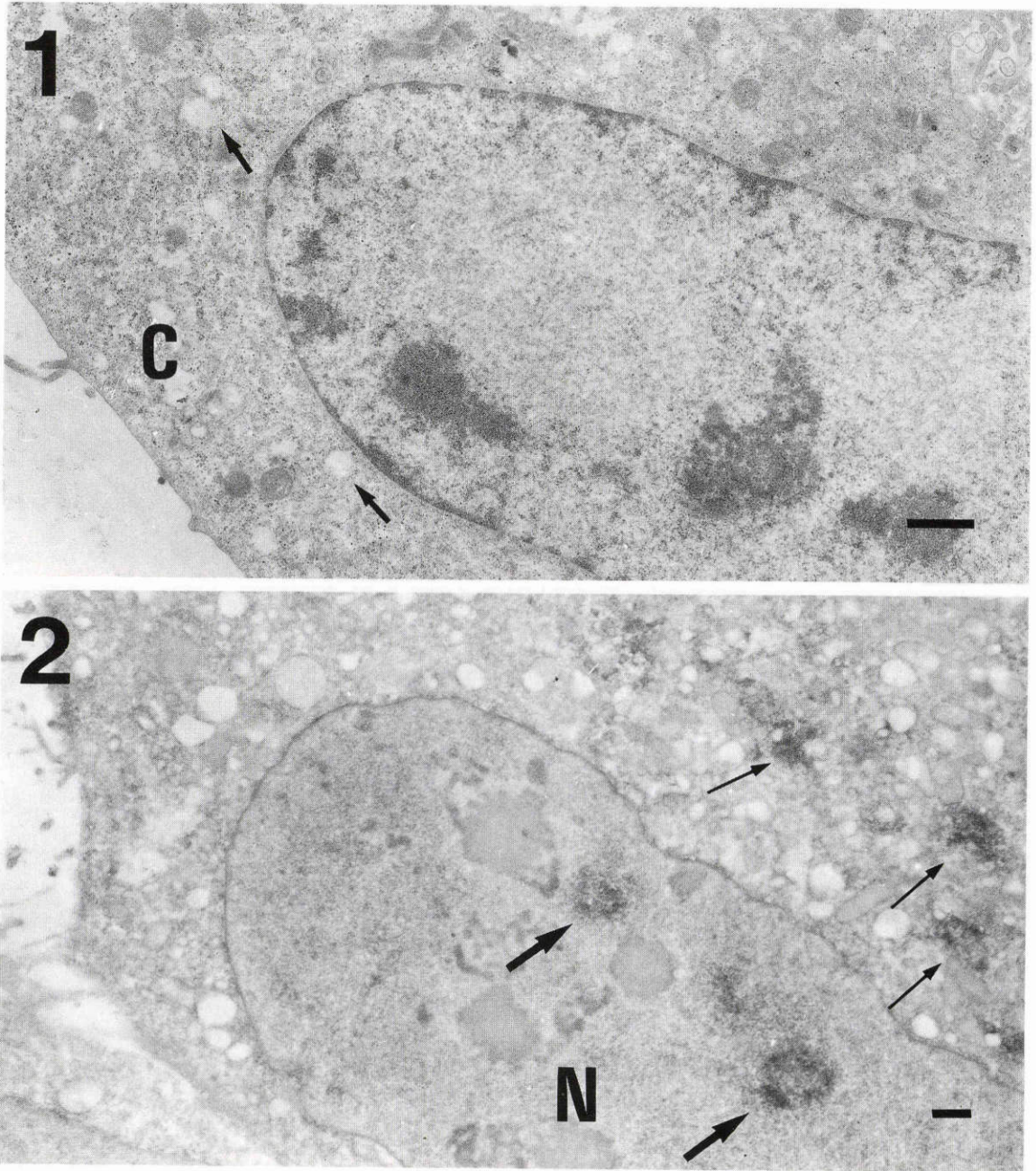


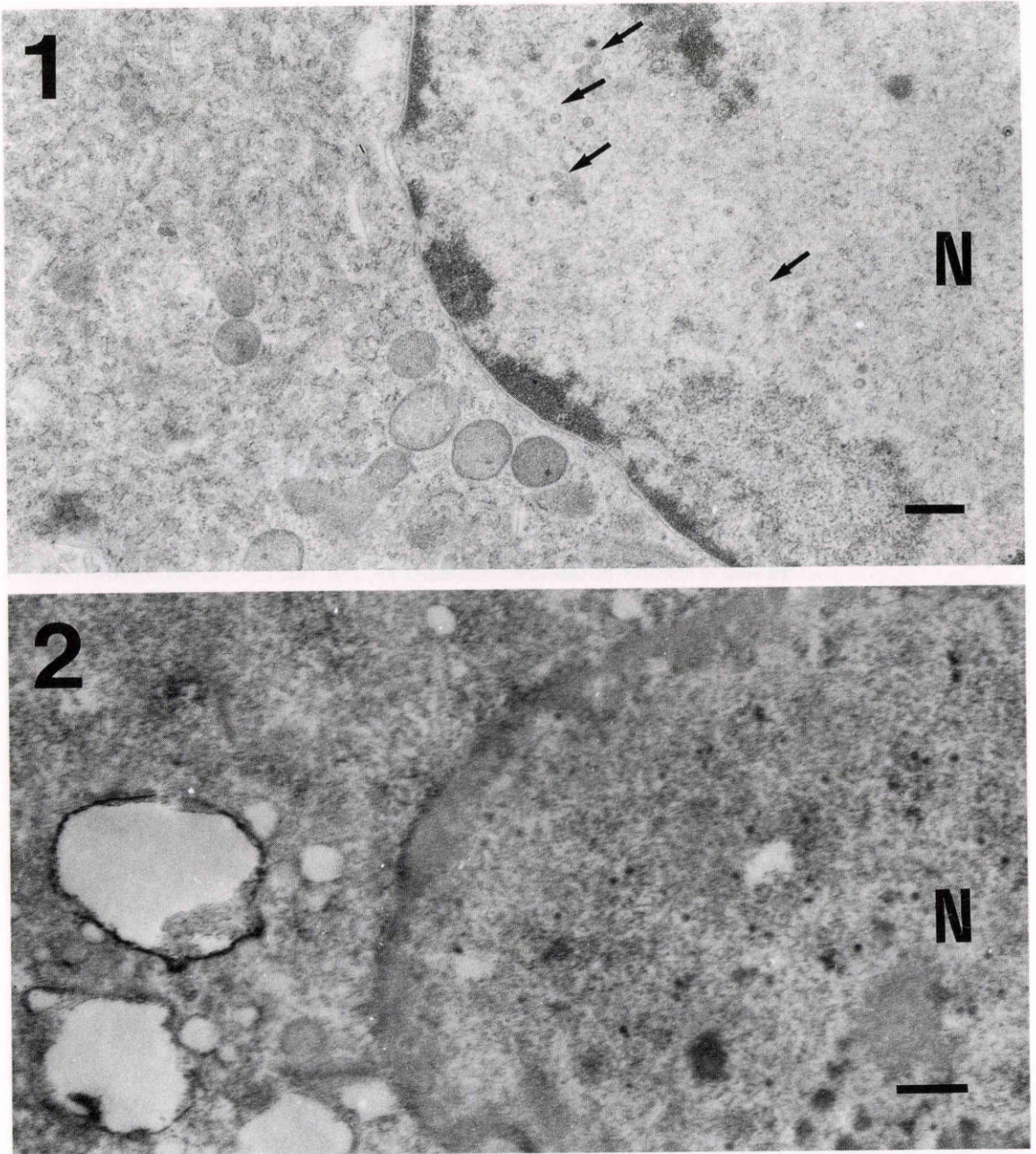
Fig. 2



**Fig. 3** Electron micrographs of HSV-infected cells at 3 h.p.i. without  $F_3TdR$  treatment (1, standard, 2, immunoelectron microscopy. Bar =  $1\mu$ )  
1, Chromatin has become sparse with early margination. Nucleoli are deformed and mildly dispersed. Note small vacuoles (arrows) in the cytoplasm.  
2, Fine granular deposits are seen relatively diffusely both in the nucleus and cytoplasm.



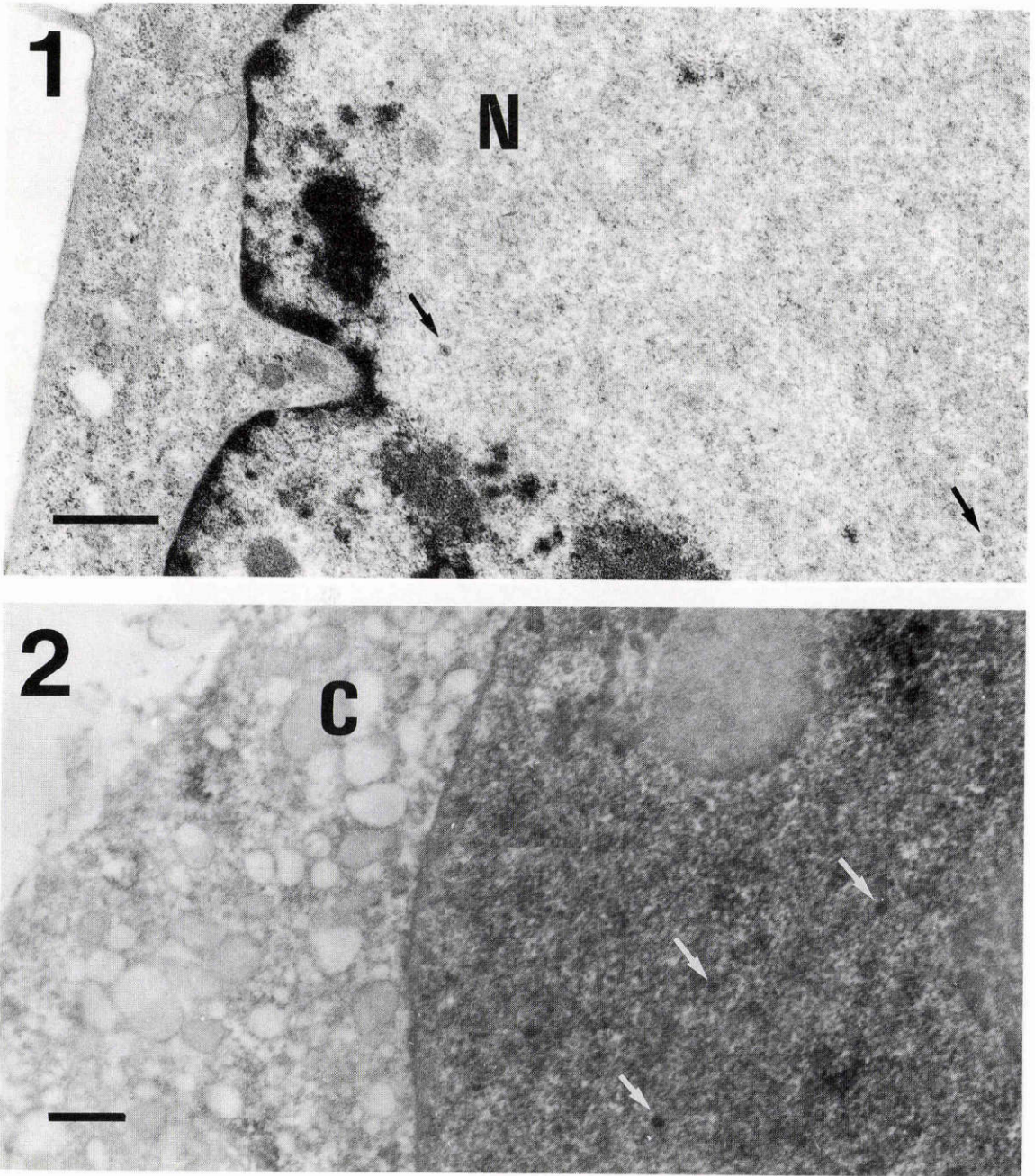
**Fig. 4** Electron micrographs of HSV-infected cells in the presence of  $F_3TdR$  at 3 h.p.i. (1. standard, 2. immunoelectron microscopy. Bar =  $1\mu$ )  
1. Nuclear chromatin is margined. Note also vacuolar changes of cytoplasm as seen in the control group (arrows). 2. Reaction product is found in a patchy distribution in the cytoplasm (small arrows) and relatively diffusely in the nucleus (large arrows).



**Fig. 5** Electron micrographs of HSV-infected cells without  $F_3$ TdR treatment at 6 h.p.i. (1. standard, 2. immunoelectron microscopy. Bar =  $1\mu$ )

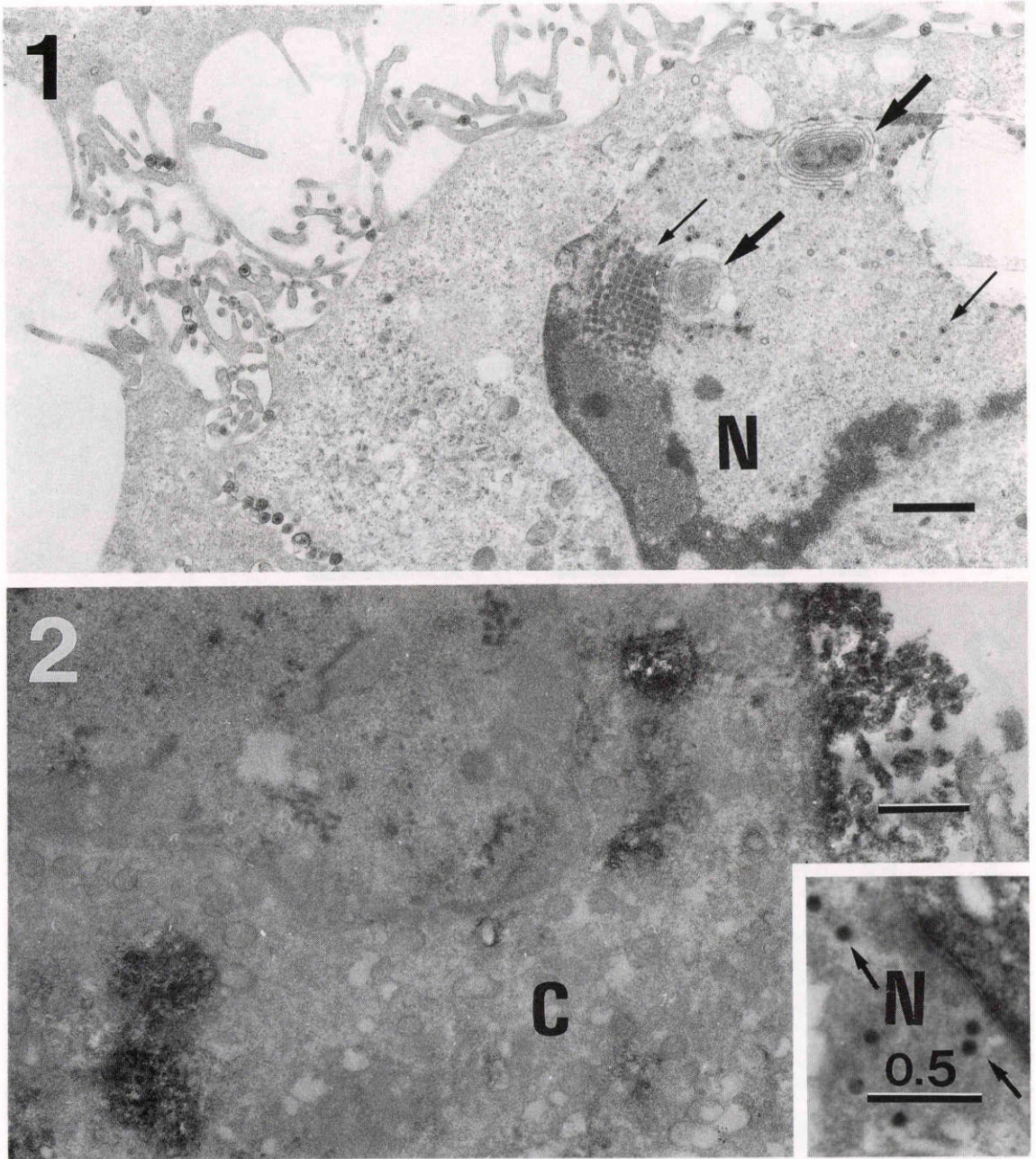
1. At this period capsid assembly has begun and viral particles (arrows) are found in the nuclei. Various granular materials are seen in the nucleus, and chromatin is marginated. 2. In the nucleus, granular aggregates of reaction products are seen. Several viral particles are also present and stained as dense black dots. Cytoplasmic structure is stained profusely and membranous structure is stained intensely.





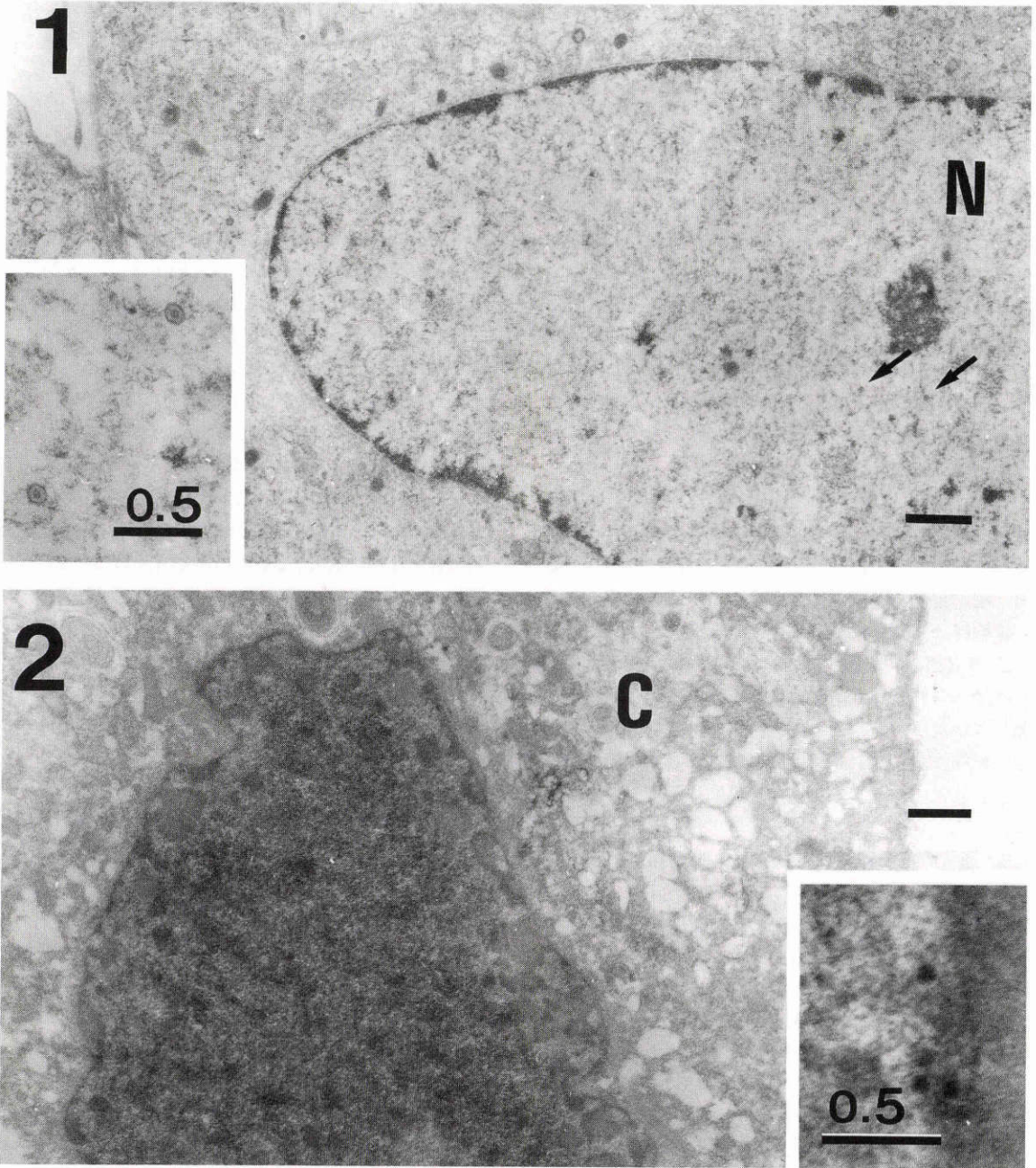
**Fig. 6** Electron micrographs of HSV-infected cells in the presence of  $F_3TdR$  at 6 h.p.i. (1, standard, 2, immunoelectron microscopy. Bar =  $1\mu$ )

1. Viral capsids are formed (arrows) but in a markedly reduced number. 2. Diffuse fine granular deposits are seen throughout the nucleus. Nuclear envelop is also stained. Cytoplasmic deposits are relatively less and viral capsids are stained as dense black dots (arrows).



**Fig. 7** Electron micrographs of HSV-infected cells without  $F_3TdR$  treatment at 12h.p.i. (1, standard, 2, immunoelectron microscopy. Bar =  $1\mu$ )

1, Many viral particles (small arrows) are seen in the nucleus. Note also enveloped particles released out of cells. Whorled membranous structures (large arrows) are seen in the nucleus. 2, The nucleus (N) and cytoplasm (C) are stained more diffusely. There are intense deposits on the surface of cell membrane. Dense black dots (arrows) are viral particles (inset).



**Fig. 8** Electron micrographs of HSV-infected cells in the presence of  $F_3TdR$  at 12 h.p.i. (1. standard, 2. immunomicroscopy. Bar= $1\mu$ )

1. A few viral particles are present in the nucleus (arrows). Viral particles are much fewer usually in  $F_3TdR$  group. Inset shows details of nucleocapsids which show essentially normal morphology. 2. Nucleus is filled with fine deposits which are granular and diffuse. Cytoplasmic staining is weaker and membranes of cytoplasmic organelles and cell surface are stained only lightly. Viral capsids are stained as dense black dots (inset).

観察した。

### III 結 果

#### 1. パパニコロウ染色

1) 対照群：培養3時間では核クロマチンは疎開化し、細胞質内の小空胞化を伴っていた。培養6時間になるとその傾向がさらに強まり、12時間になると細胞は円形化し、クロマチンの辺縁化が一層明瞭となっていた (Fig. 1左)。

2)  $F_3$ TdR群：培養3時間においては対照群と明らかな差を認めなかった。6、12時間になると細胞は円形化していたが、比較的紡錘形を保持しており、クロマチンの辺縁化は対照群と比べて軽度であり、光顕的に細胞変性効果は軽かった (Fig. 1右)。

#### 2. 光顕的酵素抗体法

1) 対照群：培養3時間では核内に均質な陽性像がみられた。6時間になると核内、および細胞質内の陽性像は増強した。12時間になると細胞は円形化し、核内、細胞質はともに強くびまん性に沈着物を認め、特に細胞膜は強染されていた (Fig. 2左)。

2)  $F_3$ TdR群：培養3時間では核内に陽性産物が均一に認められた。6時間になると核内の陽性産物は増強していたが、細胞質の陽性物質は対照群と比べて少ない傾向にあった。12時間では核内はびまん性に強く染色されていたが、細胞質の染色性は軽度で、細胞膜はほとんど染色されていなかった (Fig. 2右)。

#### 3. 通常の電子顕微鏡的観察および電顕的酵素抗体法

1) 対照群：培養3時間の通常電顕においては核内クロマチンに軽度の粗鬆化を認め、細胞質内には小空胞が出現していた (Fig. 3-1)。免疫電顕においては核内、細胞質に反応陽性産物の出現を認め、核膜は染色されていたが、細胞質はまだ染色されていなかった (Fig. 3-2)。6時間になると、通常電顕においては核内クロマチンの辺縁化が進行し、核内にはウイルス粒子が認められるようになった (Fig. 5-1)。免疫電顕においては、核内はびまん性に染色され、ウイルス粒子は点状に濃染して認められた。細胞質はびまん性に強く染色され、細胞質内膜構造も陽染して認められた (Fig. 5-2)。12時間になると通常電顕においては、核内クロマチンの辺縁化はさらに進行し、核内に層板状膜様物の形成も認められた。細胞質の変性は一層進み多数の小空胞を認めた。ウイルス粒子は核内に多数存在し、エンベロープを獲得して細胞外へ放出された粒子も認

められた (Fig. 7-1)。免疫電顕においては核内、細胞質の陽性産物はさらに増加し、核膜、細胞膜は強く染色されていた (Fig. 7-2)。

2)  $F_3$ TdR群：培養3時間では通常電顕においては、対照群と同様にクロマチンの粗鬆化を認め、細胞質内には小空胞が出現していた (Fig. 4-1)。免疫電顕においては、核内には反応産物がびまん性に、あるいは小巣状に認められ、核膜も染色されていた。細胞質の一部にも反応産物が認められた (Fig. 4-2)。6時間の通常電顕においては、核内クロマチン辺縁化を認めたが、対照群と比べて軽度であった。核内にはウイルス粒子が出現していたが、対照群と比べて極めて少数しか認められなかった (Fig. 6-1)。免疫電顕では、核内はびまん性に染色されるようになったが、細胞質の染色性は弱い傾向を示していた。ウイルス粒子は黒染して認められた (Fig. 6-2)。12時間の通常電顕においては、核内クロマチンの辺縁化を認めたが、その程度は対照群と比べて軽く、細胞質の空胞化も軽度であった。新生ウイルス粒子の数は極めて少なく、エンベロープを有するものはなかった。新生ウイルス粒子のコアの電子密度は様々で、高い電子密度をもつものも認められた (Fig. 8-1)。免疫電顕において、核内はびまん性に強く染色されていたが、細胞質、細胞膜の染色性は弱かった (Fig. 8-2)。

### IV 考 按

$F_3$ TdRがHSVの増殖を抑える作用機序については、DNA合成過程での酵素を阻害して、ウイルスDNAの合成を障害すること<sup>4)~6)</sup>や、 $F_3$ TdRがウイルスDNAに取り込まれることにより、ウイルス蛋白の合成を障害すること<sup>7)</sup>などが報告されている。しかし、 $F_3$ TdRの抗ウイルス作用はthymidineをあとから加えても非可逆性であること<sup>13)</sup>から、おもには後者によると考えられている<sup>14)</sup>。

$F_3$ TdRがウイルスDNAに取り込まれることによっておこる作用についてはvaccinia virusを用いたFujiwaraら<sup>15)</sup>、Okiら<sup>16)</sup>、Dexterら<sup>17)</sup>、Heidelbergerら<sup>7)</sup>の一連の詳細な報告がある。これらを要約すると、 $F_3$ TdRを取り込んだウイルスDNAは通常よりも分子量が小さいため、このDNAをもとに作られるlate mRNAにも異常が起こり、late proteinの一部欠損および通常では認められない蛋白の産生などの異常な蛋白合成を起こす。その結果、 $F_3$ TdR存在下の新生ウイルス粒子は形態的に異常で、感染性は低下する。そし

て、この  $F_3$ TdR を含んだウイルス粒子を他の細胞に感染させることはできるが、early mRNA は正常には転写されない。また  $F_3$ TdR 存在下の DNA はすべてが assembly されるのでなく、50%しか recoate (DNase の作用を受けない状態) されないと報告されている。しかし、HSV においても同様の作用機序が働くかどうかは確かめられていない<sup>7)</sup>。

今回の実験では、 $F_3$ TdR 存在下で HSV 吸着後12時間までの培養細胞を観察した。通常電顕では感染細胞の細胞変性効果は軽度で、新生ウイルス粒子の数は極めて少なかった。コアおよびカプシドの形態は対照群と差がなかったが、エンベロープを獲得したウイルスは見出されなかった。また HSV 抗原の細胞内分布に対する  $F_3$ TdR の影響を見ると、核内の染色性はびまん性に認められ、時間経過とともに徐々に増強したが、細胞質、細胞膜の染色性は12時間になっても弱かった。すなわち核内に移行するような蛋白は産生されるが、細胞質内にとどまるような蛋白の産生は少なく、 $F_3$ TdR 存在下でのウイルス抗原の産生には偏りがあることが示唆された。また、新生ウイルス粒子は用いた抗体と対照群と同様に反応しており、その抗原性に大きな差はなかった。

以上の所見から  $F_3$ TdR の作用を考えてみると、まず capsid assembly の障害が考えられた。 $F_3$ TdR 存在下で新生された nucleocapsid の数が少なかった理由としては、structural protein が質的に異常であった可能性、量的に少なかった可能性、あるいは充分産生されていても assembly されなかった可能性が考えられる。 $F_3$ TdR 存在下での nucleocapsid はその形態も抗原性も対照群と比べて差がなかったので、nucleocapsid を構成する蛋白には質的な異常はなかったと考えられる。また、HSV の capsid assembly は核内でおこるが、 $F_3$ TdR 存在下の核内にはウイルス抗原が充満していたので、structural protein が量的に少なかったと考えるよりも、capsid assembly が障害されたことにより、nucleocapsid の数が少なかったと考えるほうが妥当と思われる。Fujiwara ら<sup>15)</sup>が報告した  $F_3$ TdR 存在下の DNA は50%しか recoate されないという生化学的結果は、このことを裏付けるものかもしれない。

$F_3$ TdR のもうひとつの作用として、envelopment の障害があげられる。エンベロープは感染の際に重要な役割を果たすとされている<sup>16)</sup>が、 $F_3$ TdR 存在下では、エンベロープを獲得したウイルス粒子はなかった。これは、通常のエンベロープ獲得の場である細胞質に

ウイルス抗原が少なかったことから、エンベロープ獲得に必要な抗原物質が産生されないか、産生されても質的な異常があるためと考えられる。

以上の capsid assembly と envelopement の障害はウイルス抗原の偏りに象徴されるようなウイルス蛋白合成の異常に基づくものと考えられ、これはおそらく  $F_3$ TdR がウイルス DNA に取り込まれることによって生じたものと推測される。

今回得られた実験結果は同じ感染系を用い、同じ方法で IDU の影響を観察した吉田<sup>19)</sup>の結果とほぼ同様であった。これは  $F_3$ TdR と IDU はよく似た thymidine 類似化合物であるためと考えられ、 $F_3$ TdR と IDU の HSV に対する作用機序には大きな差はないと考えられた。

稿を終えるに当たり、ご校閲いただきました調枝寛治教授に深謝します。終始、ご指導いただきました広島記念病院吉田秀人先生、広島大学 坂田広志講師、広島鉄道病院理岩本俊之先生に厚く感謝します。

#### 文 献

- 1) Heidelberg C, Parsons DG, Remy DC: Synthesis of 5-trifluoromethyluracil and 5-trifluoromethyl-2'-deoxyuridine. J Med Chem 7: 1-5, 1964.
- 2) Kaufman HE, Heidelberg C: Therapeutic antiviral action of 5-trifluoromethyl-2'-deoxyuridine in herpes simplex keratitis. Science 145: 585, 1964.
- 3) Wellings DC, Awdry PN, et al: Clinical evaluation of trifluorothymidine in the treatment of herpes simplex corneal ulcers. Am J Ophthalmol 73: 932-942, 1972.
- 4) Reyes P, Heidelberg C: Fluorinated pyrimidines XXVI Mammalian thymidilate synthetase: Its mechanism of action and inhibition by fluorinated nucleotides. Mol Pharmacol 1: 14-30, 1965.
- 5) Bresnick E, Williams SS: Effects of 5-trifluoromethyldeoxyuridine upon deoxythymidine kinase. Biochem Pharmacol 16: 503-507, 1967.
- 6) Tone H, Heidelberg C: Fluorinated pyrimidines XLIV Interaction of 5-trifluoromethyl-2'-deoxyuridine-5'-triphosphate with deoxyribonucleic acid polymerases. Mol Pharmacol 7: 653-662, 1973.
- 7) Heidelberg C, King DH: Trifluorothymidine. Pharmacol Ther 6: 427-442, 1979.
- 8) Leerhøf J: Cytopathic effect of rubella virus in a cornea cell line. Science 149: 633-634,

- 1965.
- 9) 吉田秀人, 坂田広志, 日山 昇他: 酵素抗体法による単純ヘルペスウイルスの IDU 感受性試験の試み. 臨眼 46: 43-46, 1982.
  - 10) Nakane PK: Recent progress in the peroxidase-labeled antibody method. Ann NY Acad Sci 254: 203-211, 1975.
  - 11) 渡辺慶一: 酵素抗体法. 東京, 学際企画, 137-167, 1985.
  - 12) McLean IW, Nakane PK: Periodate-lysine-paraformaldehyde fixative, a new fixative for immunoelectron microscopy. J Histochem Cytochem 22: 1077-1083, 1974.
  - 13) Umeda M, Heidelberger C: Fluorinated pyrimidines XXXI. Mechanisms of inhibition of vaccinia virus replication in HeLa cells by pyrimidine nucleosides. Proc Soc Exp Biol Med 130: 24-29, 1969.
  - 14) Kaplan A: The Herpesviruses. New York and London, Academic Press, 654-655, 1973.
  - 15) Fujiwara Y, Heidelberger C: Fluorinated pyrimidines XXXVIII The incorporation of 5-trifluoromethyl-2'-deoxyuridine into the deoxyribonucleic acid of vaccinia virus. Mol Pharmacol 6: 281-291, 1970.
  - 16) Oki T, Heidelberger C: Fluorinated pyrimidines XXXIX Effects of 5-trifluoromethyl-2'-deoxyuridine on the replication of vaccinia viral messenger ribonucleic acid and protein. Mol Pharmacol 7: 653-662, 1971.
  - 17) Dexter D, Oki T, et al: Fluorinated pyrimidines XLII. Effect of 5-trifluoromethyl-2'-deoxyuridine on transcription of vaccinia viral messenger ribonucleic acid. Mol Pharmacol 9: 283-296, 1973.
  - 18) Kaplan A: The Herpesviruses. New York and London, Academic Press, 155-157, 1973.
  - 19) 吉田秀人: 電顕的酵素抗体法による単純ヘルペス感染細胞中の抗原局在について一培養細胞における 5-iodo-2'-deoxyuridine (IDU) の影響. 日眼 86: 850-866, 1982.