

## ヘルペス性角膜炎より分離された HSV-1 株の 抗ウイルス剤感受性

森 康子\*, 井上 幸次\*, 下村 嘉一\*\*, 真鍋 禮三\*

\*大阪大学医学部眼科学教室, \*\*大阪労災病院眼科

### 要 約

ヘルペス性角膜炎患者34例35眼より分離した単純ヘルペスウイルス1型 (HSV-1) 株について, *in vitro* における5-iodo-2'-deoxyuridine (IDU) および acyclovir (ACV) に対する感受性を検査し, それら薬剤の臨床的治療効果と比較した。方法はプラーク減少法によりコントロールのプラーク数を50%にする抗ウイルス剤の濃度を求め, これを ED<sub>50</sub> (effective dose<sub>50</sub>) とした。また, 各株の分離時の治療内容について調査した。IDU の ED<sub>50</sub> は 0.073~0.77 μg/ml (0.33±0.16) であり, ACV の ED<sub>50</sub> は 0.0032~0.33 μg/ml (0.13±0.11) であった。抗ウイルス剤が臨床的に奏効しなかった症例においてもその分離株は良好な薬剤感受性を示し, *in vitro* では IDU および ACV に耐性と考えられる株は, 今回の臨床分離株からは検出されなかった。(日眼会誌 94: 484-487, 1990)

キーワード: ヘルペス性角膜炎, HSV-1 (herpes simplex virus type 1), IDU, ACV, ウイルス ED<sub>50</sub>

## In Vitro Sensitivity to Antiviral Agents of Herpes Simplex Viruses Isolated from Patients with Herpetic Keratitis

Yasuko Mori\*, Yoshitsugu Inoue\*, Yoshikazu Shimomura\*\* and Reizo Manabe\*

\*Department of Ophthalmology, Osaka University Medical School

\*\*Eye Clinic, Osaka Rosai Hospital

### Abstract

Thirty-five clinical isolates of herpes simplex virus type 1 (HSV-1) from 34 patients (35 eyes) with herpetic keratitis were examined *in vitro* for 5-iodo-2'-deoxyuridine (IDU) and acyclovir (ACV) sensitivity. In addition, the effect of clinical treatment with these two drugs in herpetic keratitis was also investigated. The viral effective dose<sub>50</sub> (ED<sub>50</sub>) was defined as the concentration that inhibited the plaque count by 50% compared to the count of the no drug controls. The viral ED<sub>50</sub> of IDU ranged from 0.073 to 0.77 μg/ml (0.33±0.16; Mean±SD) and that of ACV from 0.0032 to 0.33 μg/ml (0.13±0.11). No virus with markedly diminished sensitivity to IDU and ACV was found. These results suggest that all HSV-1 strains isolated from patients have good sensitivity *in vitro* to antiviral agents. (Acta Soc Ophthalmol Jpn 94: 484-487, 1990)

Key words: Herpetic keratitis, Herpes simplex virus type 1, IDU, ACV, Viral ED<sub>50</sub>

別刷請求先: 553 大阪市福島区福島1-1-50 大阪大学医学部眼科学教室 森 康子

(平成元年9月2日受付, 平成元年10月18日改訂受理)

Reprint requests to: Yasuko Mori, M.D. Dept. of Ophthalmol., Osaka University Medical School  
1-1-50, Fukushima, Fukushima-ku, Osaka 553, Japan

(Received September 2, 1989 and accepted in revised form October 18, 1989)

## I 緒 言

現在、角膜ヘルペスにおける治療には抗ウイルス剤が不可欠となっている。眼科領域における抗ウイルス剤としては、従来より5-iodo-2'-deoxyuridine (IDU) が点眼または塗布剤として使用されてきたが、びまん性表層角膜炎、濾胞性結膜炎などの副作用が問題であった。その上、上皮性病変の治癒率も充分ではなかった。1977年、Acyclovir (ACV) が開発されて以来、その治療効果の良さ、作用機序の合理性から考えて優れた抗ウイルス剤であると評価されてきた<sup>1)</sup>。実際、眼科領域のヘルペス感染症の治療においても劇的な治療効果をもたらした。

しかし、抗ウイルス剤の開発が進む反面、各薬剤に対する耐性株の出現が問題となってきた<sup>2)~4)</sup>。事実、IDU で角膜ヘルペス患者を治療しても、しばしば治癒しない例に遭遇するが、これがすべて耐性株による角膜炎とは限らず、IDU の副作用のため、かえって潰瘍が悪化する場合もあることを考慮すると、角膜炎を惹起している単純ヘルペスウイルス1型 (HSV-1) が真に IDU 耐性株であるかどうかは判断し難い。

そこで今回、我々は、角膜ヘルペス患者より分離された HSV-1 株について、*in vitro* における IDU および ACV の感受性を検査し、耐性株の存在について調査し、臨床的效果と比較検討した。

## II 対象および方法

1985年1月から1989年6月までの間に大阪大学眼科において角膜ヘルペスと診断し、HSV-1を分離し得た症例34例35眼(男31例32眼、女3例3眼、平均年齢43歳)を対象とした。

### 1. 感受性細胞

細胞としては、アフリカミドリザル腎由来の Vero 細胞を用いた。

### 2. 抗ウイルス剤

ACV は日本ウエルカム社より供与をうけ、IDU は和光純薬工業株式会社より購入したものをを用いた。

### 3. ウイルス分離方法<sup>5)</sup>

MQA チップにて角膜上皮細胞を擦過するか、あるいは涙液を採取し、これを直接 Vero 細胞を単層に増殖させたウェルに入れ、細胞変性効果が拡大した時点で凍結した。後日、これを融解し、超音波処理にて細胞を破碎し、その遠心上清を分注貯蔵した。ウイルスの型別は HSV-1 特異モノクローナル抗体を用いた蛍

光抗体法により行った。

### 4. ウイルス ED<sub>50</sub><sup>5)</sup>

24ウェルにて単層培養した Vero 細胞に100PFU の HSV-1 を吸着させ、1時間後、10倍段階希釈した各種濃度(0.0001~10 $\mu$ g/ml)の薬剤を含んだ1%メチルセルロース(4000CPS:半井化学)、2%牛胎児血清添加 MEM 1ml を各ウェルに重層した。72時間後、細胞をホルマリン固定し、1%クリスタル・バイオレットで染色してプラーク数を算定した。各濃度におけるプラーク数から薬剤なしのコントロールウェルのプラーク数を50%に減ずる薬剤の濃度を片対数グラフを用いて算出し、これをウイルス ED<sub>50</sub> とした。

### 5. cell ED<sub>50</sub>

35mm dish に単層培養した Vero 細胞(1 $\times$ 10<sup>5</sup>/dish)に10倍段階希釈した薬剤(0.1~1,000 $\mu$ g/ml)を添加し、培養した。72時間後、トリプシン処理をおこない、0.3%トリパンブルーを用いて血球計算板にて Viable cell を算定した。片対数グラフより薬剤なしのコントロールの細胞数を50%に減ずる薬剤濃度を求め、これを cell ED<sub>50</sub> とした。

### 6. 臨床的検討

HSV-1採取時における臨床的治療内容を調べ、*in vitro* における薬剤感受性との関係について検討した。また、同一患者より2回分離された3症例の株につき、1回目(初発)分離時と2回目(再発)分離時における各薬剤に対するウイルス ED<sub>50</sub> を比較した。

## III 結 果

### 1. *in vitro* における全臨床分離株に対する薬剤感受性

IDU のウイルス ED<sub>50</sub> は、0.073~0.77 $\mu$ g/ml (平均0.33 $\pm$ 0.16)であり、ACV の ED<sub>50</sub> は、0.0032~0.33 $\mu$ g/ml (平均0.13 $\pm$ 0.11)であった(表1)。著明に高い ED<sub>50</sub> 値を示す株はなかった。

### 2. cell ED<sub>50</sub>/ウイルス ED<sub>50</sub>

cell ED<sub>50</sub> は IDU 3.8 $\mu$ g/ml であり、ACV 68 $\mu$ g/ml であった。抗ウイルス剤はウイルス増殖を阻害する濃度と細胞増殖を阻害する濃度の比が大きいほど良い薬剤であるということが出来る。そこで、その indicator として cell ED<sub>50</sub>/ウイルス ED<sub>50</sub> を求めると、IDU 11.5、ACV 523 と、ACV は IDU の50倍近い値を示した(表2)。

### 3. HSV-1採取時の治療と薬剤感受性

HSV-1採取時の治療とウイルス ED<sub>50</sub> の関係を表3

表1 ウイルス ED<sub>50</sub> (μg/ml)

	n	Mean	SD	Range
IDU	35	0.33	0.16	0.073 ~ 0.77
ACV	35	0.13	0.11	0.0032 ~ 0.33

表2 cell ED<sub>50</sub>/ウイルス ED<sub>50</sub>

IDU	11.5
ACV	523

表3 HSV 採取時の治療とウイルス ED<sub>50</sub> (μg/ml)

治療	ED <sub>50</sub> /IDU	ED <sub>50</sub> /ACV	
IDU (+)	0.27±0.06	0.11±0.11	14眼
IDU (-)	0.36±0.19	0.14±0.12	21眼
ACV (+)	0.33	0.32	1眼
ACV (-)	0.33±0.16	0.12±0.11	34眼

表4 同一患者より2回分離された症例のウイルス ED<sub>50</sub> (μg/ml)

	First episode		Recurrent	
	IDU	ACV	IDU	ACV
症例1	0.28	0.15	0.31	0.32
症例2	0.28	0.17	0.33	0.32
症例3	0.31	0.08	0.68	0.26

に示した, IDU の ED<sub>50</sub> は, IDU 使用眼では, 平均 0.27 (±0.06) μg/ml で, 無使用では, 平均 0.36 (±0.19) μg/ml であった. ACV 使用眼では, 0.33 μg/ml で, 無使用では, 平均 0.33 (±0.16) μg/ml であった. ACV の ED<sub>50</sub> は, IDU 使用眼では, 平均 0.11 (±0.11) μg/ml で, 無使用では, 平均 0.14 (±0.12) μg/ml であった. ACV 使用眼では, 0.32 μg/ml で, 無使用では, 平均 0.12 (±0.11) μg/ml であった. いずれも両者の間で, 統計学的有意の差は認められなかった.

#### 4. 同一患者より2回分離された3症例の薬剤感受性

同一患者より2回分離された3症例の株に対する IDU, ACV のウイルス ED<sub>50</sub> を表4に示す. IDU, ACV とともに2回目で値が低下した例はなく, 特に ACV に対しては2~3倍の上昇を示した. 但し, 耐性株には程遠い値であった. なお, 初回にウイルスが採取された時点の角膜炎に対しては全例, 無治療であったが, その後 ACV により治療した. 2回目のウイルス採取

時には症例1, 症例2に対しては無治療であったが, 症例3は ACV が投与されていた.

## IV 考 按

抗ウイルス剤感受性試験には, 色素取り込み (dye uptake) 法<sup>6)</sup>, ブラーク減少法<sup>7)</sup>, ELISA 法<sup>8)</sup>などがある. 大量のサンプルのマススクリーニングには色素取り込み法が迅速で便利な方法であると言われている<sup>2)</sup>が, 今回, 我々は広く用いられており, かつ信頼性の高いブラーク減少法を採用した. 他施設においても抗ウイルス剤感受性試験が施行されているが, 薬剤感受性値は各々の検査方法, 使用された細胞の種類, 状態, 実験室によって異なるので, 比較は難しい.

今回, 検討した臨床分離株に対する ACV および IDU のウイルス ED<sub>50</sub> 値は全例低値を示し, 平均値よりかけ離れた値を示すものではなく, 耐性ウイルス株の定義づけに仮に引かれた 3 μg/ml (平均±2MD)<sup>2)</sup> の値あるいは cell ED<sub>50</sub> の値を越えるものは分離されなかった. この結果は角膜ヘルペス臨床分離株に対する抗ウイルス剤感受性を調査した Inoue ら<sup>5)</sup>の報告とも一致する. 我が国の女性性器ヘルペスより分離された HSV 株においても著明に高いウイルス ED<sub>50</sub> 値を示す ACV 耐性株は検出されていない<sup>9)</sup>.

臨床的に IDU および ACV が投与されていた分離株においてもウイルス ED<sub>50</sub> 値は低値を示していた. 従って, 臨床的に IDU 治療に失敗したと考えられた症例も IDU 感受性株を排出していたことになり, 真の意味では耐性ではなかったことになる. これらの症例が治癒しない原因としては, 涙液中および角膜上皮における IDU のウイルス ED<sub>50</sub> 値に達するために必要な点眼回数 (1時間毎) が患者サイドで守られていないか, あるいは逆に IDU の副作用による潰瘍の修復遅延が考えられる<sup>10)</sup>. IDU は, 点眼剤という利点はあるが, 投与回数, 角膜浸透性の悪さ, 細胞毒性が問題になると思われる.

IDU は HSV の thymidine kinase (TK) のみならず, 正常細胞の TK でも磷酸化され, 正常細胞の DNA 合成も阻害するので細胞毒性が強い. 今回の結果では cell ED<sub>50</sub>/ウイルス ED<sub>50</sub> は ACV が IDU の 50 倍近い値を示しており, ACV の安全性および有効性が確認された. しかし, ACV は HSV の TK によって磷酸化されてはじめて活性化し, HSV の DNA polymerase を阻害するので, 逆に, TK の変異の影響を受けやすく, IDU よりもむしろ耐性株を作成し易いと考えられ

る。

今回の全症例の検討では、IDU、ACVの使用例と無使用例の間に抗ウイルス剤感受性の差を認めなかったが、同一患者より2回分離された症例では、再発時の分離株において、1回目の分離株よりIDU、ACVのED<sub>50</sub>値の上昇が全例にわずかに認められた。

一般的に抗ウイルス剤への抵抗性が増加したかどうかは、*in vitro*でのED<sub>50</sub>値が約4~10倍増加したか否かで判断が下されており<sup>2)</sup>、今回の結果は上記定義に合致した例はなかったとはいえ、これが長期にわたれば耐性へと至る可能性があると考えられる。特に、1回目分離時は全例、ACVで治療しており、ACVのED<sub>50</sub>値がより上昇していることから長期にわたるACV使用により、感受性低下の可能性が示唆される。本症例は、IDUのED<sub>50</sub>値も上昇しており、ACV使用により当該HSV株のIDU感受性も低下するのではないかと推察される。実際、丹ら<sup>11)</sup>は、*in vitro*ではACV耐性株が容易に作成でき、またACV耐性株はIDUに対しても耐性であったと報告している。最近では当科でもACV使用が多くなり、今後長期にわたる使用により、*in vitro*での耐性株出現が十分に予想される。

一般的にACV耐性株はTK欠損株が多いとされており<sup>4)</sup>、またTK欠損株は病原性、潜伏感染率は低いといわれている<sup>12)13)</sup>。実際、ACV耐性株はマウスを用いた実験で、角膜実質病変は弱く、潜伏感染も起こし難いと報告されている<sup>11)14)</sup>。しかし、耐性株の中でもDNA polymerase変異株は親株と同様の病原性を示すといわれており<sup>2)</sup>、またDarbyら<sup>15)</sup>はTK<sup>+</sup>のACV耐性株は、毒性が強く、また潜伏感染の頻度も高いと報告しているので、今後、眼科領域でも病原性の高いACV耐性株が出現する可能性があると考えられる。

#### 文 献

- 1) 茂田士郎：抗ウイルス化学療法剤—とくに抗ヘルペス剤。医学のあゆみ 142: 662—665, 1987.
- 2) Barry DW, Lehrman SN: 臨床治験中に起こるウイルスの耐性化—Acyclovir使用5年間の経験より—。Therapeutic Res 2: 69—74, 1985.
- 3) McLaren C, Corey L, Dekker C, et al: *In vitro* sensitivity to acyclovir in genital herpes simplex virus from acyclovir-treated patients. J Infect Dis 148: 868—875, 1983.
- 4) Dekker C, Ellis MN, McLaren C, et al: Virus resistance in clinical practice. J Antimicrob Chemother 12: 137—152, 1983.
- 5) Inoue Y, Ohashi Y, Shimomura Y, et al: Comparative efficacy of three antiviral drugs in mice herpetic keratitis. Jpn J Ophthalmol 33: 125—131, 1989.
- 6) McLaren C, Ellis MN, Hunter GA: A colorimetric assay for measurement of the sensitivity of herpes simplex viruses to antiviral agents. Antiviral Res 3: 223—234, 1983.
- 7) Crumacker CS, Schnipper LE, Zaia JA, et al: Growth inhibition by acycloguanosine of herpesviruses isolated from human infections. Antimicrob Ag Chemother 15: 642—645, 1979.
- 8) Wahren B, Harmenberg J, Sundqvist V-A, et al: A novel method for determining the sensitivity of herpes simplex virus to antiviral compounds. J Virologic Methods 6: 141—149, 1983.
- 9) 橋戸 円, 川名 尚: 日本の女性性器ヘルペス症患者より分離したHSVのAcyclovirに対する感受性について。感染症誌 62: 141—146, 1988.
- 10) 塩田 洋: 角膜ヘルペスの治療について—最近の話題—。あたらしい眼科 3: 107—111, 1988.
- 11) 凡 長春, 井上幸次, 下村嘉一, 他: Acyclovir耐性HSV株の性質について。あたらしい眼科 6: 1687—1691, 1989.
- 12) Field HJ, Wildy P: The pathogenicity of thymidine kinase-deficient mutants of herpes simplex virus in mice. J Hug 81: 267—277, 1978.
- 13) Tenser RB, Miller RL, Rapp F: Trigeminal ganglion infection by thymidine kinase-negative mutants of herpes simplex virus. Science 205: 915—917, 1979.
- 14) Gordon YJ, Gilden DM, Becker Y: HSV-1 thymidine kinase promotes virulence and latency in the mouse. Invest Ophthalmol Vis Sci 24: 599—602, 1983.
- 15) Darby G: Altered substrate specificity of herpes simplex virus thymidine kinase confers acyclovir-resistance. Nature (London) 289: 81—83, 1981.