

単純ヘルペスウイルス1型アシクロビル耐性株の各種薬剤に対する感受性とチミジンキナーゼ活性

新田 敬子, 塩田 洋, 内藤 毅, 三村 康男

徳島大学医学部眼科学教室

要 約

単純ヘルペスウイルス1型のアシクロビル耐性株を作成し、この耐性株に対して他の抗ウイルス剤がどのような感受性を示すかを検討した。さらに、野生株とアシクロビル耐性株のチミジンキナーゼ活性を測定し、その変化を検討した。単純ヘルペスウイルスは臨床分離株であるマスダ株を用い、アシクロビル $1 \times 10^{-6} \text{M}$ を含有するMEM培地内で20代継代培養することによってアシクロビル耐性株を作成した。このアシクロビル耐性株をクローニングして4株を得、アシクロビル耐性であることを確認した後、もとの野生株と耐性株4株に対してアシクロビル、ガンシクロビル、カルボサイクリック・オキセタノシンG、(S)-9-(3-hydroxy-2-phosphonylmethoxypropyl) adenine ((S)-HPMPA)、アデニン・ア

ラビノシド(ara-A)の感受性を調べた。その結果、アシクロビル耐性株はガンシクロビル、カルボサイクリック・オキセタノシンGに交叉耐性を示し、アシクロビル耐性株に対しては(S)-HPMPAが最も有効であり、ara-Aも野生株と同等の感受性を有していた。野生株はチミジンキナーゼ活性を示したが、アシクロビル耐性株では4株とも陰性となっており、このことが耐性獲得の原因であると考えられた。(日眼会誌 98:513-519, 1994)

キーワード：単純ヘルペスウイルス1型、アシクロビル耐性株、抗ウイルス剤、(S)-HPMPA、チミジンキナーゼ活性

Sensitivities to Other Antiviral Drugs and Thymidine Kinase Activity of Aciclovir-resistant Herpes Simplex Virus Type 1

Keiko Nitta, Hiroshi Shiota, Takeshi Naito and Yasuo Mimura

Department of Ophthalmology, Tokushima University School of Medicine

Abstract

Sensitivity tests of various antiviral drugs on aciclovir-resistant strains of herpes simplex virus type 1 (HSV-1) were done *in vitro*. Activity of thymidine kinase (TK) of the aciclovir-resistant strains was also investigated. A strain of HSV-1 isolated from a patient with herpes labialis was grown in Eagle's minimum essential medium containing 10^{-6}M aciclovir (ACV) and passaged 20 times. Then ACV-resistant strains of HSV-1 were obtained. Sensitivity tests of 5 anti-herpetic agents {ACV, ganciclovir, carbocyclic oxetanocin G, (S)-9-(3-hydroxy-2-phosphonylmethoxypropyl)adenine

((S)-HPMPA), and adenine arabinoside (ara-A)} were done on these ACV-resistant strains. The ACV-resistant strains were resistant to ganciclovir and carbocyclic oxetanocin G, but they were sensitive to (S)-HPMPA and ara-A. These ACV-resistant strains showed no detectable TK activity. (J Jpn Ophthalmol Soc 98:513-519, 1994)

Key words: Herpes simplex virus type 1, Aciclovir-resistant strain, Antiviral drugs, (S)-HPMPA, Thymidine kinase

別刷請求先：770 徳島県徳島市蔵本町3 徳島大学医学部眼科学教室 新田 敬子
(平成5年10月25日受付, 平成6年2月14日改訂受理)

Reprint requests to: Keiko Nitta, M.D. Department of Ophthalmology, Tokushima University School of Medicine.
3 Kuramoto-cho, Tokushima-shi, Tokushima-ken 770, Japan

(Received October 25, 1993 and accepted in revised form February 14, 1994)

I 緒 言

アシクロビルは現在我が国で市販されている数少ない抗ウイルス剤の一つであり、1985年8月に点滴製剤、同年10月に3%眼軟膏が発売され、さらに、1988年10月には内服薬として発売された。それ以来、眼科臨床の場においてウイルス感染症の治療薬として全身投与、局所投与の両面から利用され、大変重要な位置を占めている。しかし、それに伴ってアシクロビルでは治療困難な局面に遭遇することも出てきはじめた。我が国以外では、acquired immunodeficiency syndrome (AIDS) や制癌剤投与を受けた癌終末期患者のように、免疫機能が極度に低下した患者から単純ヘルペスウイルスのアシクロビル耐性株分離の報告がなされている^{1)~5)}。また我が国でも、臨床的にアシクロビル耐性と考えられる単純ヘルペスウイルスの症例が報告された⁶⁾⁷⁾。さらに1992年には、井上幸次らによってアシクロビルで改善しないヘルペス性角膜炎の2症例からアシクロビルに耐性である単純ヘルペスウイルスの分離の報告がなされた。今後、我が国においてもヘルペスウイルスの薬剤耐性の問題はますます重要になってくるものと考えられる。

本論文は、単純ヘルペスウイルス1型のアシクロビル耐性株を *in vitro* において作成し、そのアシクロビル耐性株に対して他の抗ウイルス剤がどのような感受性を示

すかを比較検討し、耐性株に対する治療法に関する方向付けを試みた。さらに、野生株とアシクロビル耐性株のチミジンキナーゼ活性を測定し、アシクロビル耐性は同酵素の活性低下に基づくことを確認した。

II 実験方法

1. 材 料

1) ウイルス：臨床分離株である単純ヘルペスウイルス1型 (herpes simplex virus type 1, HSV-1) のマスタ株を使用した。このマスタ株は口唇ヘルペスの患者から分離したウイルスで、蛍光標識モノクローナル抗体を用いて HSV-1 であることを確認した。

2) 細胞：耐性株作成と抗ウイルス剤の感受性試験には VERO 細胞を用い、チミジンキナーゼ活性測定には LM 細胞を用いた。培養液は Eagle の minimum essential medium (MEM) 培地に L-グルタミン 0.3 g/l, 牛胎児血清 (FCS) 1% を加えて用いた。LM 細胞の培養には、さらに 5-bromo-deoxyuridine (BUdR) 25 μ g/ml を加えた。組織培養シャーレは Nunc 社製のものを用いた。

3) 抗ウイルス剤：アシクロビル (9-(2-hydroxyethoxymethyl)guanine, aciclovir, ACV), ガンシクロビル (9-(1,3-dihydroxy-2-propoxymethyl)guanine, DHPG, ganciclovir), カルボサイクリック・オキセタノシン G (9-

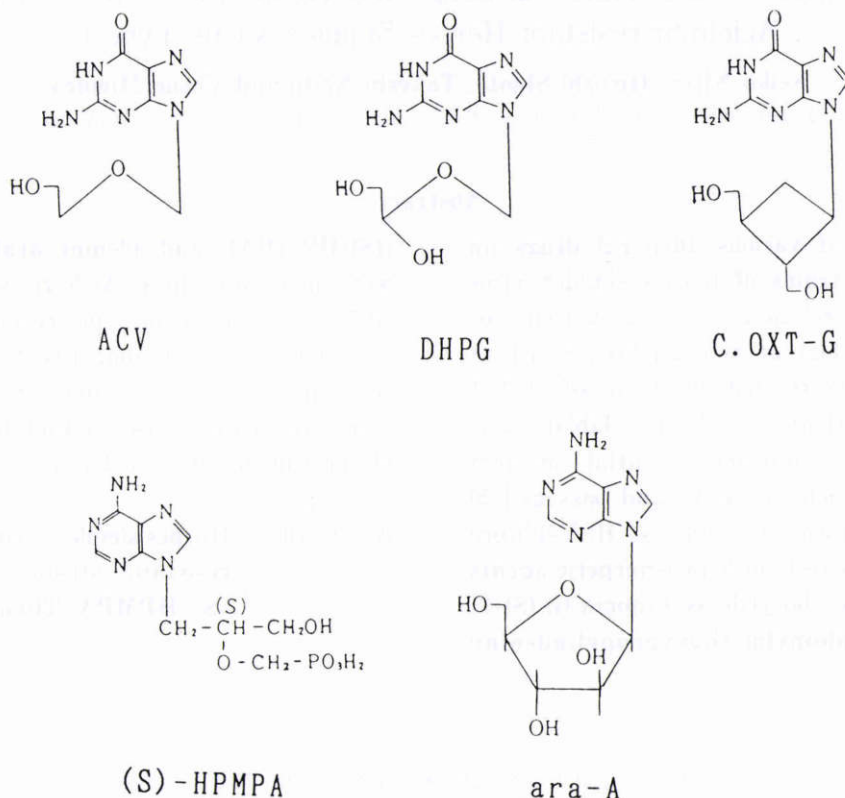


図1 抗ウイルス剤の化学構造式。

ACV : aciclovir, DHPG : 9-(1, 3-dihydroxy-2-propoxymethyl) guanine, C, OXT-G : carbocyclic oxetanocin G, (S)-HPMPA : (S)-9-(3-hydroxy-2-phosphonylmethoxypropyl) adenine, ara-A : adenine arabinoside

[3,4-bis(hydroxymethyl)cyclobutyl]guanine, carbocyclic oxetanocin G, C. OXT-G), (S)-9-(3-hydroxy-2-phosphonyl-methoxypropyl) adenine ((S)-HPMPA), アデニン・アラビノシド (9-β-D-arabinofuranosyladenine, ara-A)の5種類を使用した。なお, C. OXT-Gは, 1990年に徳島文理大学薬学部で新しく合成された抗ウイルス剤⁹⁾で, その構造にグアニン (guanine) とサイクロブタン (cyclobutane) 環を有する炭素環ヌクレオシド (carbocyclic nucleoside) の一種である (図1)。

2. 抗ウイルス剤の感受性試験の方法

HSV-1に対する抗ウイルス剤のED₅₀値を測定し, これをもって感受性の指標とした。まずVERO細胞を単層培養し, ここへHSV-1を接種し, 37℃, 5% CO₂の条件下でウイルスを吸着させた。1時間後, 抗ウイルス剤を段階希釈して含有する0.5% メチルセルロース・MEM培養液で単層VERO細胞を覆い, 37℃, 5% CO₂ incubatorで培養した。ブラックが十分大きくなるまで培養した後上清を捨て, PBS (-) で細胞表面を洗浄し, そして, 10% ホルマリン・クリスタルバイオレット液で室温で30分間固定染色した。抗ウイルス剤を含有しない培養液のシャーレで作られたブラック数を測定し, これを対照の値とした。抗ウイルス剤を段階希釈して含有している培養液のシャーレで作られたブラック数を測定し, 各段階において対照の値からどれだけブラック形成が抑制されているかを示すブラック形成抑制率を算出した。片対数グラフの横対数軸に抗ウイルス剤の濃度をとり, 縦軸にブラック形成抑制率をとって感受性曲線を描き, これからブラック形成抑制率が50%となるところの抗ウイルス剤の濃度を求め, これをED₅₀値とした。

3. ACV 耐性 HSV-1 株作成方法

HSV-1 マスダ株を本実験の野生株とし, ACV を3×

10⁻⁶M, 1×10⁻⁶M, 3×10⁻⁷M, 1×10⁻⁷M, 1×10⁻⁸Mに段階希釈して上記の方法でACVのED₅₀値を測定した。次に, 野生株をACV 1×10⁻⁶M含有MEM培養液中で20代継代培養し, 得られたHSV-1に対するACVのED₅₀値を測定した。この値を野生株と比較し, ACVに対して耐性を獲得していることを確認した。その後, このACV耐性株をクローニングし, 4個のウイルス株を採取した。そして, これら4株にNo. 1, No. 2, No. 3, No. 4と番号を付けた。これら4株すべてについて各々ACVのED₅₀値を測定し, 4株いずれもがACV耐性であることを再確認した。さらに何代継代したところで耐性を獲得したかをみるために, 5, 10, 15代目のHSV-1に対するACVのED₅₀値を求めた。

4. HSV-1 に対する抗ウイルス剤の感受性試験

HSV-1の野生株とACV耐性4株の, 合計5株に対するACV以外の上記抗ウイルス剤のED₅₀値を求めることによって, 感受性の比較を行った。

5. チミジンキナーゼ (thymidine kinase, TK) 活性測定⁹⁾¹⁰⁾

LM細胞をBUdRの存在下で単層培養した後, HSV-1野生株とACV耐性株4株をLM細胞に接種した。37℃, 5% CO₂の条件下で20時間の培養後, 細胞を0.02 M トリシュー塩酸緩衝液 (pH 7.8) に懸濁し, 超音波で破壊した。そして8,000×g, 20分間遠心し上清を採り, Lowry試薬法で蛋白定量を行った。蛋白濃度 (1.77 mg/ml) を一定にした上清40 μlと, ³H-チミジン含有の反応液120 μlを37℃で反応させた。試料として経時的に20 μlずつ取り出し, DEAE paperに吸着させ, エタノールで未反応のチミジンを除き放射能測定を行った。

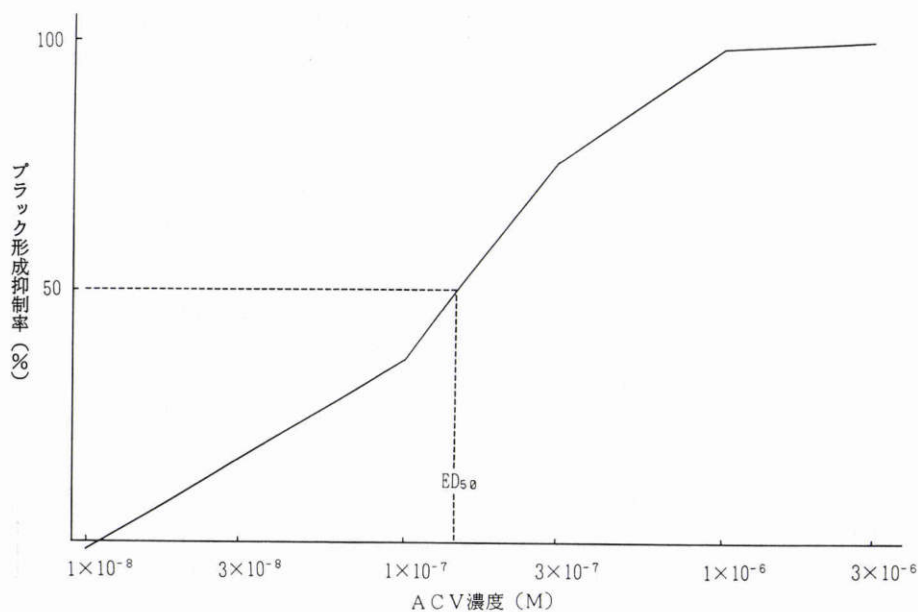


図2 HSV-1野生株に対するACV感受性曲線。

表1 HSV-1 野生株(マスダ株)に対する ACV の効果

ACV 濃度	平均ブラック数	ブラック形成抑制率
0 M	628.0	0.0%
1×10^{-8} M	639.0	-1.8%
1×10^{-7} M	401.0	36.1%
3×10^{-7} M	153.0	75.6%
1×10^{-6} M	10.3	98.4%
3×10^{-6} M	0.3	100.0%

表2 各 HSV-1 に対する各薬剤の ED₅₀ 値

薬 剤	HSV-1 野生株	ACV 耐性株			
		No. 1	No. 2	No. 3	No. 4
ACV	1.5	530	780	560	370
DHPG	1.5	270	160	450	380
C. OXT-G	3.7	89	140	160	100
(S)-HPMPA	80	90	32	120	46
Ara-A	150	550	300	760	420

(単位: $\times 10^{-7}$ M)表3 ³H-チミジン活性 (c.p.m./10 μ l)

反応時間	LM 細胞	HSV-1 野生株	ACV 耐性株			
			No. 1	No. 2	No. 3	No. 4
0分	1,905	1,776	1,571	1,354	1,532	1,379
20分	1,713	7,279	1,477	1,719	1,431	1,222
40分	1,442	14,183	1,463	1,721	1,407	1,516
60分	2,162	20,199	1,258	1,819	1,940	1,796

III 結 果

1. HSV-1 野生株(マスダ株)に対する ACV の感受性

ACV 各濃度において形成されたブラック数と、それから算出されたブラック形成抑制率を表1に示した。これらブラック形成抑制率と ACV 濃度から感受性曲線を描くと図2のごとくなり、これより HSV-1 野生株(マスダ株)に対する ACV の ED₅₀ 値は 1.5×10^{-7} M であることがわかった。

2. ACV 耐性株の作成経過

HSV-1 を継代して 5, 10, 15, 20 代目に対する ACV の感受性を調べた結果、ED₅₀ 値は 5 代目が 8.0×10^{-7} M, 10 代目が 5.2×10^{-7} M, 15 代目が 1.5×10^{-5} M, 20 代目が 2.6×10^{-5} M になり、耐性は 15 代目で獲得されていたことが判明した。

3. HSV-1 に対する抗ウイルス剤の感受性

HSV-1 の野生株と ACV 耐性 4 株に対する各種抗ウイルス剤の感受性を調べた結果を表2に示した。小括すると、野生株に対し ACV にはほぼ匹敵する効果を示す薬剤は DHPG, C. OXT-G であり、これら薬剤は ACV 耐性株に対し、DHPG は約 200 倍, C. OXT-G は約 30 倍の有効濃度が必要であり、交叉耐性を示した。他方、(S)-HPMPA と ara-A は野生株, ACV 耐性株に対する ED₅₀

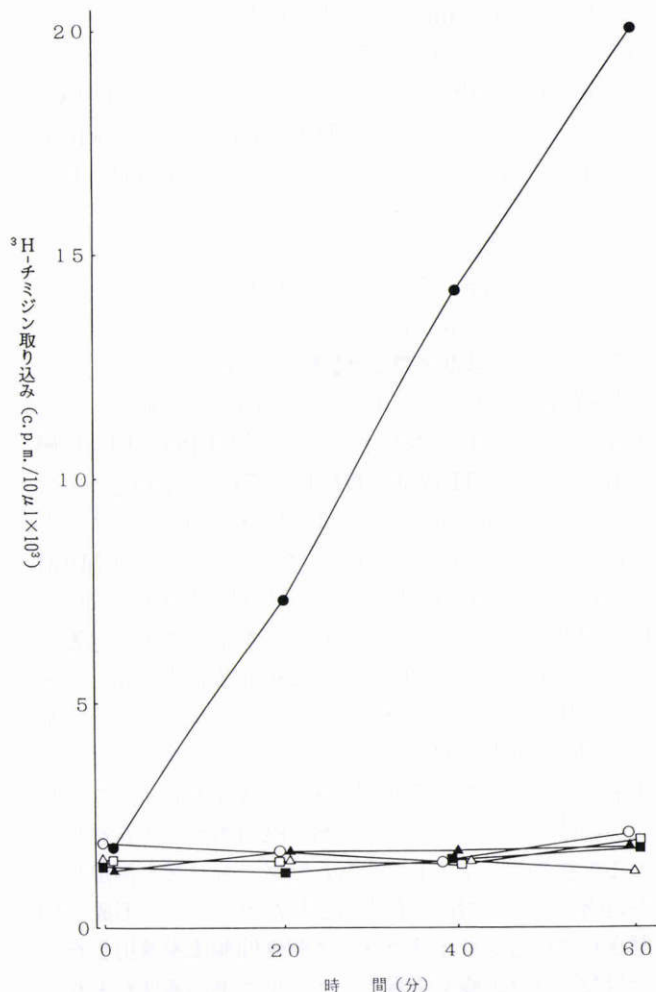


図3 チミジンキナーゼ (TK) 活性測定曲線

白丸: LM 細胞, 黒丸: 野生株, 白三角: 耐性株 No. 1, 黒三角: 耐性株 No. 2, 白四角: 耐性株 No. 3, 黒四角: 耐性株 No. 4

値の濃度に差異を認めなかった。

4. HSV-1 の TK 活性測定

TK 活性測定の結果を表3, 図3に示した。ここに示すように、HSV-1 野生株は時間の経過とともに TK 活性は上昇し TK 陽性であることがわかった。それに対して ACV 耐性株は 4 株すべてにおいて経時的に対照とした LM 細胞とほぼ同じ放射能活性値を示し、TK 陰性であることが判明した。

IV 考 按

今回、実験の中心となった ACV の作用機序をみてみると、ACV は、まず HSV 由来のチミジンキナーゼ (thymidine kinase, TK) によって特異的にリン酸化されて一リン酸化物となり、次に細胞由来の酵素によってリン酸化が進み、そして三リン酸化物が HSV の DNA ポリメラーゼ (DNA polymerase) による DNA 合成過程においてデオキシグアノシン三リン酸とチミジン三リン酸の DNA への取り込みを拮抗阻害する¹¹⁾⁻¹³⁾。このよ

うにして、ACVはHSVに対して抗ウイルス作用を発現するため、HSVがACVの耐性を獲得するには、HSVのTKの変化^{14)~16)}あるいは、DNAポリメラーゼの変化の2点が考えられる^{17)~20)}。今回の我々のACV耐性株においては、4株ともTK陰性となったためにACV耐性を獲得したと考えられる。

DHPGも、ACVなど他のヌクレオシドアナログと同様にHSV由来のTKによって一リン酸化され、次いで細胞由来の酵素で三リン酸化物までリン酸化されて活性化し、HSVのDNAポリメラーゼ活性を阻害することによってHSVの複製を妨げるといわれている²¹⁾²²⁾。今回の我々の実験結果でも、HSV-1の野生株に対する感受性はACVと同等であったことは、同じ作用機序に基づくことを示している。さらにDHPGは、細胞由来のTKによってはほとんどリン酸化されない²³⁾²⁴⁾にもかかわらず、最近DHPGがウイルス由来のTKを持たないサイトメガロウイルス(cytomegalovirus, CMV)のDNA合成に対して直接的阻害作用のあることが報告されている²⁵⁾²⁶⁾。この事実は、DHPGに対するHSV-1およびHSV-2の感受性はACVとほぼ同等であるが、ACV耐性株に対しては、DHPGはACVよりも優れた阻害活性を示す²³⁾²⁵⁾といわれている。しかし、今回我々の作成したACV耐性株に関しては、DHPGのNo. 2に対する感受性がACVの感受性の約5倍を示してはいるものの、他の3株においてはほとんど差はみられず、また、No. 1~No. 4までの4株のACV耐性株に対するDHPGの感受性をみても、耐性株間での差はみられなかった。

次いで、新しい抗ウイルス剤であるC. OXT-GもACVとDHPGに劣らない抗ウイルス作用を有している。そして、クローニングされたすべてのACV耐性株は、野生株と比較し、DHPG、C. OXT-Gの感受性が低下し、この2剤に対しても耐性を獲得している。このように、ACV、DHPG、C. OXT-Gの3剤は、今回実験に用いたHSV-1野生株と耐性株に対しては同じような抗ウイルス効果を示した。これより、C. OXT-Gの作用機序は現在明らかにはされていないが、TKが関与していることが示唆される。なお、C. OXT-Gは*in vitro*のレベルのみならず、家兎角膜ヘルペスやヒトの角膜ヘルペスという*in vivo*のレベルにおいても抗HSV効果を有することが証明されており²⁷⁾、今後の発展が注目される。

(S)-HPMPAは、リン酸をヌクレオシドアナログに結合させることによって細胞透過性を薬剤に付与した誘導体である²⁸⁾(図1)。ACVのように感染細胞内でリン酸化されて活性化する抗ウイルス剤はHSVのチミジンキナーゼ欠損株(TK⁻株)に対して無効であり、またACVを化学的に一リン酸化して、これを投与してもこれらの一リン酸化物は細胞膜を透過できないので、抗ウイルス作用を及ぼすことができないことから(S)-HPMPAが合成された²⁸⁾。(S)-HPMPAは細胞の酵素により一リン

酸化物、続いて二リン酸化物へと変換される。そして出来上がった(S)-HPMPAの二リン酸化物が、ウイルスのDNAポリメラーゼを特異的に阻害して抗ウイルス作用を発揮するといわれている²⁹⁾。このようにして、(S)-HPMPAはHSV-1、HSV-2、HSV-1 TK⁻株、VZV、CMV、vaccinia virusに抗ウイルス作用を有しているといわれている²⁸⁾。

今回の実験では、(S)-HPMPAのHSV-1野生株に対する感受性はACV、DHPG、C. OXT-Gと比較するとやや低いものの、HSV-1野生株とACV耐性株の間でほとんど差のない十分な感受性を示しており、また、ACV耐性株に対する(S)-HPMPAの感受性は他の抗ウイルス剤に勝る高い感受性を示している。

Ara-Aは細胞由来のアデノシンキナーゼによって一リン酸化され、次いで二リン酸化物、三リン酸化物となってDNAポリメラーゼを阻害するが、細胞のDNAポリメラーゼの10倍の強さで、HSV、VZVのDNAポリメラーゼを競合的に阻害することによって抗ウイルス作用を発揮する。したがって、ara-Aはウイルス感染細胞でも非感染細胞でも三リン酸化物が作られ、ara-Aは細胞のDNA合成にも影響を及ぼす。Ara-Aはこのような作用機序を有するため、TK⁻株にも有効といわれている³⁰⁾³¹⁾。今回の我々の実験では、HSV-1野生株に対するara-Aの感受性はACVの感受性と比較するとED₅₀において100倍の差がみられたが、HSV-1野生株とACV耐性株の間では全く差はなく、これまでの報告²⁹⁾と一致していた。

我が国においても、現在AIDS患者は増加傾向にあり社会問題となっている。そして、今後ますます免疫機能低下または喪失状態にある患者が増加し、HSVのACV耐性株も増加することが予測される。

1989年に凡ら³²⁾によって、ACV耐性株に対してtrifluorothymidine (TFT)が高い感受性を示したとの報告がなされており、今回の実験結果からも、臨床においてACV耐性が疑われた場合、ACVとは作用機序の類似する薬剤を避け、異なる作用機序を持つ抗ウイルス剤(例えば(S)-HPMPA、ara-A、TFT)に変更して治療をすすめていくのが望ましいものと考えられる。

稿を終えるにあたり、ACVの分与を受けたWellcome社、DHPGの分与を受けたSyntex社、(S)-HPMPAを分与して下さったProf. De Clercq、C. OXT-Gを分与して下さった徳島文理大学薬学部丸山徳見助教授ならびにLM細胞を分与して下さった旭川医科大学東 匡伸副学長に深謝致します。また、チミジンキナーゼの活性測定に御指導をいただきました当大学ウイルス学講座の内田孝宏教授、小山 一助教授に深謝いたします。

文 献

- 1) **Bean B, Fletcher C, Englund J, Lehrman SN, Ellis MN**: Progressive mucocutaneous herpes simplex infection due to acyclovir-resistant virus in an immunocompromised patient: Correlation of viral susceptibilities and plasma levels with response to therapy. *Diag Microbiol Infect Dis* 7: 199—204, 1987.
- 2) **Erlich KS, Mills J, Chatis P, Mertz GJ, Busch DF, Follansbee SE, et al**: Acyclovir-resistant herpes simplex virus infections in patients with the acquired immunodeficiency syndrome. *N Engl J Med* 320: 293—296, 1989.
- 3) **Norris SA, Kessler HA, Fife KH**: Severe, progressive herpetic whitlow caused by an acyclovir-resistant virus in a patient with AIDS. *J Infect Dis* 157: 209—210, 1988.
- 4) **Ljungman P, Ellis MN, Hackman RC, Shepp DH, Meyers JD**: Acyclovir-resistant herpes simplex virus causing pneumonia after marrow transplantation. *J Infect Dis* 162: 244—248, 1990.
- 5) **Nugier F, Colin JN, Aymard M, Langlois M**: Occurrence and characterization of acyclovir-resistant herpes simplex virus isolates: Report on a two-year sensitivity screening survey. *J Med Virol* 36: 1—12, 1992.
- 6) 福州淑華, 松村正彦, 梶原敬一, 清水澄太: Acyclovir 治療後再燃したヘルペス脳炎の1例. *日児誌* 91: 1452—1458, 1987.
- 7) 大中桂三, 蔵田孝雄, 三宅隆生, 笹ヶ迫直一, 石本進士: Vidarabine (ara-A) が著効し, Acyclovir 耐性と考えられた単純ヘルペス脳炎の1例. *医療* 44: 728—732, 1990.
- 8) **Maruyama T, Sato Y, Horii T, Shiota H, Nitta K, Shirasaka T, et al**: Synthesis and antiviral activities of carbocyclic oxetanocin analogues. *Chem Pharm Bull* 38: 2719—2725, 1990.
- 9) **Summers WP, Wagner M, Summers WC**: Possible peptide chain termination mutants in thymidine kinase gene of a mammalian virus, herpes simplex virus. *Proc Natl Acad Sci USA* 72: 4081—4084, 1975.
- 10) **Summers WC, Summers WP**: [¹²⁵I] deoxycytidine used in a rapid, sensitive, and specific assay for herpes simplex virus type 1 thymidine kinase. *J Virol* 24: 314—318, 1977.
- 11) **Elion GB, Furman PA, Fyfe JA, de Miranda P, Beauchamp L, Schaffer HJ**: Selectivity of action of an antiherpetic agent, 9-(2-hydroxyethoxymethyl) guanine. *Proc Natl Acad Sci USA* 74: 5716—5720, 1977.
- 12) **Fyfe JA, Keller PM, Furman PA, Miller RL, Elion GB**: Thymidine kinase from herpes simplex virus phosphorylates the new antiviral compound, 9-(2-hydroxyethoxymethyl) guanine. *J Biol Chem* 253: 8721—8727, 1978.
- 13) **Miller WH, Miller RL**: Phosphorylation of acyclovir (acycloguanosine) monophosphate by GMP kinase. *J Biol Chem* 255: 7204—7207, 1980.
- 14) **Field HJ, Darby G**: Pathogenicity in mice of strains of herpes simplex virus which are resistant to acyclovir *in vitro* and *in vivo*. *Antimicrob Agents Chemother* 17: 209—216, 1980.
- 15) **Sibrack CD, Gutman LT, Wilfert CM, McLaren C, St. Clair MH, Keller PM, et al**: Pathogenicity of acyclovir-resistant herpes simplex virus type 1 from an immunodeficient child. *J Infect Dis* 146: 673—682, 1982.
- 16) **Crumpacker CS, Schnipper LE, Marlowe SI, Kowalsky PN, Hershey BJ, Levin MJ**: Resistance to antiviral drugs of herpes simplex virus isolated from a patient treated with acyclovir. *N Engl J Med* 306: 343—346, 1982.
- 17) **Field HJ, Darby G, Wildy P**: Isolation and characterization of acyclovir-resistant mutants of herpes simplex virus. *J Gen Virol* 49: 115—124, 1980.
- 18) **Coen DM, Schaffer PA**: Two distinct loci confer resistance to acycloguanosine in herpes simplex virus type 1. *Proc Natl Acad Sci USA* 77: 2265—2269, 1980.
- 19) **Larder BA, Darby G**: Selection and Characterisation of acyclovir-resistant herpes simplex virus type 1 mutants inducing altered DNA polymerase activities. *Virology* 146: 262—271, 1985.
- 20) **Parker AC, Craig JIO, Collins P, Oliver N, Smith I**: Acyclovir-resistant herpes simplex virus infection due to altered DNA polymerase. *Lancet* 19: 1461, 1987.
- 21) **Cheng YC, Grill SP, Dutschman GE, Nakayama K, Bastow KF**: 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.
- 22) **St. Clair MH, Miller WH, Miller RL, Lambe CU, Furman PA**: Inhibition of cellular α DNA polymerase and herpes simplex virus-induced DNA polymerases by the triphosphate of BW759U. *Antimicrob Agents Chemother* 25: 191—194, 1984.
- 23) **Ashton WT, Karkas JD, Field AK, Tolman RL**: Activation by thymidine kinase and potent antiherpetic activity of 2'-nor-2'-deoxyguanosine (2'NDG). *Biochem Biophys Res Commun* 108: 1716—1721, 1982.
- 24) **Field AK, Davies ME, DeWitt C, Perry HC, Liou R, Germershausen J, et al**: 9- {[2-hydroxy-1-(hydroxymethyl) ethoxy] methyl} guanine: A selective inhibitor of herpes group virus replication. *Proc Natl Acad Sci USA* 80: 4139—4143, 1983.
- 25) **Tocci MJ, Livelli TJ, Perry HC, Crumpacker CS, Field AK**: Effects of the nucleoside analog 2'-nor-2'-deoxyguanosine on human cytomegalo virus replication. *Antimicrob Agents Chemother* 25: 247—252, 1984.
- 26) **Grill SP, Dutschman GE, Frank K, Chiou JF,**

- Bastow KF, Nakayama K, et al**: Effects of 9-(1, 3-dihydroxy-2-propoxymethyl) guanine, (DHPG), a new antiherpes virus compound, on macromolecule synthesis in herpes simplex virus infected cells. *Fed Proc* 43: Abstr 1621, 1984.
- 27) 塩田 洋, 新田敬子, 内藤 毅, 三村康男, 丸山徳見, 本庄美喜男: 角膜ヘルペスに対する carbocyclic oxetanocin G の効果. *Chemotherapy* 40: 841—842, 1992.
- 28) **De Clercq E, Sakuma T, Baba M, Pauwels R, Balzarini J, Rosenberg I, et al**: Antiviral activity of phosphonylmethoxyalkyl derivatives of purine and pyrimidines. *Antiviral Res* 8: 261—272, 1987.
- 29) **Votruba I, Bernaerts R, Sakuma T, De Clercq E, Merta A, Rosenberg I, et al**: Intracellular phosphorylation of broad-spectrum anti-DNA virus agent (S)-9-(3-hydroxy-2-phosphonylmethoxypropyl) adenine and inhibition of viral DNA synthesis. *Mol Pharmacol* 32: 524—529, 1987.
- 30) **Field H, McMillan A, Darby G**: The sensitivity of acyclovir-resistant mutants of herpes simplex virus to other antiviral drugs. *J Infect Dis* 143: 281—285, 1981.
- 31) **Palú G, Summers WP, Valisena S, Tognon M**: Preliminary characterization of a mutant of herpes simplex virus type 1 selected for acycloguanosine resistance *in vitro*. *J Med Virol* 24: 251—262, 1988.
- 32) 凡 長春, 井上幸次, 下村嘉一, 真鍋禮三, 和田 透, 佐藤孝三郎, 他: Acyclovir 耐性 HSV 株の性質について. *あたらしい眼科* 6: 1687—1691, 1989.