

マウスヘルペス性角膜炎の再活性化抑制法の検討

渡邊 敬三

近畿大学医学部眼科学教室

抄 録

単純ヘルペスウイルス1型 (HSV-1) によるヘルペス性角膜炎は、しばしば再発を繰り返し、角膜混濁、視力低下、社会的失明となる場合がある。アシクロビル内服による再活性化抑制効果を検討した報告があるが、臨床的に十分な抑制率ではなかった。今回の研究では、マウスヘルペス性角膜炎モデルを用いて、アスコルビン酸 (AsA)、亜鉛 (Zn)、アデノシンモノフォスフェート (AMP)、ゲルダナマイシン (GM) の HSV-1 再活性化抑制効果を検討した。マウス角膜に HSV-1 を感染させ、AsA 内服群、Zn 内服群、これらのコントロールとして生理食塩水 (生食) 内服群、AMP 筋肉内注射 (筋注) 群、このコントロールとして生食筋注群、GM 腹腔内注射 (腹注) 群、このコントロールとしてジメチルスルホキシド腹注群、計7群に分類し、潜伏感染成立後25日目より各薬剤を投与した。免疫抑制薬と熱ストレスを用いて再活性化し、マウス眼球と三叉神経節を採取し、Plaque Assay と Real-time PCR 法を用いて検討した。Plaque Assay による検討で、GM 腹注群は、三叉神経節における陽性サンプル数に有意な減少を認め、Real-time PCR では、AMP 筋注群三叉神経節におけるウイルス DNA 検出コピー数に有意な減少を認めた。以上より GM と AMP は、マウス潜伏感染モデルにおいて、HSV-1 再活性化抑制効果を示すと考えられた。

Key words : herpetic keratitis, latency, reactivation, real-time PCR, adenosine monophosphate, geldanamycin

緒 言

単純ヘルペスウイルス1型 (herpes simplex virus type 1, HSV-1) は、眼科領域において、上皮型ヘルペス性角膜炎、実質型ヘルペス性角膜炎、角膜内皮炎、等の発症に関与する。HSV-1 は、角結膜に初感染後、三叉神経節¹、角膜^{2,3} に潜伏感染し、紫外線⁴、熱ストレス⁵、外傷⁶、寒冷刺激⁷、免疫抑制⁸ などの誘因により再活性化する。症例によっては、再発を繰り返し角膜混濁、視力低下、社会的失明となる場合がある。そのため、再発を防ぐことが重要な課題としてあげられる。

性器ヘルペス^{9,10}、口唇ヘルペス¹¹ では、アシクロビル (ACV) またはバラシクロビル (VACV) の予防的内服が、再発抑制に効果的であると報告されている。

一方、眼科領域においては Herpetic Eye Disease Study Group¹² が、ヘルペス性眼疾患の既往があるが活動性病変のない患者703名に対し、ACV 内服による角膜ヘルペスの再活性化抑制効果の検討を行っ

た。プラセボ群の再活性化率が32%であったのに対し、ACV 内服群は19%にとどまり、実質型ヘルペス性角膜炎の既往のある337名の比較では、前者が28%、後者が14%と有意の差があったと報告している。しかし、臨床的にこの減少率では充分とはいえず、また、12ヶ月にわたる ACV の長期投与では、HSV-1 の ACV 耐性の獲得、高額医療費が問題となる。また Itahashi ら¹³ は、マウス潜伏感染モデルを用い、ACV 点眼、軟膏、内服の他に、VACV 内服の再活性化抑制効果を Real-time PCR 法により検討した。その結果、ACV 点眼、軟膏、内服、及び VACV 内服群は、プラセボ群と比較して有意に再活性化抑制効果を認めたと報告した。VACV 内服は、現在眼科臨床において、角膜移植手術後の角膜ヘルペス再発予防のために、術後約2週間処方される場合がある¹⁴ が、本邦では保険適応は認められていない。また、長期にわたり慢性投与する場合、上記の ACV 同様の問題が考えられる。ACV 点眼、軟膏に関しては、予防的長期投与は細胞毒性による眼科的副作用を惹起するため、困難である。

今回本研究において、マウスヘルペス性角膜炎モデルを用いて、アスコルビン酸 (ascorbic acid, AsA), 亜鉛 (Zn), アデノシンモノフォスフェート (adenosine monophosphate, AMP), ゲルダナマイシン (Geldanamycin, GM) の HSV-1 再活性化抑制効果を検討した。

これまでに AsA^{15,16}, Zn^{17,18} に関しては、抗ウイルス作用が報告されており、ACV, VACV と同様の再発抑制効果が期待できると考えた。AMP に関しては、cyclic-AMP (cAMP) response element binding protein (CREB) が HSV-1 の潜伏感染、再活性化に関与すると報告されてきた¹⁹⁻²¹。また、GM は heat shock protein 90 (Hsp 90) inhibitor であり²², Hsp 遺伝子がマウスヘルペス性角膜炎の再活性化時に有意に発現上昇することが報告されている²³。しかし、これら AsA, Zn, AMP, GM がマウスヘルペス性角膜炎の再活性化抑制に有効かどうか検討した報告はない。今回これらのことを検討し、AMP と GM はマウスモデルにおいて有意な再活性化抑制効果を認めた。

方 法

ウイルス接種

すべての動物実験は、近畿大学医学部動物実験委員会規定に基づいて行なった。BALB/c マウス (メス, 5 週齢, 日本クレア株式会社) をケタミン (ケタラール®, 三共株式会社, 東京) 麻酔下に、両眼角膜上皮を 27G 針で Double Scratch に擦過し、HSV-1 McKrae 株 (7×10^3 PFU/eye) を接種した。

角膜上皮障害スコア

ウイルス接種 3, 4 日後に、マウス角膜をフルオレセイン染色液にて染色、細隙灯顕微鏡下で観察し、上皮型ヘルペス性角膜炎の程度を表 1 に従いスコアリングした²⁴。

グループ分類

ウイルス接種 4 日後に、生存マウスを各群で上皮型ヘルペス性角膜炎の程度が同程度になるように、以下の 7 群に分類した。すなわち、AsA 内服群, Zn

表 1 角膜上皮障害スコア

- | | |
|---|------------------------------------|
| 0 | 上皮障害を認めない。 |
| 1 | 点状表層角膜炎を認める。 |
| 2 | 樹枝状角膜炎あるいは地図状角膜炎が上皮全体の 1/4 未満を占める。 |
| 3 | 樹枝状角膜炎あるいは地図状角膜炎が上皮全体の 1/2 未満を占める。 |
| 4 | 樹枝状角膜炎あるいは地図状角膜炎が上皮全体の 1/2 以上を占める。 |

文献²⁴より改変。

内服群, これらのコントロールとして生理食塩水 (生食) 内服群, AMP 筋肉内注射 (筋注) 群, このコントロールとして生食筋注群, GM 腹腔内注射 (腹注) 群, このコントロールとしてジメチルスルホキシド (DMSO) 腹注群, 計 7 群であった。

350 匹のマウスを使用し、各群 50 匹ずつに分類した。

薬剤投与

各薬剤の作成および投与方法は以下の通りである。AsA (SIGMA, St Louis, USA) 内服では 0.4 mg, Zn (SIGMA, St Louis, USA) 内服では 0.0065 mg をそれぞれ生食 (大塚製薬, 徳島) 0.5 ml に溶解し 1 日 2 回投与した。これらのコントロールの生食内服では 0.5 ml を 1 日 2 回投与した。AMP (ナカライテスク, 京都) 筋注では 0.04 mg を生食 0.1 ml に溶解し 1 日 1 回筋注, 生食筋注では 0.1 ml を 1 日 1 回筋注した。GM (Invivogen, San Diego, CA, USA) 腹注では 0.25 mg を DMSO (和光純薬, 大阪) 0.25 ml に溶解し 1 日 1 回腹注, DMSO 腹注では 0.25 ml を 1 日 1 回腹腔内注射した。

内服群は、注射器 (テルモシリンジ® 1 ml, テルモ, 東京) に Research Pipet Tips (0.1-10 µl) (BioScience Inc, Salt Lake City, Utah, USA) を付け、マウス口腔内に投与した。筋注群は、注射器 (同上) に 27G 針 (テルモ, 東京) を付け大腿筋腹に注射した。腹注群は、筋注群と同様に注射器に 27G 針を付け腹腔内投与した。

各薬剤の投与は以下の再活性化施行の 3 日前 (ウイルス接種 25 日目) より開始し、計 5 日間行った。急性感染期に約 60% のマウスが死亡し、薬剤投与開始時には各群とも 20 から 25 匹であった。

再活性化

再活性化法は過去の報告¹³ 同様、潜伏感染が成立したと考えられるウイルス接種 28 日目に、サイクロフォスファミド (SIGMA, St Louis, USA) 200 mg/Kg を腹注し、その 24 時間後にデキサメサゾン (SIGMA, St Louis, USA) 16 mg/Kg を腹注した。更に 4 時間後、43°C の温水中にマウスを 10 分間浸けた後、乾燥させた。

組織中ウイルス Plaque Assay

再活性化 22 時間後に、眼球と三叉神経を採取し、各組織をホモジナイズ後、3,500 rpm, 10 分間遠心分離し、その上清を、24 穴培養皿に単層培養した Vero 細胞に接種し、Plaque Assay 法により組織中ウイルスの有無を検討した²⁵⁻²⁸。

DNA 抽出

採取した眼球、三叉神経のホモジナイズ及び遠心分離後の沈殿物から、DNeasy Tissue Kit® (Qiagen

Inc, Santa Clarita, California, USA) を用いて DNA 抽出を行った。

各サンプルの DNA 量を分光光度計により計測し、それぞれのサンプル DNA 量が100 ng になるよう調整した。

Real-time PCR

Taqman universal PCR master mix, No AmpErase® (PE Biosystems, New Jersey, USA) を試薬として用いた。プライマーは、forward 5'-ACATCATCAACTTCGACTGG-3', reverse 5'-CTCAGGTCCTTCTTCTTGCC-3' を、プローブは 5'-ATGGTGAACATCGACATGTACGG-3' を用いた²⁹⁻³¹。またプライマーは増幅領域を HSV-1 と HSV-2 に共通である herpes virus 1 isolate hsv1 33243 DNA polymerase (UL30) gene 領域に設計し、ゲノム DNA をターゲットとした。プローブにおいても同じ増幅領域に設計し、5' 末端側にレポーター色素として 6-carboxy fluorecein, 3' 末端側に クエンチャー色素として 6-carboxy-tetramethyl-rodamine を標識した。PCR 反応液は PCR master mix, 各プライマーを200 nM, プローブを100 nM, サンプルを 5 µl 混和し, 25 µl とした。機器は ABI PRISM 7000 Sequence Detector (PE Applied Biosystems, Foster City, California, USA) を使用した。増幅条件は95°C10分間, 97°C20秒間, 58°C1分間を5サイクル, 96°C20秒間, 58°C1分間を45サイクルで施行した²⁵⁻²⁷。既知量プラスミド DNA の希釈配列を用いて得られた threshold cycle (Ct) からスタンダードカーブを決定し, 1.0×10^1 から 1.0×10^6 コピーまでのリニアレンジを得た。データ解析は, ABI PRISM Sequence Detector version 1.0 (PE Applied Biosystems, Foster City, California, USA) を用い, HSV DNA 量を定量した。これらのプライマーは目的とする HSV DNA 以外のゲノム DNA は増幅しなかった。

統計処理

各薬剤投与群における Plaque Assay 陽性サンプル数に関しては, Fisher's exact probability test にて検定し, Real-time PCR による HSV-DNA 量に関しては, Mann-Whitney U test 及び Welch test にて検定した。

結果

表 2, 3, 4 に組織の Plaque Assay の結果を示す。三叉神経節および眼球における検討で, AsA 内服群, Zn 内服群, AMP 筋注群においては, コントロール群と比較しブラック陽性率に有意の差を認めなかった。GM 腹注群では眼球においては有意の差を認めなかったが, 三叉神経節においてコントロー

表 2 内服群再活性化後に HSV-1 が検出されたサンプル数と割合 (AsA, Zn)

	生食内服	AsA 内服	Zn 内服
三叉神経節	5/20 (20%)	2/15 (13%)	8/25 (32%)
眼球	6/20 (30%)	1/15 (7%)	3/26 (12%)

陽性サンプル数/総サンプル数を示す。下段 () 内は再活性化率。

表 3 筋注群再活性化後に HSV-1 が検出されたサンプル数と割合 (AMP)

	生食筋注	AMP 筋注
三叉神経節	5/21 (24%)	4/20 (20%)
眼球	5/22 (23%)	4/22 (18%)

陽性サンプル数/総サンプル数を示す。下段 () 内は再活性化率。

表 4 腹注群再活性化後に HSV-1 が検出されたサンプル数と割合 (GM)

	DMSO 腹注	GM 腹注
三叉神経節	11/24 (46%)	*3/22 (14%)
眼球	5/24 (21%)	4/24 (17%)

陽性サンプル数/総サンプル数を示す。下段 () 内は再活性化率。

※: GM 腹注群とコントロール群との比較にて有意差を認めた (Fisher's exact probability test. $P < 0.05$).

表 5 内服群再活性化後の三叉神経節及び眼における HSV DNA Copy 数 (AsA, Zn)

	生食内服	AsA 内服	Zn 内服
三叉神経節	$2.72 \pm 3.99 \times 10^3$ (n=20)	$3.58 \pm 5.47 \times 10^3$ (n=15)	$1.45 \pm 2.55 \times 10^3$ (n=25)
眼球	$5.50 \pm 14.6 \times 10^1$ (n=20)	$1.21 \pm 2.02 \times 10^2$ (n=15)	$4.58 \pm 10.1 \times 10^1$ (n=26)

数値は平均値±標準偏差を示す。

ル群と比較し, ブラック陽性率に有意の差を認めず。すなわち, Plaque Assay による検討で, GM 腹注はマウスヘルペス性角膜炎の再活性化抑制効果を認めた。

表 5 から 7, 図 1 から 3 に, Real-time PCR の結果を示した。

まず, 表 5 及び図 1 に AsA 内服群, Zn 内服群の Real-time PCR の結果を示す。両群とも三叉神経節

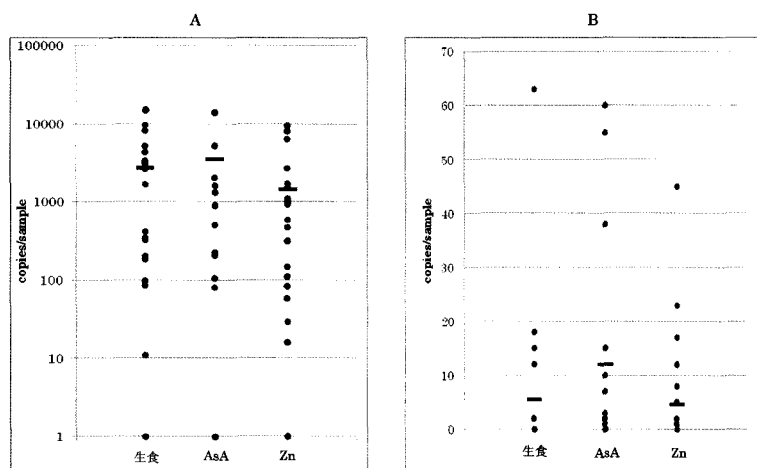


図1 内服群再活性化後の三叉神経節及び眼球における HSV DNA Copy 数 (AsA, Zn)
各点は、各三叉神経節(A)および眼球(B)における HSV DNA Copy 数を、バーは各群の平均 DNA Copy 数を示す。

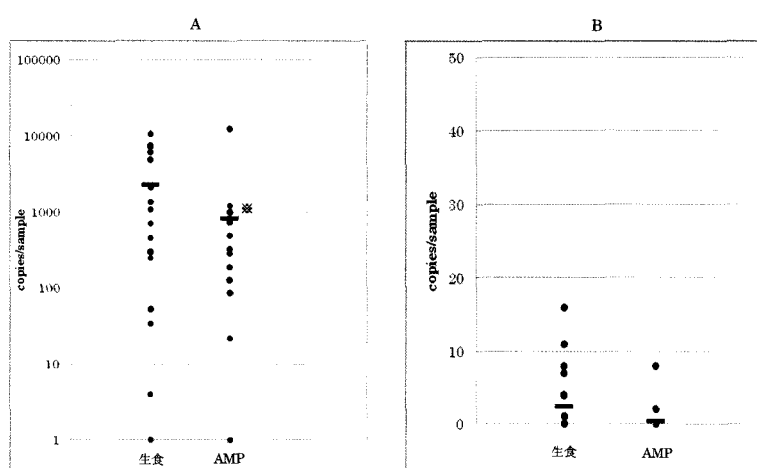


図2 筋注群再活性化時の三叉神経節及び眼球における HSV DNA Copy 数 (AMP)
各点は、各三叉神経節(A)および眼球(B)における HSV DNA Copy 数を、バーは各群の平均 DNA Copy 数を示す。
※: AMP 筋注群とコントロール群との比較にて有意差を認めた (Mann-Whitney U Test, $P < 0.05$)。

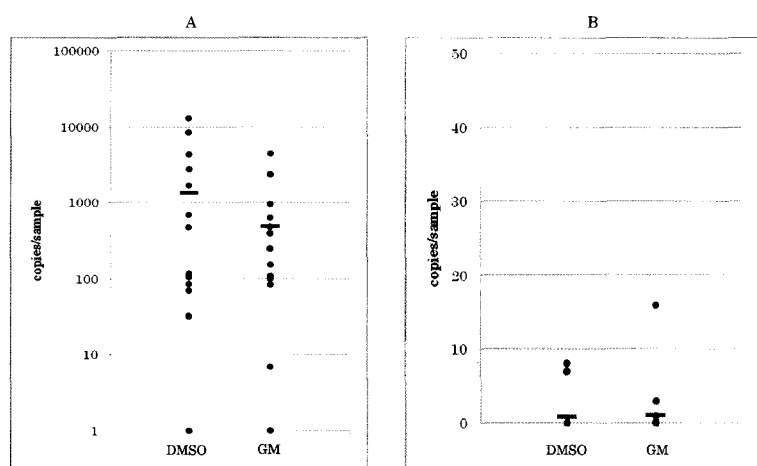


図3 腹注群再活性化時の三叉神経節及び眼球における HSV DNA Copy 数 (GA)
各点は、各三叉神経節(A)および眼球(B)における HSV DNA Copy 数を、バーは各群の平均 DNA Copy 数を示す。

および眼球においてコントロール群と比較し有意差を認めなかった。

表6及び図2にAMP筋注群のReal-time PCRの結果を示す。AMP筋注群は生食筋注群と比較して、眼球においては有意の差を認めなかったが、三叉神経節におけるウイルスDNA検出コピー数に有意な減少を認めた。すなわち、AMP筋注はマウスへ

ルペス性角膜炎の三叉神経節での再活性化に対する抑制効果を認めた。

表7及び図3にGM腹注群のReal-time PCRの結果を示す。三叉神経節および眼球の両者ともに有意の差を認めなかったが、三叉神経節においては、ウイルスDNA検出コピー数が少ない傾向を認めた。

表6 筋注群再活性化時の三叉神経節及び眼球におけるHSV DNA Copy数 (AMP)

	生食筋注	AMP筋注
三叉神経節	2.30±3.16×10 ³ (n=21)	*8.39±27.2×10 ² (n=20)
眼球	2.55±4.45×10 ¹ (n=22)	4.5±17.4×10 ⁻¹ (n=22)

数値は平均値±標準偏差を示す。

※：AMP筋注群とコントロール群との比較にて有意差を認めた (Mann-Whitney U test, P<0.05)。

表7 腹注群再活性化時の三叉神経節及び眼球におけるHSV DNA Copy数 (GM)

	DMSO腹注	GM腹注
三叉神経節	1.34±3.17×10 ³ (n=24)	4.89±10.3×10 ² (n=22)
眼球	9.17±24.8×10 ⁻¹ (n=24)	1.08±3.34×10 ¹ (n=24)

数値は平均値±標準偏差を示す。

考 察

今回、AsA, Zn, AMP, GMのHSV-1再活性化抑制効果を、マウスヘルペス性角膜炎モデルを用いて検討した。Plaque Assayによる検討ではGM腹注(表4)が、またReal-time PCRによる検討ではAMP筋注(表6, 図2)が、有意なHSV-1再活性化抑制効果を示した。これらの薬物のラット, 家兎での有効性, ヒトへの安全性, 投与期間など異なる検討をしたうえで、ヒトヘルペス性角膜炎再発抑制に有用であるか調べていきたい。

GMはHsp 90のATP/ADP結合ポケット(binding pocket)に結合することでHsp 90活性を抑制する³²。Hsp 90は細胞質にもっとも多く存在するタンパク質の一つであり、ATP依存性に発現し、アポトーシス, 細胞周期, シグナル伝達をするステロイドホルモン受容体などに大きく関わっていることが知られており、現在抗癌剤として臨床治験が実施されている³³。Liら³²は、Vero細胞中でのHSV-1 DNA複製をGMが阻害したと報告し、さらにこの阻害機序は、ACVのようなウイルスDNAポリメラーゼ阻害による抗ウイルス作用ではなく、サイクリン依存性プロテインキナーゼなど細胞周期調節因子を標的とするものであり、多くのウイルスに対しても応用可能であると述べている。HSV-1 DNAの複製抑制により、ヘルペス性角膜炎急性期においてGMが、症状, 所見の悪化を抑制する可能性があり、今後の検討に値すると考える。

今回の研究では、GM腹注は三叉神経節でのPlaque Assayによる検討で有意にウイルス量を減少させ(表4)、Real-time PCRの結果においても、有意ではないもののHSV-1の再活性化抑制傾向を認めた(表7, 図3)。Plaque AssayとReal time PCRの結果に、やや差が認められた理由として、以下のことが考えられる。

Plaque Assayではlive virusを検出するが、Real time PCRではウイルスDNAを証明するため、live virusのみならず潜伏感染状態にあるウイルスDNAも検出する。急性期における検討では、ウイルス力価とウイルスDNAコピー数は、同様の傾向を示すと考えられるが、潜伏感染および再活性化実験においては、両者の結果が必ずしも一致しないことが予想される。そのため再活性化での評価を下す場合、Plaque Assay, Real time PCRの順に結果を重要視するべきと考えられる。一方、GM腹注のコントロール群であるDMSO腹注(46%) (表4)は、生食内服群(20%) (表2)あるいは生食筋注群(24%) (表3)と比較すると再活性化率が高く、腹注操作自体が再活性化を促している可能性が考えられた。このような操作が再活性化を促すことは、角膜を場としても証明されている³⁴。すなわちShimomura³⁴らは、HSV-1潜伏感染白色家兎において、6-hydroxydopamineイオントフォーシスおよびエピネフリン点眼により、100%の再活性化率を認め、一方、角膜擦過のみでも、12%に再活性化を示したと報告している。

cAMPの細胞内濃度の上昇は、cAMP依存性プロテインキナーゼ(PKA)を活性化し、さらにPKAはCREBをリン酸化する²⁰。この経路は、細胞の増殖や分化、またTリンパ球の分化増殖などに重要な役割を果たすといわれている²¹。またHSVにおいても、その活性化や増殖に関与するとされる²¹。Blueら³⁵はマウス皮膚におけるAMPのHSV再活性化抑制効果を検討しており、コントロール群と比較し、有意に再活性化を抑制したとしている。またSklarら³⁶は、再発性口唇ヘルペスの患者36名に対し、AMP筋注を行っている。治療開始前の平均年間再発回数が6.3回であったのに対し、1ヶ月から2年の経過観察中で32名(88.9%)の患者で再発ゼロであったと報告している。しかし、Blueら³⁵及びSklarら³⁶の論文は、所見, 症状の改善の有無に関してのみの報告であり、定量性に乏しいと考える。今回の研究では、AMPの抑制効果を潜伏感染マウスを用いて定量的に示すことができた(図2)。

AsAは、その不足によりコラーゲン生成不全や免疫能の低下などを引き起こすことが知られており、

近年では AsA の抗癌作用が注目され⁹⁷, 現在臨床治験中である。また抗ウイルス作用についても報告があり, Hovi ら¹⁵ は再発性口唇ヘルペス患者に対し AsA 溶解液の塗布にてプラセボ群と比較し有意に, その治癒期間, 有症状期間の短縮を認めたとしている。また Furuya ら¹⁶ は in vitro での AsA の抗ウイルス作用の検討を行っており, 容量依存性に抗ウイルス作用を示したと報告している。今回の研究では, AsA 内服に HSV 再活性化に対する抑制効果は認められなかった(表 2, 図 1)が, 過去の報告^{15,16} は病変に直接塗布あるいは MEM (minimum essential medium)中に溶解されていた事を考えると, ヘルペス性角膜炎急性感染期の AsA 点眼の効果についてさらに検討する余地があると思われる。

Zn は, 100種を超える酵素活性において重要な役割を担っており, RNA ポリメラーゼや DNA ポリメラーゼの産生や細胞性免疫に関与している^{17,18}。Arens ら¹⁷ は in vitro において有意に HSV を不活化したと報告しており, また Femiano ら¹⁸ は, 再発性口唇ヘルペス患者 20 名に対し, その抑制効果を検討し, コントロール群と比較し, 再発回数及び治癒までに要した期間が減少したと報告している。我々の検討においては, Zn 内服に HSV 再活性化に対する抑制効果は認められなかった(表 2, 図 1)。Zn 内服および AsA 内服では, 血中濃度が一定に保たれない可能性が問題点としてあげられ, 今後は内服濃度, そして投与法を変更するなど, 再検討する必要があると考えられた。

本研究ではマウスヘルペス性角膜炎において, AMP および GM が HSV-1 再活性化抑制効果を示した。今後, さらに検討が必要と考えられるが, 有効なヘルペス性角膜炎再発抑制方法が判明すれば, 再発を繰り返す症例, および角膜瘢痕により永続的な視力障害を引き起こす症例が, 有意に減少すると考える。

謝 辞

稿を終えるにあたり, 御指導, 御校閲を賜りました下村嘉一教授に深甚なる謝意を表します。また終始御助言, 御指導いただきました, 松垣史郎講師ならびに福田昌彦講師に感謝の意を表します。

文 献

- Nesburn AB, Dickison R, Radtore M (1976) The effect of trigeminal nerve and ganglion manipulation on recurrence of ocular herpes simplex in rabbits. *Invest Ophthalmol* 15: 726-731
- Shimomura Y, Mori Y, Inoue Y, Kiritooshi A, Ohashi Y, Manabe R (1993) Herpes simplex virus latency in human cornea. *Jpn J Ophthalmol* 37: 318-324
- Shimomura Y, Deai T, Fukuda M, Higaki S, Hooper LC, Hayashi K (2007) Corneal buttons obtained from patients with HSK harbor high copy numbers of the HSV genome. *Cornea* 26: 190-193
- Blatt AN, Laycock KA, Brady RH, Traynor P, Krogstad DJ, Pepose JS (1993) Prophylactic acyclovir effectively reduces herpes simplex virus type 1 reactivation after exposure of latently infected mice to ultraviolet B. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 34: 3459-3465
- Sawtell NM, Thompson RL (1992) Rapid in vivo reactivation of herpes simplex virus in latently infected murine ganglionic neurons after transient hyperthermia. *J Virol* 66: 2150-2156
- Hill JM, Wen R, Halford WP. Pathogenesis and molecular biology of ocular HSV in the rabbit (1998) In: Herpes simplex virus protocols. Brown MS, Maclean AR, eds. *Methods in Molecular Medicine* Totowa, NJ: Human Press: 291-315
- Varnell ED, Kaufman HE, Hill JM, Thompson HW (1995) Cold stress-induced recurrences of herpetic keratitis in the squirrel monkey. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 36: 1181-1183
- Haruta Y, Rootman DS, Xie LX, Kiritoshi A, Hill JM (1989) Recurrent HSV-1 corneal lesions in rabbits induced by cyclophosphamide and dexamethasone. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 30: 371-376
- Wald A, Selke S, Warren T, Aoki FY, Sacks S, Diaz-Mitoma F, Corey L (2006) Comparative efficacy of famciclovir and valacyclovir for suppression of recurrent genital herpes and viral shedding. *Sex Transm Dis* 33: 529-533
- Scott LL, Hollier LM, McIntire D, Sanchez PJ, Jackson GL, Wendel GD (2002) Acyclovir suppression to prevent recurrent genital herpes at delivery. *Infect Dis Obstet Gynecol* 10: 71-77
- Gilbert S, Corey L, Cunningham A, Malkin JE, Stanberry L, Whitley R, Spruance S (2007) An update on short-course intermittent and prevention therapies for herpes labialis. *Herpes* 14 (Suppl): 13A-18A
- The Herpetic Eye Disease Study Group (1998) Acyclovir for the Prevention of Recurrent Herpes Simplex Virus Eye Disease. *N Engl J Med* 339: 300-306
- Itahashi M, Higaki S, Shimomura Y (2008) Effects of anti herpetic drugs on mice with herpetic epithelial keratitis after reactivation of herpes simplex virus type 1. *Semin Ophthalmol* 23: 241-247
- Higaki S, Itahashi M, Deai T, Fukuda M, Shimomura Y (2006) Effect of oral valacyclovir on herpetic keratitis. *Cornea* 25 (Suppl): S64-S67
- Hovi T, Hirvimies A, Stenvik M, Vuola E, Pippuri R (1995) Topical treatment of recurrent mucocutaneous herpes with ascorbic acid-containing solution. *Antiviral Res* 27: 263-270
- Furuya A, Uozaki M, Yamasaki H, Arakawa T, Arita M, Koyama AH (2008) Antiviral effects of ascorbic and dehydroascorbic acids in vitro. *Int J Mol Med* 22: 541

- 545
17. Arens M, Travis S (2000) Zinc Salts Inactivate Clinical Isolates of Herpes Simplex Virus In Vitro. *J Clin Microbiol* 38: 1758-1762
 18. Femiano F, Gombos F, Scully C (2005) Recurrent herpes labialis: a pilot study of the efficacy of zinc therapy. *J Oral Pathol Med* 34: 423-425
 19. Ackland-Berglund CE, Davido DJ, Leib DD (1995) The roles of the cAMP-response element and TATA box in expression of the herpes simplex virus type 1 latency-associated transcripts. *Virology* 210: 141-151
 20. Kenny JJ, Krebs FC, Hartle HT, Gartner AE, Chatton B, Leiden JM, Hoeffler JP, Weber PC, Wigdahl B (1994) Identification of a second ATF/CREB-like element in the herpes simplex virus type 1 (HSV-1) latency-associated transcript (LAT) promoter. *Virology* 200: 220-235
 21. Millhouse S, Kenny JJ, Quinn PG, Lee V, Wigdahl B (1998) ATF/CREB elements in the herpes simplex virus type 1 latency-associated transcript promoter interact with members of the ATF/CREB and AP-1 transcription factor families. *J Biomed Sci* 5: 451-464
 22. Necklers LM (2000). Can the heat shock protein 90 inhibitor geldanamycin be designed to specifically inhibit HER-2 tyrosine kinase? *Drug Resist Updat* 3: 203-205
 23. Higaki S, Gebhardt B, Lukiw W, Thompson H, Hill J (2003) Gene expression profiling in the HSV-1 latently infected mouse trigeminal ganglia following hyperthermic stress. *Curr Eye Res* 26: 231-238
 24. 板橋幹城 (2005) バラシクロビル内服によるマウス上皮型角膜ヘルペスに対する効果. *近畿大医誌* 30: 113-122
 25. Gebhardt BM, Varnell ED, Kaufman HE (2005) Inhibition of cyclooxygenase 2 synthesis suppresses Herpes simplex virus type 1 reactivation. *J Ocul Pharmacol Ther* 21: 114-120
 26. Gebhardt BM, Varnell ED, Kaufman HE (2004) Acetylsalicylic acid reduces viral shedding induced by thermal stress. *Curr Eye Res* 29: 119-125
 27. Gebhardt BM, Kaufman HE, Hill JM (2004) Effect of acyclovir on thermal stress-induced herpesvirus reactivation. *Curr Eye Res* 29: 137-144
 28. Gebhardt BM, Wright GE, Xu H, Focher F, Spadari S, Kaufman HE (1996) 9-(4-Hydroxybutyl)-N2-phenyl-guanine (HBPG), a thymidine kinase inhibitor, suppresses herpes virus reactivation in mice. *Antiviral Res* 30: 87-94
 29. Ito Y, Kimura H, Yabuta Y, Ando Y, Murakami T, Shiomi M, Morishima T (2000) Exacerbation of herpes simplex encephalitis after successful treatment with acyclovir. *Clin Infect Dis* 30: 185-187
 30. Fukuda M, Deai T, Hibino T, Higaki S, Hayashi K, Shimomura Y (2003) Quantitative analysis of herpes simplex virus genome in tears from patients with herpetic keratitis. *Cornea* 22 (Suppl): S55-S60
 31. Deai T, Fukuda M, Hibino T, Higaki S, Hayashi K, Shimomura Y (2004) Herpes simplex virus genome quantification in two patients who developed herpetic epithelial keratitis during treatment with antiglaucoma medications. *Cornea* 23: 125-128
 32. Li YH, Tao PZ, Liu YZ, Jiang JD (2004) Geldanamycin, a ligand of heat shock protein 90, inhibits the replication of herpes simplex virus type 1 in vitro. *Antimicrob Agents Chemother* 48: 867-872
 33. Nowakowski GS, McCollum AK, Ames MM, Mandrekar SJ, Reid JM, Adjei AA, Toft DO, Safgren SL, Erlichman C (2006) A Phase I Trial of Twice-Weekly 17-Allylamino-Demethoxy-Geldanamycin in Patients with Advanced Cancer. *Clin Cancer Res* 12: 6087-6093
 34. Shimomura Y, Gangarosa LP Sr, Kataoka M, Hill JM (1983) HSV-1 shedding by iontophoresis of 6-hydroxydopamine followed by topical epinephrine. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 24: 1588-1594
 35. Blue WT, Winland RD, Stobbs DG, Kirksey DF, Savage RE (1981) Effects of Adenosine Monophosphate on the Reactivation of Latent Herpes Simplex Virus Type 1 Infections of Mice. *Antimicrob Agents Chemother* 20: 547-548
 36. Sklar SH, Buimovici-Klein E (1979) Adenosine in the treatment of recurrent herpes labialis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 48: 416-417
 37. Chen Q, Espey MG, Krishna MC, Mitchell JB, Corpe CP, Buettner GR, Shacter E, Levine M (2005) Pharmacologic ascorbic acid concentrations selectively kill cancer cells: Action as a pro-drug to deliver hydrogen peroxide to tissues. *Proc Natl Acad Sci USA* 102: 13604-13609