

ロックは、複雑なシアロ糖鎖構築において有用であった。従って、理論的には我々のシアリル化反応の活用により、多様なシアロ・オリゴシアロ糖鎖の合成が可能である。また、*N*-グリコリルシアル酸、KDNのチオグリコシド供与体においても同様の結果が示されている¹²⁾。

ところが、最近になり、シアル酸の部分修飾体を含む糖鎖の生物機能に対する関心が高まり、シアル酸の分子多様性を網羅できる新しい合成法の必要性が生じてきた。冒頭に述べたように、シアル酸ファミリーに属する類縁体は40を超えるが、それらはある特定の水酸基がアセチル化、ラクチル化、メチル化、硫酸化、リン酸化による修飾を受けたもの、また、アミノ基がグリコリル化されたもの、遊離のものである。また、最近、我々は共同研究者らとともに、生体組織において1,5-ラクタム化したピシクロシアル酸の存在を抗体反応のレベルで検出している(図3)¹³⁾。さらに、海洋動物からは、非常に珍しい構造を有するジシアロ糖鎖が数多く発見されている¹⁴⁾。

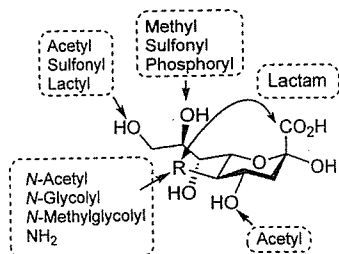


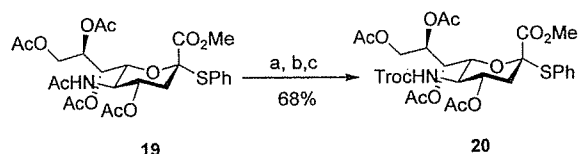
Fig. 3 Diversity of sialic acid at the functionality level.

3.1 *N*-Troc シアル酸供与体の反応性と有用性¹⁵⁾

上述のシアル酸類縁体のうち、*N*-Gc 体は、通常ヒトの組織中には発現されていないが、がん胎児性抗原として発現することが報告されている^{16a)}。また、異種臓器移植の際に、ヒトの免疫細胞が *N*-Gc 糖鎖を異種抗原として認識することが知られている^{16b)}。従って、*N*-Gc シアル酸含有糖鎖は、がんワクチン開発や臓器移植研究における広い応用が見込まれる。また、1,5-ラクタム体は、我々が予見しているラクタム体-アミノ体の相互変換による糖鎖認識制御機構^{13b)}の検証に不可欠である。

そこで我々は、以上の生物学的、医薬学的応用を視野に入れ、まずアミノ基の修飾に関する類縁体、すなわち、*N*-Ac 体、*N*-Gc 体、 NH_2 体、ラクタム体を効率かつ簡便に合成する手法の開発に着手した。我々が容易に入手可能なシアル酸は、主に *N*-Ac 体であるため、*N*-Ac 体を種々のアミノ系類縁体に分岐可能な鍵化合物へと誘導することが重要である。まず、その鍵化合物に要求されることは、穏和条件下で、アミノ基を遊離とすることができ、その上、収率よくそれぞれのアシル化が行えることである。このような条件を満たすアミノ基の保護基として、Boc, Cbz, Fmoc, Troc(2,2,2-トリクロ

ロエトキシカルボニル)基を検討した結果、保護および脱保護の効率、カップリング反応の化学的条件に対する安定性、そしてその保護基を導入したシアル酸供与体としての反応性の点から総合的に判断して、Troc 基が最も適切であることがわかった。まず、樋口らの方法¹⁷⁾に従い、既知のシアル酸 *N*-Ac チオグリコシド体 19 にメタノール還流下、メタンスルホン酸を作用させ、脱 *N*, *O*-アセチル化を行い、アミノ基、水酸基を遊離とし、続いて TrocCl または TrocOSu¹⁸⁾との反応により、アミノ基を選択的に Troc 保護し、水酸基を再アセチル化することで、*N*-Troc シアル酸供与体 20 を収率よく調製できた(スキーム 8)。



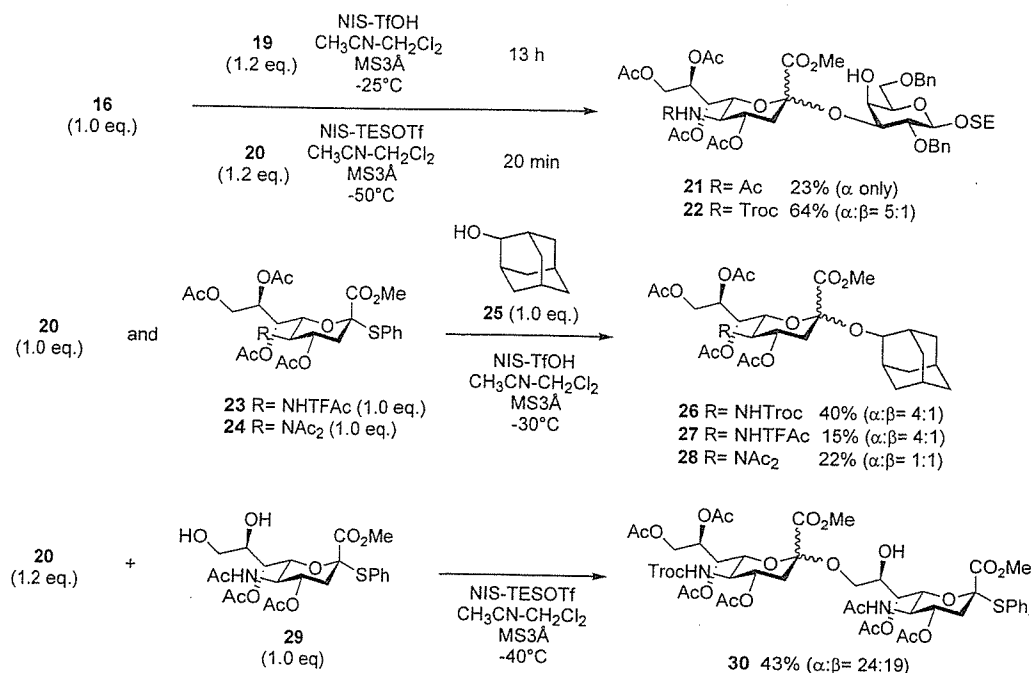
Scheme 8 Preparation of *N*-Troc-protected sialyl donor. Reagents and conditions: a) MsOH/MeOH, reflux, 24 h; b) TrocCl, Et₃N/MeOH, 0 °C → RT, 30 min; c) Ac₂O, Py/RT, 16 h.

次に、この *N*-Troc 体 20 のグリコシル供与体としての反応性を検討した。その結果として、*N*-Troc 体 20 は従来の *N*-Ac 体 19 より、極めて反応性の高い供与体であることがわかった。比較実験では、ガラクトース受容体 16 との縮合収率は、*N*-Ac 体の 23% に対し、*N*-Troc 体では 54% の $\alpha(2-3)$ グリコシド 22 とともに、約 10% の収率で 3 位、4 位水酸基が同時にシアリル化された 3 糖も生成した。また、他に高反応性供与体 23¹⁹⁾、24²⁰⁾との競合的グリコシド化試験において、*N*-Troc 体のグリコシドが最も多く得られた。この結果より、5 位アミノ基の置換基において、Troc > TFAc > Ac₂ >> Ac という反応性の序列が判明した(スキーム 9)。この 5 位の置換基効果による反応性の差を利用して、同じフェニルスルファニル基を脱離基として持つ *N*-Troc 体 20、*N*-Ac 体 29 との間で、“Armed-Disarmed”²¹⁾様のシアル酸カップリング反応を実施し、中程度の収率で $\alpha(2-9)$ シアル酸二量体の合成を行った。

また、以上の *N*-Troc シアル酸供与体による縮合検討から次のことがわかった。

- ① α 選択性は、中程度である ($\alpha:\beta = 4:1-5:1$)。
- ② α 体と β 体の極性差が、比較的大きい ($\Delta R_f =$ 約 0.2)。
- ③ 脂溶性が適度である。

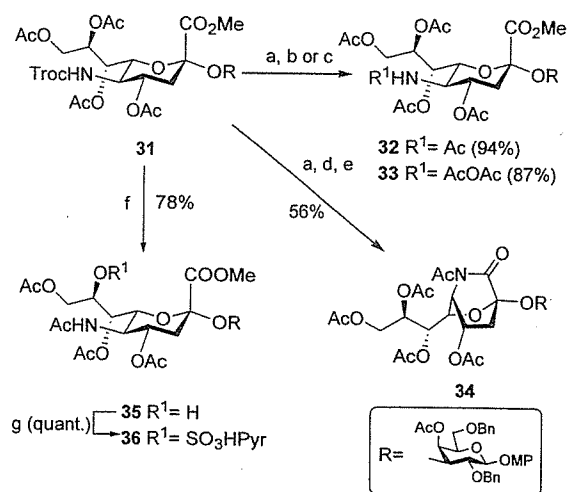
①については、田中、高橋らは、より高い選択性を達成しているが²²⁾、筆者らの用いた基質の範囲では、中程度であった。②は、実際の糖鎖合成において特筆すべき点であり、この傾向は、後述する糖鎖合成でも認めら



Scheme 9 Coupling reactions of *N*-Troc sialyl donor with various acceptors.

れ、立体異性体の分割が、*N*-Ac 体と比べ格段に容易であった。また、③の特質も実際の合成において重要で、*N*-Ac 体と比べ、ニトリル系、塩素系、芳香族系の溶媒に対して易溶であり、反応、反応処理、精製の各工程での取り扱いが容易であった。このように、特異な反応性に加えて *N*-Troc シアル酸供与体は、実用性の高いユニットであることがわかった。

続いて、このカップリング反応によって得られた *N*-Troc シアロシド 31 をモデル化合物として、種々のシアル酸類縁体への変換を検討した(スキーム 10)。*N*-Troc 基の脱保護法として、亜鉛や二ヨウ化サマリウム²³⁾を用いた還元的手法が知られている。亜鉛を用いる方法は不均一系であるのに対して、二ヨウ化サマリウムは均一系で反応できることから、固相合成への応用を視野に入れた場合、より望ましい条件であるが、二ヨウ化サマリウムによる脱保護は進行しなかった。一方、亜鉛による脱保護反応を検討したところ、汎用されている亜鉛、酢酸/メタノール条件では、Troc 基は脱保護されるものの、発生した遊離のアミノ基に対する水酸基のアセチル基の転移と水酸基間での転移が起こり、多種混合物を与えた。このアセチル転移反応は、低極性溶媒の使用によりある程度まで抑制できたが、結果的には、酢酸中で亜鉛を作用させる条件が最適であることがわかった。このようにして得られたアミノ中間体は、無水酢酸、アセトキシアセチルクロリドとの反応により、*N*-Ac 体 32、および *N*-Gc 誘導体 33 を収率よく与え、また、メタノール中還流下で NaOMe を作用させることにより、1,5-ラクタム体 34 へと誘導できた。一方、*N*-Troc 体 31 に酢酸の 10% 1,4-ジオキサン溶液中で亜鉛を作用さ



Scheme 10 Conversion of 31 into variant sialosides. Reagents and conditions: a) Zn/AcOH, RT, 1 h–2 h; b) Ac₂O, Et₃N/THF, RT, 5 min; c) acetoxyacetyl chloride, Et₃N/THF, RT, 5 min.; d) NaOMe/MeOH, Drierite®, reflux, 2 d; e) Ac₂O, Py, DMAP/RT; f) Zn/10% AcOH in 1,4-dioxane, RT, 24 h; g) SO₃·Py./Py, RT, 1 h.

せると、8位水酸基上のアセチル基だけが特異的にアミノ基に転移し、対応する5-NAc-8-OH 体 35 を収率よく与えることがわかった。この反応により、これまで多段階を要した8位水酸基遊離体の合成が簡略化し、*N*-Troc 体から2段階で8位硫酸体 36 へ導くことができた。これは、他の8位水酸基修飾体(リン酸体、ラクチル体、メチル体)への合成にも応用可能であると思われる。

以上のように、*N*-Troc 体シアル酸を用いることで、種々のシアル酸類縁体へ効率的にアクセスすることが可能となり、その上、*N*-Troc シアル酸の高反応性の発見

で、シアロシド合成に新たな進展をもたらすこととなった。その一例として、最近我々は、*N*-Troc 供与体を活用した GM2 糖鎖の効率的新規構築法の確立に成功している²⁴⁾。

3.2 部分修飾シアル酸二量体を有する糖鎖の合成²⁵⁾

高反応性 *N*-Troc 型のシアル酸供与体を、さらに複雑なシアロ糖鎖の合成に応用できないかと考えた。下図に示したガングリオシド HLG-2, Hp-s6 は、近年、棘皮動物から続々と発見されている新種のガングリオシドの仲間である(図 4)。ナマコ的一种から発見された HLG-2²⁶⁾ には、*in vitro* のレベルで、ある種の神経細胞に対して神経突起伸張活性を示すことから、新しい神経機能回復薬開発への応用が期待されている。また、ウニの精子から単離された Hp-s6²⁷⁾ は、受精の先体反応に関する機能が示唆されている。これら 2 つのガングリオシドは、糖鎖構築中にそれぞれ部分修飾されたシアル酸残基を含み、かつシアル酸二量体を形成している。HLG-2 中に見られる $\alpha(2-4)$ ジシアル酸は新しいシアル酸間の結合様式である。

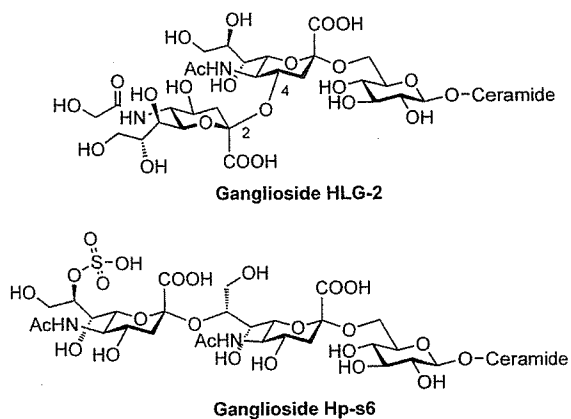


Fig. 4 New disialyl gangliosides.

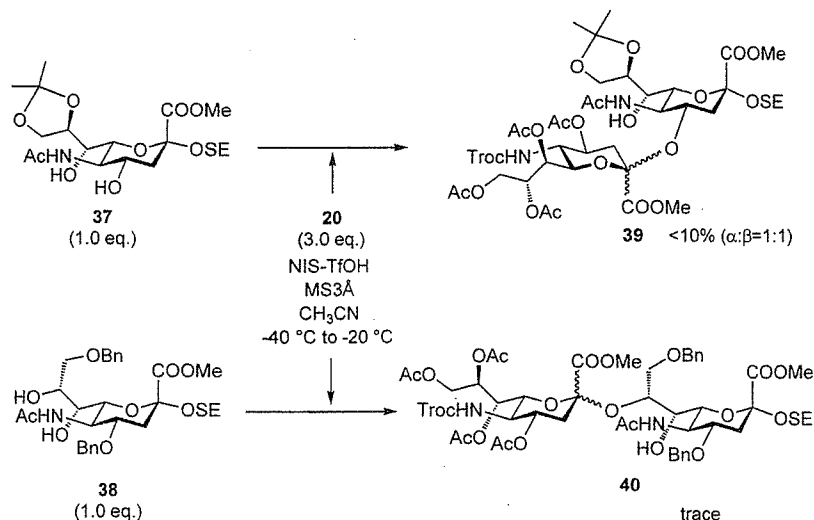
3.2.1 *N*-Troc シアル酸供与体の適用限界

そこで、我々はこの複雑な糖鎖構造の構築に、*N*-Troc 型供与体を応用することを着想した。すなわち、末端の修飾シアル酸構造に短工程で到達可能な上、グリコシル化における反応性の高さが最大限に活用できると考えた。まず、シアル酸二量体構築に関するモデル実験を行った(スキーム 11)。4 位および 8 位水酸基を遊離としたシアル酸受容体 37, 38 を合成し、続いて *N*-Troc 体 20 によるシアリル化を検討した。これまで、シアル酸の水酸基の反応性の序列は種々の実験結果から、 $9 > 4 > 8 > 7$ とされ、4 位へのシアリル化の収率は比較的高いものと期待したが、予想に反して、低収率でしか二量体 39 は得られなかった。また、同様にさらに反応性の低い 8 位水酸基においては、痕跡程度の(3%以下)二量体生成を確認するに留まった。この結果を受け、受容体側シアル酸水酸基の反応性を改良し、二量体構造の構築に取り組むこととした。

3.2.2 高反応性 1,5-ラクタムシアル酸受容体²⁵⁾

我々は、シアル酸 4 位 8 位水酸基の反応性の低さは、Schmidt らも推測しているように²⁸⁾、5 位アセトアミド基の立体障害に起因するものと考えた。Schmidt ら²⁸⁾ は、1,7-ラクトン体を合成し、8 位シアリル化を試みた。その結果、縮合収率は 54% と向上し、確かに水酸基の反応性が上昇したが、新しいグリコシドはすべて β 体として生成した。この結果は、ラクトン化によって、近接に配置された 4 位水酸基の立体障害が影響しているものと解釈できる。そこで我々は、1,5-ラクタム形成による舟形配座の固定化により、4 位、8 位水酸基双方へのアミド基の立体的影響を回避し、ジシアル酸合成を達成しようと発案した(図 5)。

まず、HLG-2 に向けては、グルコース受容体 41 とのカップリングにより二糖 42 とした後に、シアル酸部分



Scheme 11 Unsuccessful sialylation of sialyl acceptors.

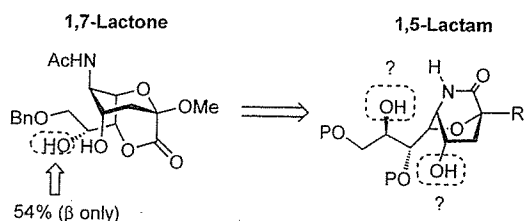


Fig. 5 From lacton to lactam.

の保護基の脱保護を行って、種々の分子内アミド化を検討した。DCC, WSCI·HClなどのカルボジイミド系の縮合剤を用いると複雑な混合物が生じた。一方、メタノール中 NaOMeにより、TFAc基、Ac基を脱保護した後、還流下でアミノ基とメチルエステルを反応させると、収率よく1,5-ラクタム体43を得られることがわかった。この方法により合成した二糖ラクタム体は、続いて一級水酸基の選択的ベンゾイル化により、 $\alpha(2-4)$ ジシアル酸構築に向けたトリオール受容体44へと導いた。一方、Hp-s6に向けては、シアル酸二量体構築を先に行い、その後、ジシアル酸供与体とグルコース受容体との反応により、三糖構造を組み立てるよう計画した。まず、*N*-TFAcシアル酸誘導体23から2段階を経て、8,9-アセタール保護体45とし、次に上述のワンポットラクタム化により、1,5-ラクタム体46へと誘導した。その後、4,7-水酸基のアセチル保護を経て、最後にベンジリデンの還元的開環反応²⁹⁾によって、8位水酸基のみが遊離の1,5-ラクタムシアル酸受容体49を合成した(スキーム12)。

得られた1,5-ラクタム体44, 49と*N*-Trocシアル酸供与体20, *N*-TFAcシアル酸供与体23とのカップリング反応を検討した(スキーム13)。トリオール受容体44の4位水酸基のシアリル化では、*N*-Troc体が α 体を66%, β 体を18%の収率で与えた。*N*-TFAc体の場合、

$\alpha(2-4)$ 体とともに、4位8位水酸基が同時にシアリル化された四糖体も生成し、その分、目的の成績体の収率が41%と目減りした。なお、 α 体と β 体はアセチル体51に誘導して、分離した。一方、フェニルスルフェニル基を有する受容体49の $\alpha(2-8)$ シアリル化では、*N*-Troc体で49%, *N*-TFAc体で71%の収率だったが、 β -異性体の生成は認められなかった。このグリコシル化では、橋頭位炭素に結合したフェニルスルフェニル基は、我々の予想どおり、Bredt則に準じて活性化されることなく安定であった。これらの反応によって新しく生成したグリコシドの立体化学の決定には、シアル酸がC5位修飾体であることを考慮して、常套的に用いられている¹H NMRの経験則³⁰⁾の適用を避け、選択的デカップリングにより、メチルエステルのカルボニル炭素とメチル基の水素とのカップリングを相殺し、1位炭素と3位アキシアル水素とのカップリング定数($^3J_{C-1, H-3ax}$ 値)を求めて決定した(図6)³¹⁾。化合物50, 51では、5.2-5.4 Hz, 化合物52, 53では6.7-6.9 Hzであり、これらの値は、それぞれの立体化学を支持しているものと判断した。

このように、1,5-ラクタム化による立体配座変換は、シアル酸水酸基の反応性を向上させ、 $\alpha(2-4)$ および $\alpha(2-8)$ ジシアル酸の構築を可能にした。また、この反応

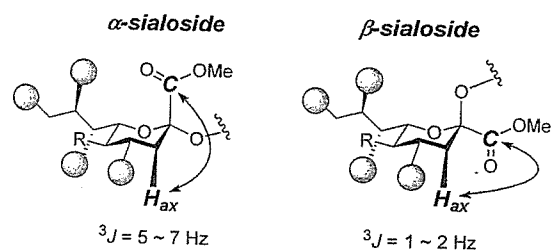
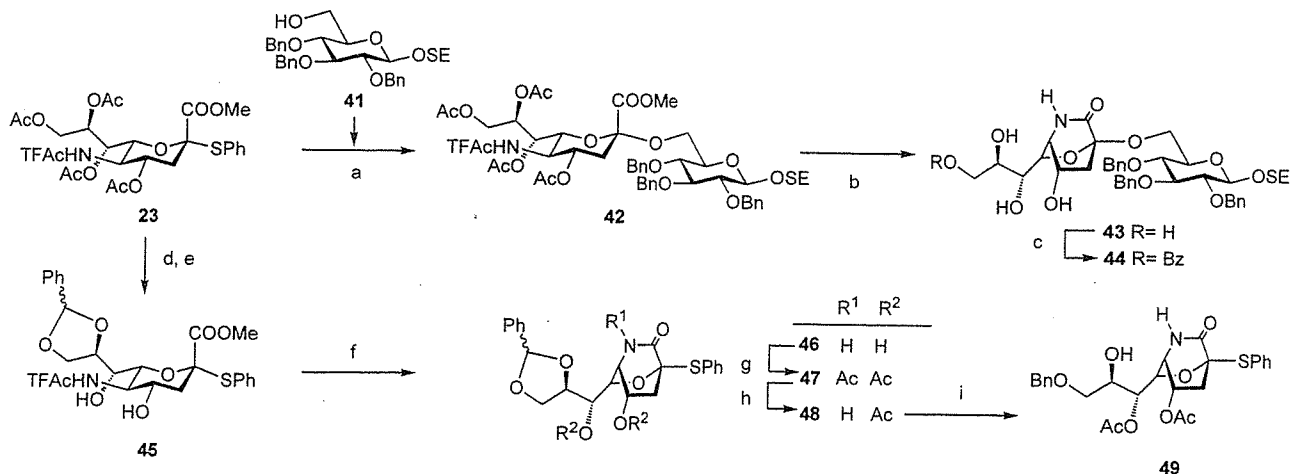
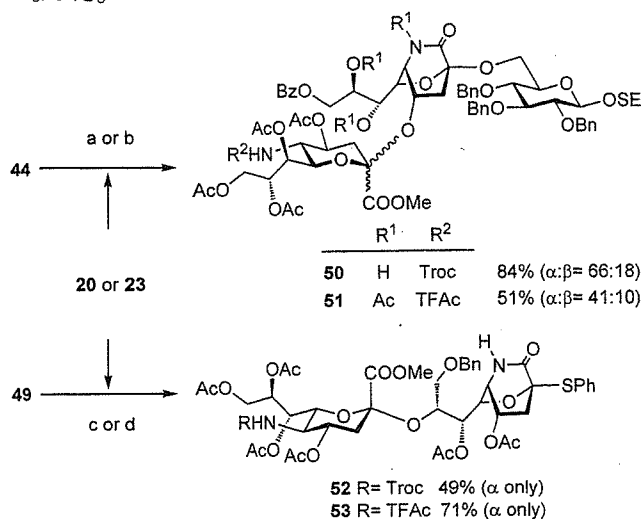


Fig. 6



Scheme 12 Reagents and conditions: a) 41, NIS-TfOH/CH₃CN-CH₂Cl₂, MS 3Å, -30 °C, 5 min, 74%; b) NaOMe/MeOH, Drierite, reflux, 44 h, 85%; c) BzCl, Py/CH₂Cl₂, -40 °C, 90 min, 79%; d) NaOMe/MeOH, RT, 29 h; e) PhC(OMe)₂, CSA/DMF, 40 °C, 2 h, 88% (2 steps); f) NaOMe/MeOH, Drierite, reflux, 5 d, 89%; g) Ac₂O, Py, DMAP/RT, 3 h; h) NH₂NH₂·AcOH/THF, RT, 80 min, 94% (2 steps); i) BH₃·NMe₃, AlCl₃/THF, MS 4Å, 0 °C to RT, 6 h, 74%.

系における収率から供与体の反応性を比較した場合、アクセプター 44 との反応では、*N*-Troc 体 20 は 4 位のみをシアリル化したが、*N*-TFAc 体 23 はわずかながら 8 位もシアリル化したこと、およびモノオールアクセプター 49 との収率の差を考慮すると、*N*-TFAc 体がよりラクタム受容体に対して高い反応性を有する供与体であると判断できる。しかしながら、立体異性体の分離および以後に控えているシアル酸の部分修飾の効率を合わせて勘案すると、*N*-Troc 供与体の使用が必然的となった。



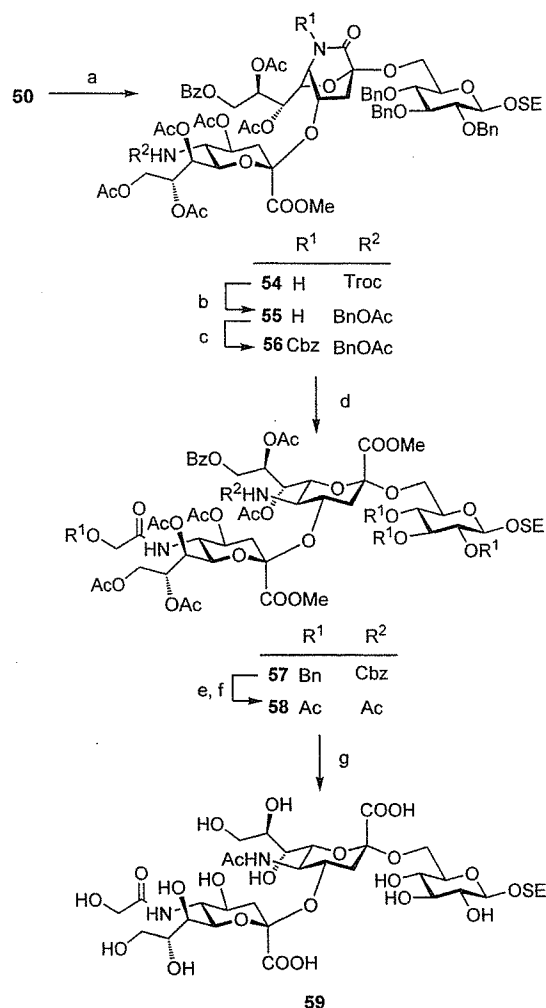
Scheme 13 Reagents and conditions: a) 20 (2.0 equiv), NIS-TfOH/EtCN, MS 3Å, -40 °C, 6 h; b) 23 (2.0 equiv), NIS-TfOH/EtCN, MS 3Å, -40 °C, 6 h; ii) Ac₂O, pyr, DMAP/40 °C, 17 h; c) 20 (3.0 equiv), NIS-TfOH/EtCN, MS 3Å, -80 °C, 5 h; d) 23 (3.0 equiv), NIS-TfOH/EtCN, MS 3Å, -80 °C, 3 h.

3.2.3 HLG-2, Hp-s6 糖鎖の合成²⁵⁾

次に、高収率で得られたジシアロ体をそれぞれ HLG-2, Hp-S6 糖鎖へと導くこととした。そのために、モデル化合物を用いてラクタムの開環反応を検討した。アミドの水素を炭酸エステルで置換し、ヒドラジンでアミド結合を開裂させる手法³²⁾を参考に、アセチル基を損なうことなく、ラクタムのみを開環させる手法を探索した。その結果、Cbz 基をアミドに導入し、含水アセトニトリル中での穏和なアルカリ加水分解により、選択的なラクタム開環を収率よく行えることがわかった。

HLG-2 の合成では、初めに先述した *N*-Gc 化の手法にのっとり、Troc 基を BnGc 基へと変換した後、Cbz 基の導入に続いてラクタムを開環し、連続的にヨウ化メチルによるカルボン酸のメチル化を行って、²C₅ 配座のメチルエステル体 57 へと導いた。さらに、3 段階を経て Cbz 基および Bn 基をアセチル基と置換し、完全アシル保護体 58 とした。最後に、定法により完全脱保護を行い HLG-2 糖鎖 59 の合成を完了した(スキーム 14)。

一方、Hp-s6 においては、52 のラクタムを上述の方

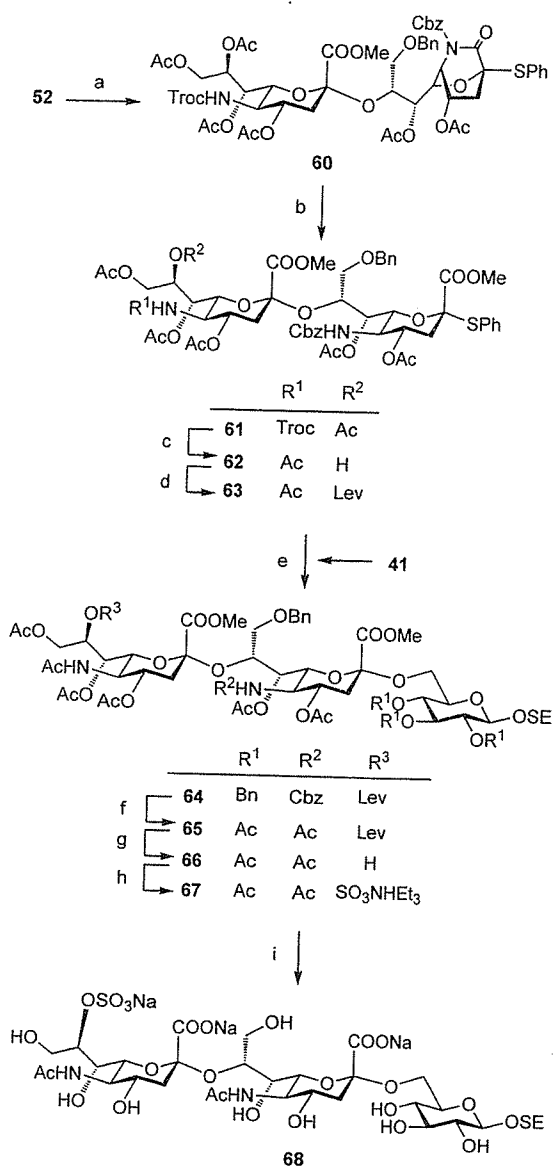


Scheme 14 Reagents and conditions: a) Ac₂O, Py/RT, 10 h, 89%; b) Zn/AcOH, rt, 2 h; ii) BnOAcCl/THF, RT, 1 h, 74% (2 steps); c) Cbz₂O, DMAP/Py, 40 °C, 26 h, 95%; d) i) Et₃N, H₂O/CH₃CN, RT, 2 d; ii) MeI, K₂CO₃/DMF, RT, 30 min, 74% (2 steps); e) i) H₂, 10% Pd(OH)₂-C, NH₃/EtOH, RT, 2 h, ii) then AcCl, rt, 1 h, 68% (2 steps); f) i) H₂, 10% Pd(OH)₂-C/EtOH; ii) Ac₂O, Py, RT, 54% (2 steps); g) i) NaOMe, MeOH, RT, 2 d, ii) 0.2 M KOH, RT, 1 d, 78% (2 steps).

法で開環し、フェニルスルファニル基の親硫黄性求電子種による酸化的活性化が可能な状態とした。さらに、合成の最終段階での 8 位硫酸化に備え、先述のアセチル転移を利用した 8 位遊離化反応を行った後に、水酸基をレプリノイル保護したジシアル酸供与体 63 へと導いた。つづいて、グルコース受容体 41 とのグリコシル化に供し、66% の収率で α 選択的にジシアリル三糖 64 を得ることができた。その後、保護基変換によりアシル保護体 65 とした後、8 位レプリノイル基の選択的脱保護により 8 位を遊離とした。最後に、硫酸化、完全脱保護により Hp-s6 糖鎖 68 を合成した(スキーム 15)。

おわりに

以上述べたように、ニトリル溶媒効果による α-選択



Scheme 15 a) CbzOSu, DMAP/Py, RT, 42 h, 79%; b) i) Et₃N, H₂O/CH₃CN, 40 °C, 45 h; ii) MeI, K₂CO₃/DMF, RT, 3 h, 79% (2 steps); c) Zn, AcOH/THF, RT, 28 h, 94%; d) LevOH, DCC, DMAP/CH₂Cl₂, RT, 2 h, 95%; e) 41, NIS-TfOH/EtCN, MS 3Å, -80 °C to -60 °C, 4 d; 66%; f) i) H₂, 10% Pd(OH)₂-C, NH₃/EtOH, RT, 1 h; ii) Ac₂O, Py, RT, 30 min, iii) H₂, 10% Pd(OH)₂-C/EtOH, 40 °C, 3 h; iv) Ac₂O, Py, RT, 12 h, 86% (4 steps); g) NH₂NH₂·AcOH/EtOH, RT, 6 h, 90%; h) SO₃·Py/Py, RT, 7 h, 65%; i) i) NaOMe, MeOH, 20 °C, 12 h, ii) then H₂O, 20 °C, 2 d, 67% (2 steps).

的シアルル化を鍵反応に、我々は、数多くのシアル酸含有糖鎖の合成を行ってきた。そして、シアル酸の分子多様性に対して、まず、多量体というシアル酸の構造修飾体の糖鎖への導入法を確立した。その後、部分修飾体の合成法として、*N*-Troc 供与体を用いる新たな手法を開発し、この研究は同時にシアル酸供与体における遠隔置換基効果の発見をもたらした。さらに、1,5-ラクタムシアル酸受容体の開発により、新たなシアル酸二量化技術が確立し、*N*-Troc 供与体との組み合わせにより、部分

修飾シアル酸二量体を含む新規ガングリオシド HLG-2, Hp-s6 の糖鎖合成に成功することができた。現在は、二量化技術をシアル酸オリゴマー合成法へと拡張している。

本研究プロジェクトは、岐阜大学農学部(現応用生物科学部)教授故長谷川明先生のもと始められたものであり、ここに深謝申し上げます。また、これらの研究成果は、主に石田秀樹博士、今村彰宏博士、小池悠介修士、小泉幸子修士、布施智明修士により実現したものであり、諸兄諸姉の絶大なる貢献に対し衷心よりの敬意と謝意を表します。

(2006年1月31日受理)

文献

- (a) T. Murase, H. Ishida, M. Kiso, A. Hasegawa, *Carbohydr. Res.*, 184, c1 (1988); (b) A. Hasegawa, T. Nagahama, H. Ohki, K. Hotta, H. Ishida, M. Kiso, *J. Carbohydr. Chem.*, 10, 493 (1991); シアルル化に関する総説: (c) G.-J. Boons, A. V. Demchenko, *Chem. Rev.*, 100, 4539 (2000)
- A. Kameyama, H. Ishida, M. Kiso, A. Hasegawa, *J. Carbohydr. Chem.*, 10, 549 (1991)
- T. Ikami, H. Ishida, M. Kiso, "Methods in Enzymology", Vol. 311, eds. A. H. Merrill, Jr., Y. A. Hannun, Academic Press, San Diego, 2000, p 547
- 木曾真, 石田秀治, 化学と生物, 39, 454 (2001)
- 佐藤ひろ, 北島健, 蛋白質 核酸 酵素, 48, 1730 (2003)
- O. Kanie, M. Kiso, A. Hasegawa, *J. Carbohydr. Chem.*, 7, 501 (1988)
- H. Ishida, Y. Ohta, Y. Tsukada, M. Kiso, A. Hasegawa, *Carbohydr. Res.*, 246, 75 (1993)
- H.-K. Ishida, H. Ishida, M. Kiso, A. Hasegawa, *Tetrahedron: Asymmetry*, 5, 2493 (1994)
- (a) H.-K. Ishida, H. Ando, H. Ito, H. Ishida, M. Kiso, A. Hasegawa, *J. Carbohydr. Chem.*, 16, 413 (1997); (b) K. Hori, N. Sawada, H. Ando, H. Ishida, M. Kiso, *Eur. J. Org. Chem.*, 2003, 3752
- (a) H. Ando, H. Ishida, M. Kiso, A. Hasegawa, *Carbohydr. Res.*, 300, 207 (1997); (b) H. Ando, H. Ishida, M. Kiso, *J. Carbohydr. Chem.*, 18, 603 (1999)
- C. Fotinou, P. Emsley, I. Black, H. Ando, H. Ishida, M. Kiso, K. A. Sinha, N. F. Fairweather, N. W. Isaacs, *J. Biol. Chem.*, 276, 32274 (2001)
- (a) A. Hasegawa, A. Uchimura, H. Ishida, M. Kiso, *Biosci. Biotech. Biochem.* 59, 1091 (1995); (b) T. Terada, M. Kiso, A. Hasegawa, *J. Carbohydr. Chem.*, 12, 425 (1993)
- (a) C. Galustian, A. M. Lawson, S. Komba, H. Ishida, M. Kiso, T. Feizi, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 240, 748 (1997); (b) C. Mitsuoka, K. Ohmori, N. Kimura, A. Kanamori, S. Komba, H. Ishida, M. Kiso, R. Kannagi, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96, 1597 (1999); (c) M. Yamaguchi, H. Ishida, A. Kanamori, R. Kannagi, M. Kiso, *J. Carbohydr. Chem.*, 23, 201 (2004)
- 樋口隆一, フェルマシア, 38, 851 (2002)
- H. Ando, Y. Koike, H. Ishida, M. Kiso, *Tetrahedron Lett.*, 44, 6883 (2003)
- (a) Y. Hirabayashi, H. Kasakura, M. Matsumoto, H. Higashi, S. Kato, N. Kasai, M. Naiki, *Jpn. J. Cancer Res.*, 78, 251 (1987); (b) H. Higashi, M. Naiki, S. Matsuo, K. Okouchi, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 79, 388 (1977)
- T. Sugata, R. Higuchi, *Tetrahedron Lett.*, 37, 2613 (1996)
- C.-T. Ren, C.-S. Chen, S.-H. Wu, *J. Org. Chem.*, 67, 1376

- (2002)
- 19) (a) S. Komba, C. Glalustian, H. Ishida, T. Feizi, R. Kannagi, M. Kiso, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 38, 1131 (1999); (b) C. De Meo, A. V. Demchenko, G.-J. Boons, *J. Org. Chem.*, 66, 5490 (2001)
- 20) A. V. Demchenko, G.-J. Boons, *Chem. Eur. J.*, 5, 1278, (1999)
- 21) D. R. Mootoo, P. Konradsson, U. Udodong, B. Fraser-Reid, *J. Am. Chem. Soc.*, 110, 5583 (1988)
- 22) (a) M. Adachi, H. Tanaka, T. Takahashi, *Synlett*, 2004, 609; (b) H. Tanaka, M. Adachi, T. Takahashi, *Chem. E. J.*, 11, 849 (2005)
- 23) T. P. Ananthanarayan, T. Gallagher, P. Magnus, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 1982, 709
- 24) T. Fuse, H. Ando, A. Imamura, N. Sawada, H. Ishida, M. Kiso, T. Ando, S.-C. Li, Y.-T. Li, *Glycoconj. J.* accepted
- 25) H. Ando, Y. Koike, S. Koizumi, H. Ishida, M. Kiso, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 44, 6759 (2005)
- 26) K. Yamada, R. Matsubara, M. Kaneko, T. Miyamoto, R. Higuchi, *Chem. Pharm. Bull.*, 49, 447 (2001)
- 27) T. Ijuin, K. Kitajima, Y. Song, S. Kitazume, S. Inoue, S. T. Haslam, H. R. Morris, A. Dell, Y. Inoue, *Glycoconj. J.*, 13, 401 (1996)
- 28) Y. E. Tsvetkov, R. R. Schmidt, *Tetrahedron Lett.*, 35, 8583 (1994)
- 29) M. Ek, P. J. Garegg, H. Hultberg, S. Oscarson, *J. Carbohydr. Chem.*, 2, 305 (1983)
- 30) (a) U. Dabrowski, H. Friebolin, R. Brossmer, M. Supp, *Tetrahedron Lett.*, 20, 4637 (1979); (b) H. Paulsen, H. Tietz, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 21, 927 (1982)
- 31) (a) H. Hori, T. Nakajima, Y. Nishida, H. Ohru, H. Meguro, *Tetrahedron Lett.*, 29, 6317 (1988); (b) J. Haverlamp, T. Spoormaker, L. Dorland, J. F. G. Vliegthart, R. Shauer, *J. Am. Chem. Soc.*, 101, 4851 (1979); (c) S. Prytulla, J. Lauterwein, M. Klessinger, J. Thiem, *Carbohydr. Res.*, 215, 345 (1991)
- 32) (a) L. Grehn, K. Gunnarsson, U. Ragnarsson, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 1985, 1317; (b) D. J. Kempf, *Tetrahedron Lett.*, 30, 2029 (1989)

PROFILE



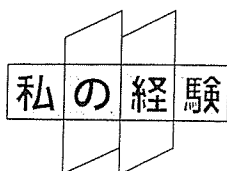
安藤弘宗 岐阜大学生命科学総合研究支援センター・助手 博士(農学)
 [経歴] 1999年岐阜大学大学院連合農学研究科博士課程修了, 同年科学技術振興事業団CREST中原チーム博士研究員, 2001年岐阜大学農学部教務補佐員, 2002年日本学術振興会特別研究員, 2003年10月より現職。
 [専門] 糖鎖工学, 有機合成化学。[連絡先] e-mail: hando@cc.gifu-u.ac.jp



石田秀治 岐阜大学応用生物科学部・教授 理学博士
 [経歴] 1988年北海道大学大学院理学研究科博士後期課程単位取得後退学, 同年岐阜大学農学部助手, 1990年同講師, 1993年同助教授, 2004年より現職。この間, 1991年-92年フンボルト財団研究員。1998年日本農芸化学会奨励賞。[専門] 生理活性物質学, 生命分子化学。[連絡先] e-mail: ishida@cc.gifu-u.ac.jp



木曾 眞 岐阜大学応用生物科学部・教授 農学博士
 [経歴] 1975年京都大学大学院農学研究科博士課程修了, 同年岐阜大学農学部助手, 1976年同講師, 1979年同助教授, 1990年同教授, 2004年改組により現職。1977年~1978年ウィスコンシン大学生化科学科研究員, 1994年ドイツDAAD招聘教授。2002年日本農芸化学会賞。[専門] 糖鎖工学, 応用生物有機化学。[連絡先] e-mail: kiso@cc.gifu-u.ac.jp



Birdshot chorioretinopathy の 1 例

—A case of birdshot chorioretinopathy—

岡本紀夫¹⁾ 栗本拓治¹⁾ 周允元¹⁾²⁾ 田上雄一¹⁾
濱田文¹⁾ 西村雅史¹⁾ 奥野壽臣³⁾ 三村治¹⁾

要 約

73歳の女性にみられた birdshot chorioretinopathy の 1 例を経験した。特徴的な脱色素斑が、黄斑部を中心として眼底全体に散在していた。フルオレセイン蛍光眼底検査 (FA) では斑点に一致する淡いびまん性の過蛍光を認めた。ステロイドの大量点滴療法後に、びまん性の蛍光漏出斑は一旦消失したが、経過観察中 FA にて視神経乳頭上からの蛍光漏出を認めた。しかし、2度のトリアムシノロンのテノン嚢下注射により消炎させることが可能であった。末梢血の human herpesvirus (HHV) 1 から 8 の DNA を nested polymerase chain reaction で調べたがすべて検出されなかった。

はじめに

Birdshot chorioretinopathy (以下 BCR) は、1980 年に Ryan と Maumenee¹⁾ により提唱されたぶどう膜炎で、その臨床的特徴は、前眼部の炎症は強くないが、視神経乳頭を中心に多数の脱色素斑が形成され、あたかも散弾銃を撃ったような黄白色の脱色素斑を認めることである。また、欧米の BCR は HLA-A29 との相関が高く、発症機序に免疫学的関与が強く示唆されている²⁾。一方、わが国における症例報告は 12 例と少なく^{3)~13)}、

病態はほとんど解明されていない。しかしながら、欧米の症例と比べ、HLA-A29 陽性の症例は報告されておらず、また、ステロイド治療に対する反応性や視力予後は比較的良い²⁾¹³⁾。そのため、日本人における BCR と白人の症例とは発症機序が異なる可能性が示唆されている¹³⁾。今回我々は、わが国では稀な BCR と考えられた 1 例を経験したので報告する。

I. 症 例

症 例：73 歳，女性

主 訴：両眼の飛蚊症

現病歴：2~3 日前より飛蚊症を自覚し、佐用共立病院眼科を受診した。

既往歴：本態性血小板血症（ヒドロキシカルバミド 1 日 1 cap 内服中）、喘息

初診時所見（2004 年 7 月 26 日）：右眼視力 0.5 p (0.9 p)、左眼視力 0.2 (0.8)。眼圧は右眼 15 mmHg、

¹⁾ Norio OKAMOTO, Takuji KURIMOTO, Ingen SHU, Yuichi TAGAMI, Aya HAMADA, Masashi NISHIMURA, Osamu MIMURA 兵庫医科大学眼科学教室

²⁾ Ingen SHU 佐用共立病院眼科

³⁾ Toshiomi OKUNO 兵庫医科大学病原微生物学教室

Key words：散在性脈絡網膜炎，脱色素斑，ぶどう膜炎，トリアムシノロン，birdshot chorioretinopathy, depigmented spots, uveitis, triamcinolone acetonide

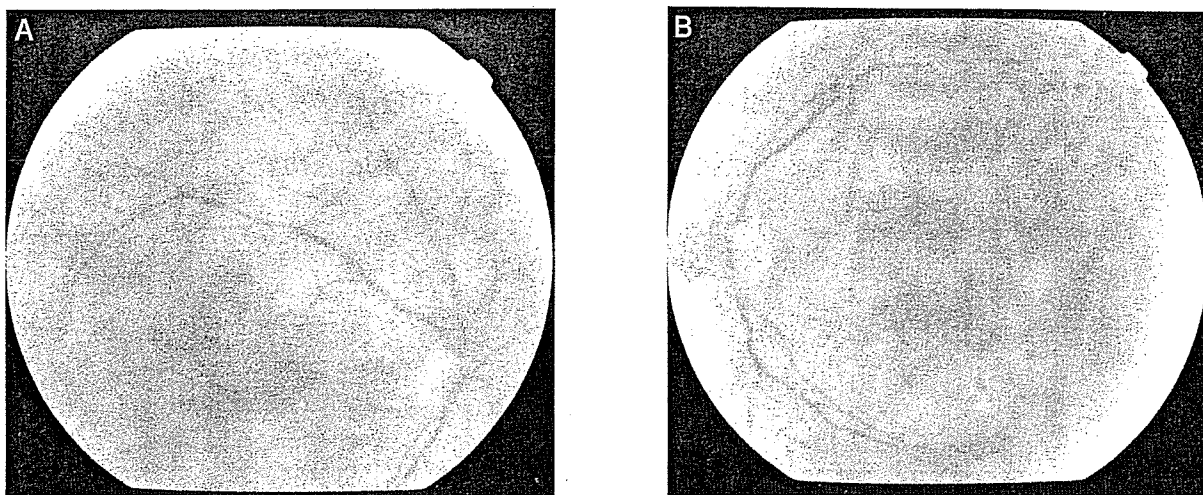


図1 初診時眼底写真

A：右眼，B：左眼。両眼とも対称に散在する円形の黄白色の脱色素斑を認める。

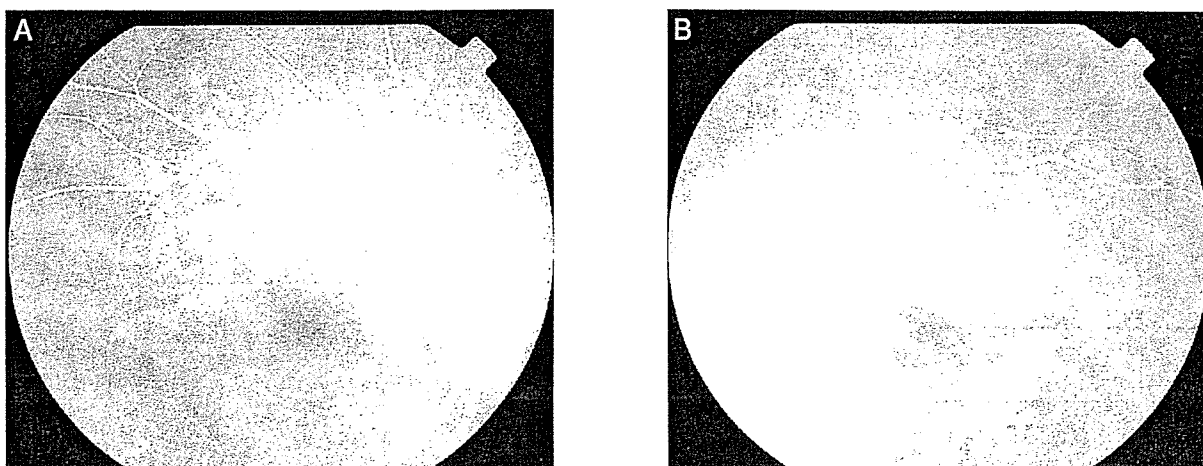


図2 2004年8月11日のフルオレセイン蛍光眼底写真（後期像）

A：右眼，B：左眼。視神経乳頭からの蛍光色素の漏出を認める。

左眼 16 mmHg。スリット検査にて前房内には炎症性変化を認めず，眼底検査にて両眼に対称的に黄白色の脱色素斑を認めた（図1）。

8月11日のフルオレセイン蛍光眼底検査（以下FA）で，後期像では視神経乳頭からの蛍光色素漏出を認めた（図2）。血液検査では本態性血小板血症のため血小板数が70万/ μ lと高値であったが，それ以外の血液検査では異常値はみられなかった。後極部に強い炎症性変化を認めたため，入院加療を勧めたが同意は得られなかった。6日後には，視力は右眼 0.1 (0.3 p) 左眼 0.4 p (0.6 p) まで低下し，両眼とも角膜後面沈着物を

認めた。中心フリッカー値は右眼 25～29 Hz，左眼 22～27 Hz と低下していた。入院のうへ，点滴にてプレドニン大量療法を開始した。FAにて視神経乳頭からの蛍光漏出は減少していたため（図3），一旦退院となり，プレドニン 30 mg から内服にて漸減療法を開始した（図4）。しかしながら，漸減療法中のFAにて左眼の視神経乳頭からの軽度の蛍光漏出を認めたため，両眼にトリアムシノロン 12 mg のテノン嚢下注射を行い蛍光漏出は消失した。

2006年1月20日，右眼 0.8 p，左眼 0.4 (0.7) と低下し，FAで視神経乳頭よりの蛍光色素の漏

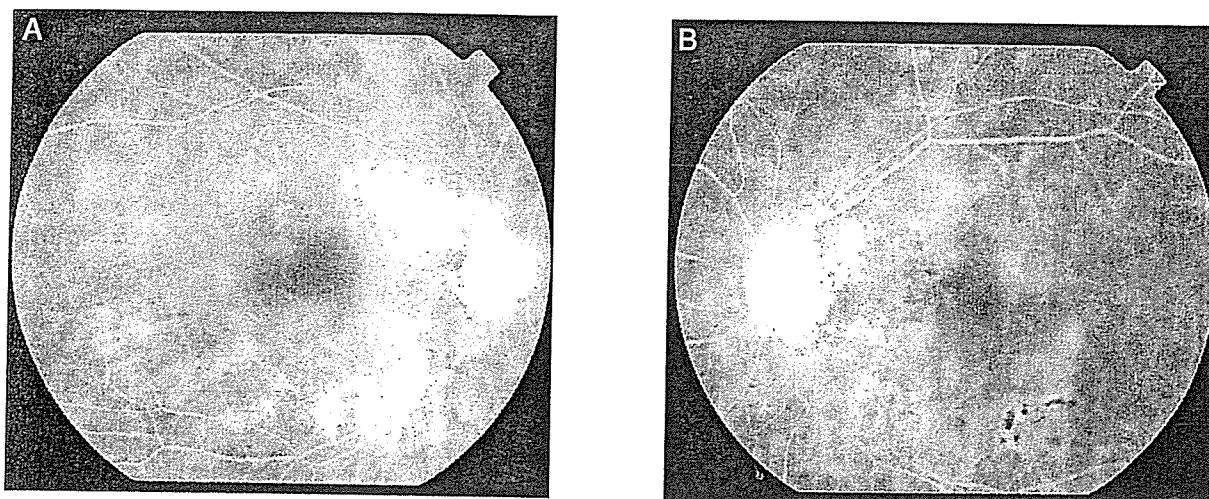


図3 2004年9月8日のフルオレセイン蛍光眼底写真（後期像）

A：右眼，B：左眼。視神経乳頭からの蛍光色素は軽減しているが，黄白色病巣に一致した斑状の過蛍光が認められた。

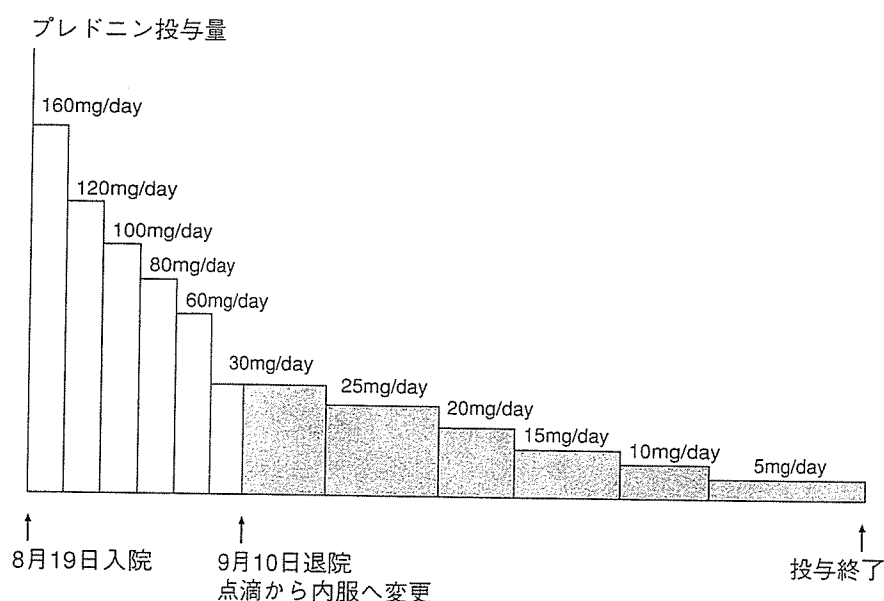


図4 経過中のプレドニン投与量

出がみられたので，2月1日に再度，両眼にトリアムシノロン 12 mg のテノン嚢下注射を行ったところ，3月6日には右眼 0.8(1.0 p)，左眼 0.2 p (0.8) に改善した。初診時の眼底所見と FA，その後の経過から BCR と診断した。原因検索のため，2006年3月17日に human herpesvirus (以下 HHV) の検査を行い，末梢血単核球中の HHV 1～8 の DNA を nested PCR で調べたがすべて検出されなかった。HLA のタイピングでは A29 は検出されなかった。4月18日の FA では視神経

乳頭よりの蛍光色素漏出は認めていないが，視神経乳頭周囲に組織染が認められた (図5)。

II. 考 案

本症例は，特徴的な眼底所見と FA 所見より BCR と診断し，ステロイド全身投与とトリアムシノロンのテノン嚢下注射により視機能回復が得られた1例であった。最初に報告した Ryan ら¹⁾は BCR の診断基準を以下のように述べてい

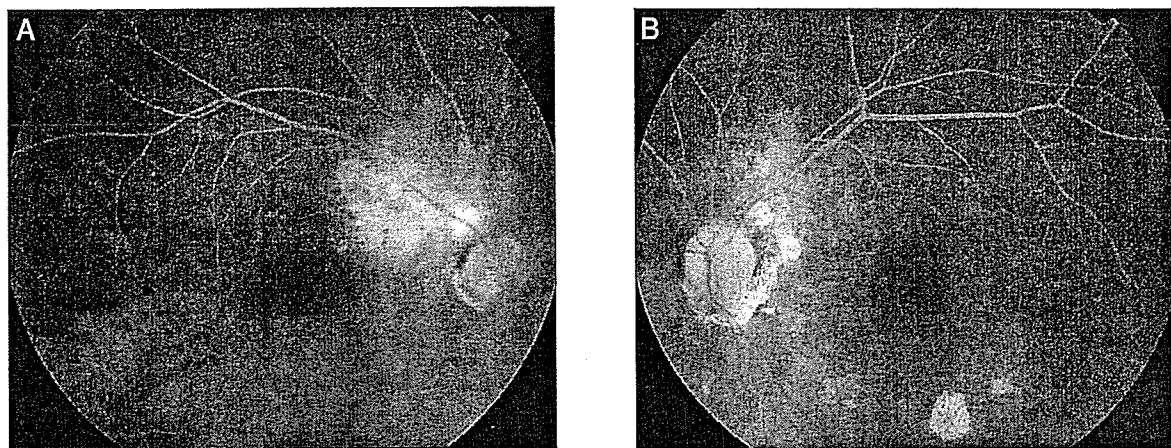


図5 2006年4月18日のフルオレセイン蛍光眼底写真
A：右眼，B：左眼。視神経乳頭からの蛍光色素漏出は認めない。

る。① 毛様充血は稀で無痛性。② 前眼部の炎症は軽度で、角膜後面と隅角の細胞は稀。③ 硝子体前部および後部の慢性炎症が存在するが、毛様体扁平部の snow bank や snow ball はない。④ FA で嚢胞様黄斑浮腫、乳頭浮腫の原因となる網膜血管からの蛍光色素漏出。⑤ 眼底に散在する散弾銃痕様の乳白色斑または脱色素斑を挙げている。Priem ら¹³⁾は両眼対称に白斑が出現すること、網膜血管炎、乳頭浮腫、硝子体細胞のいずれかひとつがあることを挙げている。そして、HLA-A29 との強い関連があるため、HLA タイピングが補助診断として有用であることが言われている。しかしながら、齋藤ら¹⁴⁾は、日本人における HLA-A29 が陰性であるので BCR の診断基準は臨床所見より診断するしかないと述べている。BCR と鑑別しなければならないのが眼サルコイドーシスである。眼サルコイドーシスに特徴的な 9 所見は、① 豚脂様角膜後面沈着物、② 虹彩結節、③ 隅角結節、④ 周辺虹彩前癒着、⑤ 塊状（雪玉状・数珠状）硝子体混濁、⑥ 網膜静脈周囲炎、⑦ 網脈絡膜滲出斑、⑧ 網脈絡膜萎縮病巣、⑨ 視神経肉芽腫である。飛鳥田ら¹⁵⁾は、現行の「眼サルコイドーシス診断の手引き」（1990年）の項目内容が、サルコイドーシス以外の疾患でもみられる所見を、特異性の高い所見と対等に扱っていることが問題点となっていることから、特異性の高いものになるように検討

し、9種の眼所見のサルコイドーシスにおける感度、特異性を検討した結果から改定案を提示した。改定案は前部ぶどう膜炎を肉芽腫性前部ぶどう膜炎に、塊状（雪玉状・数珠状）・微塵状混濁を塊状硝子体混濁に、網膜血管周囲炎（多くは静脈、ときに動脈）を網膜静脈周囲炎にすることを6所見とし、① 肉芽腫性前部ぶどう膜炎、② 隅角結節および周辺部虹彩前癒着、③ 塊状（雪玉状・数珠状）硝子体混濁、④ 網膜静脈周囲炎、⑤ 網脈絡膜滲出斑および網脈絡膜萎縮病巣、⑥ 視神経肉芽腫を定めた。この改定案は従来の診断の手引きよりも特異度が上昇した。しかし、上記項目のうち網脈絡膜滲出斑および網脈絡膜萎縮病巣のみが特異度35.8%と低値であったと報告している。本症例の初診時の眼底所見および経過中の眼底所見で、眼サルコイドーシスの改定案の項目に一致するのは⑤網脈絡膜滲出斑および網脈絡膜萎縮病巣である。この項目は特異度が低いことから、サルコイドーシスとほかのぶどう膜炎と明確に区分できないことを意味している。以上より、本症例は眼サルコイドーシスより BCR の診断項目に一致している項目が多いので BCR と診断した。

BCR の治療は、一般的にステロイドの全身投与が行われているが、ステロイド漸減中に再発する症例が多く、シクロスポリンなどの免疫抑制剤を併用する報告もみられる¹⁶⁾。本症例ではス

テロイド全身投与中は炎症の再燃はみられなかったが、その後、再燃がみられたため、トリアムシノロンのテノン嚢下注射により対応することで消炎させることが可能であった。BCRの黄斑浮腫に対して、トリアムシノロンテノン嚢下あるいは硝子体内注射が有効である報告もなされており、局所投与が有効であることが示唆されている¹⁷⁾。したがって、炎症の再燃を見た場合には、全身的に副作用の少ないトリアムシノロンのテノン嚢下注射を選択してもよいのではないかと考えられた。

BCRは非常に稀な疾患であるため、その発症機序は不明である。そこで、患者の同意を得て、ぶどう膜炎の原因ウイルスとして重要なヘルペス属ウイルスと本疾患との関連について nested PCR法を用いて検討した。HHVは、1から8までのサブタイプに分けられる。各サブタイプに関しては、HHV1は単純疱疹ウイルス1型、HHV2は単純疱疹ウイルス2型、HHV3は水痘・帯状疱疹ウイルス、HHV4はEpstein-Barrウイルス、HHV5はサイトメガロウイルスに相当し、最近、新たにHHV6~8が発見されている。そして、新たに同定されたHHV6,8と眼科疾患との関連を示唆する報告がみられている。Oberacher-Veltenら¹⁸⁾はHHV6が陽性であった bilateral optic neuropathy and unilateral tonic pupil を報告している。また、Matsuoら¹⁹⁾はぶどう膜炎患者76例に対しHHV8の検査を行ったところ、pars planitisの1例で陽性であったことを報告している。これらの報告より、HHVとさまざまなぶどう膜炎を含む眼疾患との関連はさらに広がりつつあり、さまざまな眼疾患の病態解明に重要であることが示唆されている。本症例ではすべてのサブタイプが検出されなかったが、今後、さらに検出率を上げるため、前房水をサンプルとし、nested PCR法を用いてBCRとHHVの関連を検討していく予定である。

謝辞

本症例のHHVの検索にあたり協力して下さった、実験補助の川上吉美氏に深謝いたします。

Abstract

The present case was 73 year-old female diagnosed as Birdshot chorioretinopathy (BCR). Fundus examination showed that cream-colored depigmented spots were scattered in the whole retina, especially densely distributed in the macular area. Fluorescein angiography (FA) revealed multiple light diffuse hyperfluorescence spots whose area was well corresponded to that of depigmented spots detected by fundus examination.

Combination therapy of the drip infusion of corticosteroid and sub-tenone injection of triamcinolone was possible to improve her visual acuity and vanish the fluorescein leakage from optic disc by FA, although a recurrence was once occurred.

To examine the relationship between the BCR and Human Herpesvirus (HHV) 1-8, nested polymerase chain reaction was performed using blood sample harvested from this case. However, all type of HHV was not detected.

文 献

- 1) Ryan SJ, Maumenee AE : Birdshot retinochoroidopathy. *Am J Ophthalmol* 89 : 31-45, 1980
- 2) Shah KH, Levinson RD, Yu F et al : Birdshot chorioretinopathy. *Surv Ophthalmol* 50 : 519-541, 2005
- 3) 川島みはる, 湯沢美都子, 松井端夫 : Birdshot chorioretinopathy の 2 症例. *臨眼* 38 : 771-776, 1984
- 4) 坂井依理子, 宇山昌延 : Birdshot retinochoroidopathy. *あたらしい眼科* 2 : 1495-1501, 1985
- 5) 小沢博子, 神園純一, 佐賀歌子ほか : Birdshot

- retinochoroidopathy の 1 例. 眼科 27 : 279-285, 1985
- 6) 小熊淑記, 大野重昭, 有賀浩子ほか : 散弾様網脈絡膜症の 1 例. 臨眼 40 : 380-381, 1986
- 7) 川久保洋, 湯沢美都子, 松井端夫 : Birdshot retinochoroidopathy の臨床像について. 眼紀 39 : 48-53, 1988
- 8) 船田雅之, 中西詳治, 奥間政昭ほか : Birdshot retinochoroidopathy と考えられた 1 例. 臨眼 42 : 568-569, 1988
- 9) 岡本珠美, 広瀬茂人, 市石 昭ほか : 散弾様網脈絡膜症の 2 症例. 臨眼 45 : 1513-1516, 1991
- 10) 新城光宏, 矢部敏行 : 陳旧性 birdshot chorioretinopathy. 臨眼 48 : 1875-1878, 1994
- 11) 肥土 毅, 高橋るりか, 岡本祥正ほか : Birdshot retinochoroidopathy が示唆された 1 例. 眼紀 47 : 112-116, 1996
- 12) 永田裕治, 黒岩さち子, 春日勇三ほか : Birdshot chorioretinopathy の 1 例. 眼紀 51 : 879-884, 2000
- 13) Priem HA, Kijlstra A, Neons L et al : HLA typing in birdshot chorioretinopathy. Am J Ophthalmol 105 : 182-185, 1988
- 14) 齋藤 航, 山本修一, 三田村佳典ほか : Birdshot chorioretinopathy—症例報告と本邦における文献的考察—. 日眼会誌 106 : 229-235, 2002
- 15) 飛鳥田有里, 石原麻美, 中村 聡ほか : 眼サルコイドーシス診断の手引きにおける眼所見項目の検討. 日眼会誌 110 : 391-397, 2006
- 16) Vitale AT, Rodriguez A, Foster CS : Low-dose cyclosporine therapy in the treatment of birdshot retinochoroidopathy. Ophthalmology 101 : 822-831, 1994
- 17) Martidis A, Duker JS, Puliafito CA : Intravitreal triamcinolone for refractory cystoid macular edema secondary to birdshot retinochoroidopathy. Arch Ophthalmol 119 : 1380-1383, 2001
- 18) Oberacher-Velten IM, Jonas JB, Junemann A et al : Bilateral optic neuropathy and unilateral tonic pupil associated with acute human herpesvirus 6 infection : a case report. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol 243 : 175-177, 2005
- 19) Matsuo T, Itami M : Seropositivity of human herpesvirus-8 in patients with uveitis. Ocul Immunol Inflamm 10 : 197-199, 2002

Multiple evanescent white dot syndrome の 1 例

上田 美子*・岡本 紀夫*・奥野 壽臣**・三村 治*

A case of multiple evanescent white dot syndrome

Yoshiko UEDA*, Norio OKAMOTO*, Toshiomi OKUNO** and Osamu MIMURA*

I 緒 言

1984年, Jampol¹⁾が, 若年者において主に片眼性の眼底網膜深層に多数の白斑を有し, 一過性の視力低下を認めた11症例を multiple evanescent white dot syndrome (以下: MEWDS) と名付け報告した。

我が国でも多数の症例報告がなされ, 原因はなんらかの弱いウイルス感染により発生した網膜色素上皮の急性炎症と推定されているものの, 確定までには至っていない^{2)~7)}。そこで我々は, Human herpesvirus (以下: HHV) 1~8の検索を行い検索結果が陰性であった症例と, 過去の文献的考察を含めて報告する。

II 症 例

47歳, 女性。

初診: 平成18年1月19日。

主訴: 右眼飛蚊症。

現病歴: 平成18年1月11日頃より, 右眼にチカチカした影が見えることを自覚するも放置。軽快がみられないため1週間後, 近医を受診し, 右眼底の網膜深層に白点状の混濁を認めたため翌日当科紹介受診となる。

家族歴・既往歴: 特記すべきことなし。

初診時所見: 視力は右眼0.1(1.0×-3.00D), 左眼0.1(1.5×-3.00D)。前眼部, 中間透光体には炎症反応は認められず, 眼圧は両眼とも19 mmHg。中心フリッカー値は右眼38 Hz, 左眼39 Hz。ERGでは左右差は認められず, 視野も両眼ともに異常は認められなかった。右眼底では視神経乳頭の色調は正常, 境界は鮮明であったが網膜後極部耳側より周辺にかけて白斑が多発しており, その白斑は網膜深層に位置し境界不鮮明であった(図1)。

蛍光眼底造影所見: フルオレセイン蛍光眼底(以下: FA)では, 右眼において色素流入に異常なく, 造影の比較的早期から白斑に一致した過蛍光斑を認めた。イン

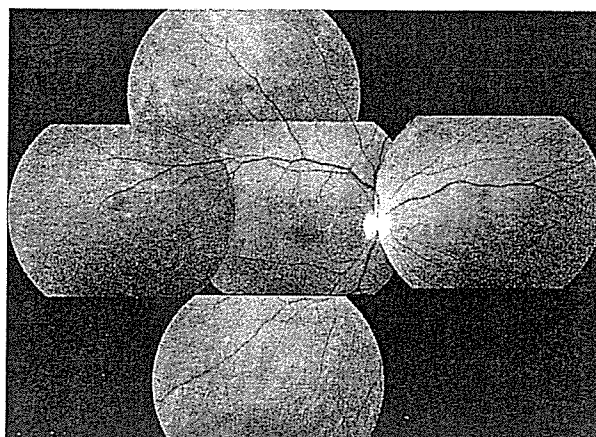


図1 初診時右眼底

網膜後極部耳側より周辺にかけて境界不鮮明な白斑が多発している。

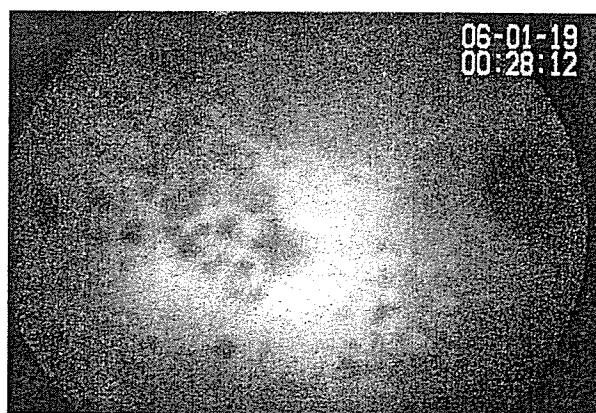


図2 初診時右眼インドシアニングリーン蛍光眼底造影像

後期像において眼底に認められた白斑以外にも低蛍光斑を広範囲に多数認めた。

ドシアニングリーン蛍光眼底(以下: IA)では, 初期像には異常所見を認めなかったが, 後期像では眼底に認められた白斑以外にも低蛍光斑を広範囲に多数認めた(図2)。以上の所見より MEWDS と診断した。全身所見で

* 兵庫医科大学眼科学教室 〒663-8501 西宮市武庫川町 1-1

** 兵庫医科大学病原微生物学教室

* Department of Ophthalmology, Hyogo College of Medicine

** Department of Microbiology, Hyogo College of Medicine

は血液検査において特記すべき所見なく、また、末梢血単核球中の HHV1~8 の DNA を nested PCR で調べたがすべて検出されなかった。

経過：特に治療はせずに経過観察とした。1週間後、自覚症状も軽快し、検眼鏡的にも白斑はほぼ消失した。

III 考 按

Jampol ら¹⁾は、次のような臨床症状を有する症例を MEWDS として報告した。①若年発症で、女性に多く、ほとんどが片眼の視力障害である。②前駆症状として感冒様症状がみられることがある。③硝子体中に細胞浮遊を認めることが多い。④眼底所見では、後極部から赤道にかけて、細胞深層レベルに小斑点が多発する。黄斑部の顆粒状変化や内境界膜の不整反射を認めることもある。視神経乳頭の発赤が見られることもある。⑤ FA では、白斑に一致した早期過蛍光と後期での同部組織染が見られる。ときに乳頭過蛍光が認められる。⑥1~16週で自然治癒する。その後、マリオット盲点の拡大が認められることが報告された³⁾。

Jampol ら⁸⁾は MEWDS に網脈絡膜萎縮癥痕巣を伴う場合、multifocus choroiditis and panuveitis あるいは punctate inner choroidopathy との鑑別が難しいが、MEWDS は臨床所見が速やかに改善することが特徴であると述べている。

当初 MEWDS は検眼鏡所見、FA 所見から網膜色素上皮細胞から視細胞に至る部分の病変と考えられていたが、IA により脈絡膜の病変が指摘されるようになった⁹⁾。さらに検眼鏡所見、FA 所見で病変がはっきりしない部位でも、IA の後期像では低蛍光斑が出現したと報告している⁴⁾⁶⁾⁹⁾。

過去の報告において MEWDS の病因にはなんらかのウイルス・細菌などの感染の関与が推察されているが、病原体の特定には至っていない⁴⁾。そこで我々は、眼科領域において種々の疾患を引き起こすヘルペス属ウイルスの関与の可能性を調べることにした。HHV1 は単純ヘルペス 1 型、HHV2 は単純ヘルペス 2 型、HHV3 は水痘・帯状疱疹ヘルペス、HHV4 は Epstein-Barr ウイルス、HHV5 はサイトメガロウイルスである。これらのウイルスが引き起こす病変は従来から知られているが、最近新たに HHV6~8 が発見され、眼科領域でも HHV6 と 8 が陽性であった報告がある。Oberacher-Velten ら¹⁰⁾は HHV6 が陽性であった片側性の瞳孔緊張を伴った両側性の視神経症を報告している。Matsuo ら¹¹⁾はぶどう膜炎患者 76 例に対し HHV8 の検査を行ったところ、pars planitis の 1 例で陽性を認めたと報告している。しかし、これまで MEWDS において HHV の関与を調べた報告は見られない。そこで我々は今回初め

て HHV に着目し検査を行ったが、すべて陰性であった。今後さらなる検討が必要であると思われる。

IV 要 約

MEWDS の 1 例を経験した。この疾患はなんらかのウイルス・細菌の感染が疑われており、今回、血液中の HHV1 から 8 の DNA の検出を試みたがすべて陰性であった。

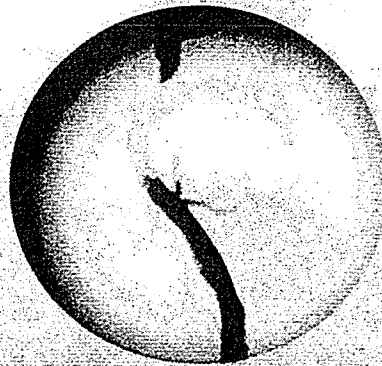
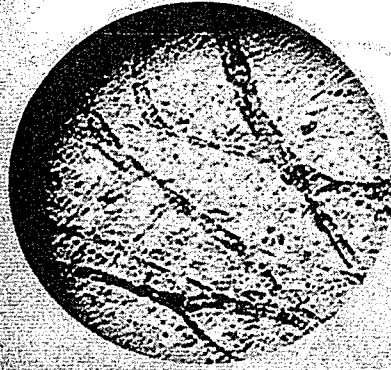
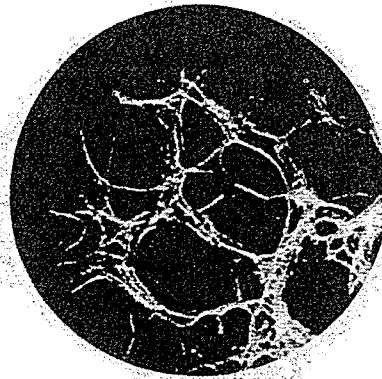
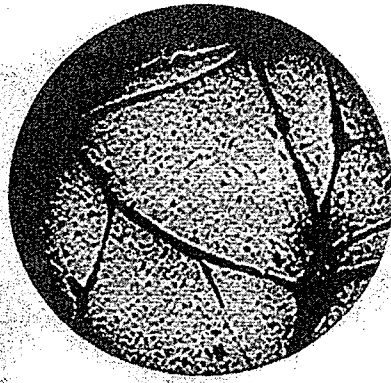
謝辞

本症例の HHV の検索にあたり協力して頂いた、実験助手の川上吉美氏に深謝いたします。

キーワード：多発一過性白点症候群 (MEWDS), human herpesvirus

文 献

- 1) Jampol LM, Sieving PA, Pugh D, Fishman GA, Gilbert H: Multiple evanescent white-dot syndrome I. Clinical findings. *Arch Ophthalmol* 102: 671-674, 1984.
- 2) 清原 尚, 渡利浩水, 森 茂: 多発性消失性網膜白点症候群 (multiple evanescent white dot syndrome) が疑われた 1 例: 眼科 31: 193-199, 1989.
- 3) 立岩 尚, 太田浩一, 吉村長久: インドシアニングリーン蛍光眼底造影を施行した multiple evanescent white dot syndrome. *眼紀* 49: 162-167, 1998.
- 4) Ikeda N, Ikeda T, Nagata M, Mimura O: Location of lesions in multiple evanescent white dot syndrome and the cause of the hypofluorescent spots observed by indocyanine green angiography. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 239: 242-247, 2001.
- 5) 十亀隆弘, 渡辺恵美子, 小林義治: 多発性一過性白点症候群. *眼臨* 97: 342-345, 2003.
- 6) 田野良太郎, 池田尚弘, 池田誠宏, 永田美枝子, 別所建一郎, 三村 治: 黄斑に脱色素病巣を生じた multiple evanescent white dot syndrome. *眼臨* 97: 844-847, 2003.
- 7) 山崎広子, 柴 玉珠: 9 年後に再発を認めた multiple evanescent white-dot syndrome (MEWDS) の 1 例. *眼紀* 56: 945-948, 2005.
- 8) Jampol LM, Becker KG: White spot syndrome of the retina: A hypothesis based on the common genetic hypothesis of autoimmune/inflammatory disease. *Am J Ophthalmol* 135: 376-377, 2003.
- 9) Obana A, Kusumi M, Miki T: Indocyanine green angiographic aspects of multiple evanescent white dot syndrome. *Retina* 16: 97-104, 1996.
- 10) Oberacher-Velten IM, Jonas JB, Junemann A, Schmidt B: Bilateral optic neuropathy and unilateral tonic pupil associated with acute human herpesvirus 6 infection: a case report. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 243: 175-177, 2005.
- 11) Matsuo T, Itami M: Seropositivity of human herpesvirus-8 in patients with uveitis. *Ocul Immunol Inflamm* 10: 197-199, 2002.



Editors
Carolyn A Staton
Claire Lewis
Roy Bicknell

Angiogenesis Assays

 WILEY

は血液検査において特記すべき所見なく、また、末梢血単核球中の HHV1~8 の DNA を nested PCR で調べたがすべて検出されなかった。

経過：特に治療はせずに経過観察とした。1週間後、自覚症状も軽快し、検眼鏡的にも白斑はほぼ消失した。

III 考 按

Jampol ら¹⁾は、次のような臨床症状を有する症例を MEWDS として報告した。①若年発症で、女性に多く、ほとんどが片眼の視力障害である。②前駆症状として感冒様症状がみられることがある。③硝子体中に細胞浮遊を認めることが多い。④眼底所見では、後極部から赤道にかけて、細胞深層レベルに小斑点が多発する。黄斑部の顆粒状変化や内境界膜の不整反射を認めることもある。視神経乳頭の発赤が見られることもある。⑤ FA では、白斑に一致した早期過蛍光と後期での同部組織染が見られる。ときに乳頭過蛍光が認められる。⑥1~16週で自然治癒する。その後、マリオット盲点の拡大が認められることが報告された²⁾。

Jampol ら³⁾は MEWDS に網脈絡膜萎縮瘢痕巣を伴う場合、multifocus choroiditis and panuveitis あるいは punctate inner choroidopathy との鑑別が難しいが、MEWDS は臨床所見が速やかに改善することが特徴であると述べている。

当初 MEWDS は検眼鏡所見、FA 所見から網膜色素上皮細胞から視細胞に至る部分の病変と考えられていたが、IA により脈絡膜の病変が指摘されようになった⁴⁾。さらに検眼鏡所見、FA 所見で病変がはっきりしない部位でも、IA の後期像では低蛍光斑が出現したと報告している⁴⁾⁶⁾⁹⁾。

過去の報告において MEWDS の病因にはなんらかのウイルス・細菌などの感染の関与が推察されているが、病原体の特定には至っていない⁴⁾。そこで我々は、眼科領域において種々の疾患を引き起こすヘルペス属ウイルスの関与の可能性を調べることにした。HHV1 は単純ヘルペス 1 型、HHV2 は単純ヘルペス 2 型、HHV3 は水痘・帯状疱疹ヘルペス、HHV4 は Epstein-Barr ウィルス、HHV5 はサイトメガロウィルスである。これらのウイルスが引き起こす病変は従来から知られているが、最近新たに HHV6~8 が発見され、眼科領域でも HHV6 と 8 が陽性であった報告がある。Oberacher-Velten ら¹⁰⁾は HHV6 が陽性であった片側性の瞳孔緊張を伴った両側性の視神経症を報告している。Matsuo ら¹¹⁾はぶどう膜炎患者 76 例に対し HHV8 の検査を行ったところ、pars planitis の 1 例で陽性を認めたと報告している。しかし、これまで MEWDS において HHV の関与を調べた報告は見られない。そこで我々は今回初め

て HHV に着目し検査を行ったが、すべて陰性であった。今後さらなる検討が必要であると思われる。

IV 要 約

MEWDS の 1 例を経験した。この疾患はなんらかのウイルス・細菌の感染が疑われており、今回、血液中の HHV1 から 8 の DNA の検出を試みたがすべて陰性であった。

謝辞

本症例の HHV の検索にあたり協力して頂いた、実験助手の川上吉美氏に深謝いたします。

キーワード：多発一過性白点症候群 (MEWDS), human herpesvirus

文 献

- 1) Jampol LM, Sieving PA, Pugh D, Fishman GA, Gilbert H: Multiple evanescent white-dot syndrome I. Clinical findings. *Arch Ophthalmol* 102: 671—674, 1984.
- 2) 清原 尚, 渡利浩水, 森 茂: 多発性消失性網膜白点症候群 (multiple evanescent white dot syndrome) が疑われた 1 例: 眼科 31: 193—199, 1989.
- 3) 立岩 尚, 太田浩一, 吉村長久: インドシアニングリーン蛍光眼底造影を施行した multiple evanescent white dot syndrome. *眼紀* 49: 162—167, 1998.
- 4) Ikeda N, Ikeda T, Nagata M, Mimura O: Location of lesions in multiple evanescent white dot syndrome and the cause of the hypofluorescent spots observed by indocyanine green angiography. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 239: 242—247, 2001.
- 5) 十亀隆弘, 渡辺恵美子, 小林義治: 多発性一過性白点症候群. *眼臨* 97: 342—345, 2003.
- 6) 田野良太郎, 池田尚弘, 池田誠宏, 永田美枝子, 別所建一郎, 三村 治: 黄斑に脱色素病巣を生じた multiple evanescent white dot syndrome. *眼臨* 97: 844—847, 2003.
- 7) 山崎広子, 柴 玉珠: 9 年後に再発を認めた multiple evanescent white-dot syndrome (MEWDS) の 1 例. *眼紀* 56: 945—948, 2005.
- 8) Jampol LM, Becker KG: White spot syndrome of the retina: A hypothesis based on the common genetic hypothesis of autoimmune/inflammatory disease. *Am J Ophthalmol* 135: 376—377, 2003.
- 9) Obana A, Kusumi M, Miki T: Indocyanine green angiographic aspects of multiple evanescent white dot syndrome. *Retina* 16: 97—104, 1996.
- 10) Oberacher-Velten IM, Jonas JB, Junemann A, Schmidt B: Bilateral optic neuropathy and unilateral tonic pupil associated with acute human herpesvirus 6 infection: a case report. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 243: 175—177, 2005.
- 11) Matsuo T, Itami M: Seropositivity of human herpesvirus-8 in patients with uveitis. *Ocul Immunol Inflamm* 10: 197—199, 2002.

12

Dorsal air sac model

Sei Yonezawa, Tomohiro Asai and Naoto Oku

Abstract

The dorsal air sac (DAS) model is regarded as an *in vivo* model of angiogenesis, and is especially useful for studying early phases of tumour-induced angiogenesis. This method characteristically uses tumour cell-secreted angiogenic factors for the induction of angiogenesis. For making a DAS, tumour cells are loaded into a chamber ring covered with 0.45 μm pore filters, and the ring is implanted into the dorsal interspace of mouse, which is formed by an air injection under the hind skin of the animal. In this model, angiogenic factors released from tumour cells pass through the filters, and induce angiogenesis on the skin attached to the ring. In this chapter, we present several examples for evaluating anti-angiogenic therapy by using the DAS model. Finally, we describe a unique usage of the DAS model for obtaining an angiogenic specific peptide which was used for neovessel-targeting probe in a drug delivery system.

Keywords

dorsal air sac; DAS; photodynamic therapy; PDT; anti-angiogenic therapy; anti-neovascular therapy; phage displayed random peptide library; drug delivery system; DDS

12.1 Introduction

Angiogenesis is an indispensable event in tumour progression. Moreover, the newly developed vessels play an important role in blood-borne tumour metastasis. Therefore, Shimizu and Oku (2004) introduced the notion that a number of anti-angiogenic therapies have been developed for the treatment of cancer. *In vivo* assay systems for angiogenesis have also been developed including chick chorioallantoic membrane (CAM) assay, corneal angiogenesis assay and chamber assays as

detailed in other chapters of this book. Oikawa *et al.* (1997) first reported that the DAS model is one of the most easily prepared without requiring adept techniques as the simple implantation of a chamber ring loaded with tumour cells causes angiogenic vessel formation on the murine skin attached to the ring. Therefore, this method has been widely used for studying the mechanisms of tumour-inducing angiogenesis and for evaluating the characteristics of various anti-angiogenic agents. In this chapter we detail how the DAS model is prepared and used by showing several experimental examples including anti-angiogenic photodynamic therapy (PDT) and angiogenesis suppression by tea polyphenol.

12.2 Preparation of the DAS model

The scheme of preparing DAS model is shown in Figure 12.1. The chamber ring is composed of a plastic 1 cm diameter ring (Millipore) and nitrocellulose membrane filters (0.45 μm pore size, Millipore), which are secured on both sides of the ring by using CEMENT (Millipore), and the chamber is then sterilized by gamma irradiation or ethylene oxide. Then, cultured tumour cells are diluted with saline or cell culture medium (1×10^7 cells/0.15 ml), and loaded into the chamber ring through a hole in the side (see Figure 12.1), which is then sealed using the supplied plastic bar (Millipore). For the negative control, a chamber ring loaded with saline or medium is also prepared, by soaking an empty sealed ring in saline before implantation.

Mice are first anaesthetized by intraperitoneal injection of nembutal (Dainippon Pharmaceutical Co., Ltd. Japan), for example. Then the dorsal skin is lifted by the tips of thumb and fingers, pricked with a needle subcutaneously, and air (about 8 ml) is pumped into the back. After cutting the skin of the back enough to insert the chamber ring, it is implanted into the interspace. The cut area is then sutured.

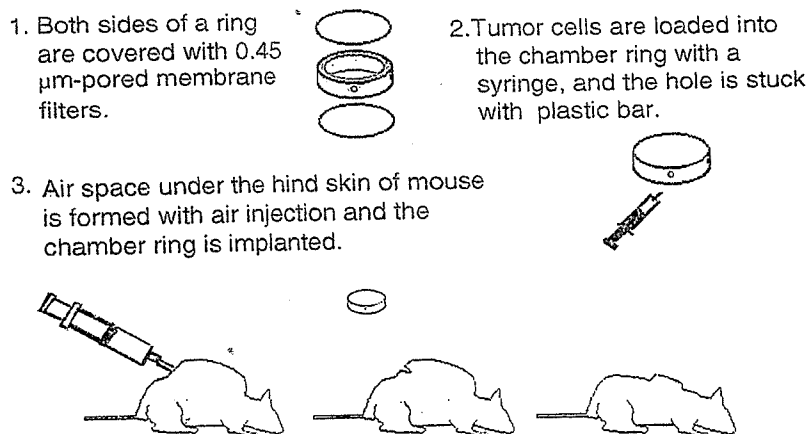


Figure 12.1 Preparation of DAS model.

Because of the transplant surgery under general anaesthesia, heat retention is recommended until mice recover from anaesthesia.

Tumour-induced angiogenesis on the skin attached to the chamber ring is obvious by day 4 or 5 after implantation. To observe the neovessels, the mouse is sacrificed under anaesthesia, and a portion of the skin including the chamber ring is cut off and the chamber ring carefully detached from the skin. Since the chamber ring is attached firmly to the back skin, and the newly produced blood vessels are fragile, partial bleeding is often observed on the skin.

12.3 Evaluation of anti-angiogenic photodynamic therapy using a DAS model

This section details an example where the DAS model has been used. PDT is a potential cancer treatment method that uses a combination of photosensitizer and tissue-penetrating laser light. Dolmans *et al.* (2003), Peng *et al.* (2001) and Reuther *et al.* (2001) conclude that when cancer patients, or experimental animals, are treated with photosensitizers and laser light with an appropriate wavelength at the tumour site, it results in the topical production of activated oxygen which effects tumour destruction. Kurohane *et al.* (2001) previously observed that laser irradiation at 15 min post-injection of photosensitizer (15-min PDT), strongly suppressed tumour growth due to haemostasis, compared with conventional scheduling of PDT (laser irradiation at 3 h post-injection, 3-h PDT). Ichikawa *et al.* (2004) examined the effect of 15-min PDT on angiogenic vessels in comparison with that of 3-h PDT in mice using the DAS model. In this experiment angiogenic vessels formed in the DAS model were irradiated with laser at 15 min or 3 h post-injection of Visudyne[®], a photosensitizing drug that is used clinically for the treatment of age-related macular degeneration (liposomal drug of benzo-porphyrin derivative monoacid ring A, BPD-MA).

In this study, a chamber ring loaded with Meth A sarcoma cells was implanted dorsally into 5-week-old BALB/c male mice (Japan SLC Inc., Shizuoka, Japan). PDT treatment was performed on day 4 after ring implantation. Fifteen min or 3 h after intravenous administration of Visudyne[®], skins on the chamber rings were irradiated with a laser light (wave length; 689 nm). At 24 h after PDT treatment, the mice were sacrificed and the skin attached to the chamber ring was examined in the same manner as Takeuchi *et al.* (2002), Asai *et al.* (2002) and Oku *et al.* (2002).

Figures 12.2a and 12.2b show the typical images of the skin attached to the chamber ring preloaded with saline or tumour cells, respectively. In saline rings only pre-existing blood vessels are seen (Figure 12.2a), while many angiogenic vessels, as well as pre-existing blood vessels, are observed in rings pre-loaded with tumour cells (Figure 12.2b). Some of these angiogenic vessels were haemolysed since they were fragile. After 15-min PDT treatment, the haemorrhagic