

PCR 条件

95°C	9min	
95°C	1min	
60°C	30sec	
72°C	1min 30sec	35cycle
72°C	7min	

④制限酵素反応 (計 20μl 37°C 2時間)

PCR 産物	15.0 μl
DW	3.0 μl
NE buffer	2.0 μl
Dde I	0.2 μl

Dde I にて C allele は 155bp+98bp=253bp
A allele は 253bp となる。

2) C⁻⁵²¹→T 変異 (5' promotor region)

①PCR プライマー

(AT1C521Tf)

CGT GAT GTC TTT ATC TGG TTT TG

(AT1C521Tr)

CGA ACT TTG GTA ATA CAG TTG TGG

②対象

正常対照 : 140 例、NTG : 152 例、POAG : 108 例

③PCR 法 (計 15 μl)

DNA (50ng/ μl)	1.0 μl
DW	8.5 μl
PCR buffer	1.5 μl
dNTP	1.5 μl
MgCl ₂	1.8 μl
Primer (AT1C521Tf)	0.3 μl
Primer (AT1C521Tr)	0.3 μl
AmpliTaQ Gold polymerase	0.1 μl

PCR 条件

95°C	9min	
95°C	1min	
60°C	30sec	
72°C	1min 30sec	35cycle
72°C	7min	

④制限酵素反応 (計 20μl 37°C 2時間)

PCR 産物	15.0 μl
DW	3.0 μl
NE buffer	2.0 μl
Ssp I	0.3 μl

Ssp I にて C allele は 270bp、

T allele は 144bp+123bp=270bp

となる。

遺伝子解析に関しては倫理委員会の承認を得た。緑内障患者からの血液検体は、本研究の目的、研究対象者に対する人権保護上の配慮、研究方法による研究対象者に対する不利益、危険性の排除を説明し、理解を求めた。その後、患者の同意を得て同意書にサインした後血液を採取し、DNA を抽出した。

検体提供施設

遺伝子解析症例数

施設	正常対照	開放隅角緑内障	正常眼圧緑内障	合計
慶應義塾大学	132	44	117	293
出田眼科	9	31	22	62
順天堂大学	0	14	24	38
浜松医科大学	0	7	9	16
熊本大学	0	6	2	8
合計	141	102	174	417人

C. 研究結果

1) A1166C

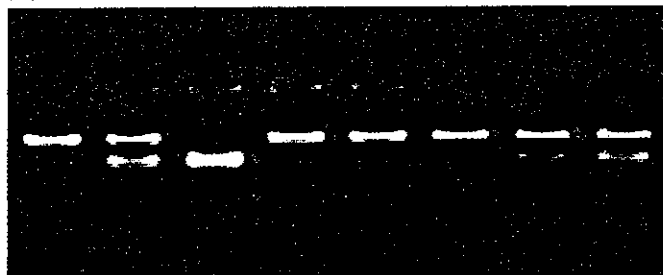
図 2 に制限酵素 Dde I によるアッセイの PCR-RFLP 法 (A1166C 変異) の結果を示す。C allele は 155bp と 98bp に切断され、A allele は 253bp のままである。3 本見えているのはヘテロ変異を示す。Case-control study の結果を表 1 に示す。

図 3 に制限酵素 Ssp I によるアッセイの PCR-RFLP 法 (C⁻⁵²¹→T 変異) の結果を示す。C allele は 270bp のままで、T allele は 144bp と 123bp に切断されているが 2 本が一緒になっている。2 本見えているのは (実際には 3

本) ヘテロ変異を示す。Case-control study の結果を表 2 に示す。

- 2. 実用新案登録 なし
- 3. その他 なし

図 3



D. 考察

AT1 は毛様体の無色素上皮の表面 (luminal side) に染色される。房水産制の 25% は限外濾過、75% は能動輸送によるが、AT1 拮抗薬の投与により眼圧は下降するので、AT1 は房水産生または分泌に関与していることが考えられる。

今回、3' untranslated region の A1166C 多型と緑内障発症との関連はなかった。A1166C 多型は、日本人高血圧患者との関連はなかったが、高コレステロール血症患者における高血圧患者の危険因子と報告されている (Clinical Chinica Acta 2001)。-535 C/ T 多型と高血圧では、日本人では相関があると報告されているが、欧米人では相関がない。

一方、-521 C/ T 多型では、POAG 患者において TT を持つ患者が多かった。従って、毛様体におけるレニン・アンジオテンシン系は緑内障発症に何らかの関与が考えられた。今後は更に症例を増やし、大規模スタディを行う。

E. 結論

レニン・アンジオテンシン系のアンジオテンシン II 受容体 (AT1) のプロモーター多型である -521 C/ T は POAG 発症との関連が示唆された。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

- 1. 特許取得 なし

表1 A1166C 変異における Case-control study

	Genotype Frequency			Genotype Frequency			Genotype Frequency			Allele Frequency		
	AA (%)	AC (%)	CC (%)	AA (%)	AC+CC (%)	<i>p</i>	AA+AC (%)	CC (%)	<i>p</i>	A (%)	C (%)	<i>p</i>
正常対照 (N=132)	106 (80.3)	24 (18.2)	2 (1.5)	106 (80.3)	26 (19.7)		130 (98.5)	2 (1.5)		236 (89.4)	28 (10.6)	
POAG (N=88)	75 (85.2)	13 (14.8)	0 (0)	75 (85.2)	13 (14.8)	0.226	88 (100)	0 (0)	0.359	163 (92.6)	13 (7.4)	0.166
NTG (N=142)	119 (83.8)	22 (15.5)	1 (0.7)	119 (83.8)	23 (16.2)	0.275	141 (99.3)	1 (0.7)	0.473	260 (91.5)	24 (8.5)	0.237

Fisher's exact probability

表2 C⁻⁵²¹→T 変異における Case-control study

	Genotype Frequency			Genotype Frequency			Genotype Frequency			Allele Frequency		
	CC (%)	CT (%)	TT (%)	CC (%)	CT+TT (%)	<i>p</i>	CC+CT (%)	TT (%)	<i>p</i>	C (%)	T (%)	<i>p</i>
正常対照 (N=140)	97 (69.3)	40 (28.6)	3 (2.1)	97 (69.3)	43 (30.7)		137 (97.9)	3 (2.1)		234 (83.6)	46 (16.4)	
POAG (N=108)	75 (69.4)	25 (23.1)	8 (7.4)	75 (69.4)	33 (30.6)	0.545	100 (92.6)	8 (7.4)	0.046	175 (81.0)	41 (19.0)	0.805
NTG (N=152)	101 (66.4)	47 (30.9)	4 (2.6)	101 (66.4)	51 (33.6)	0.347	148 (97.4)	4 (2.6)	0.545	249 (81.9)	55 (18.1)	0.337

Fisher's exact probability

厚生労働科学研究費補助金（感覚器障害研究事業）
分担研究報告書

日本人開放隅角緑内障患者における緑内障感受性遺伝子の検索
— 血管内皮型一酸化窒素合成酵素 eNOS の多型 (NOS3: chromosome 7q35-36) —

主任研究者 真島 行彦 慶應義塾大学医学部 助教授
分担研究者 谷原 秀信 熊本大学医学部眼科 教授
堀田 喜裕 浜松医科大学眼科 教授
研究協力者 橋爪 公平 慶應義塾大学医学部

研究要旨：日本人において冠攣縮と eNOS 遺伝子変異 Glu298Asp および T⁻⁷⁸⁶→C は有意に関連していることが報告されているので、開放隅角緑内障患者 (POAG および NTG) との関連を Case-control study により検討した。Glu298Asp 変異は、PCR-RFLP 法にて解析した。対象は、正常対照 141 例、NTG146 例、POAG103 例である。その結果、Glu298Asp 変異に関しては genotype frequency、allele frequency とともに正常対照と POAG 患者 および NTG 患者とで関連はなかった。

A. 研究目的

緑内障は多因子（多遺伝子）疾患であり、その発症には加齢、環境因子、遺伝的素因等いろいろな因子が関与している。現在、緑内障発症の危険因子として、高眼圧、加齢、人種、家族歴、近視、糖尿病、心血管障害（偏頭痛、血管攣縮等）が考えられている。攣縮血管に一酸化窒素 (NO) 分泌低下が明らかにされ、NO による血管トーン調整という観点から緑内障の血流障害に重要と考えられる。また冠攣縮の発生頻度は日本人の方が白人に比べ高い。その後、日本人において冠攣縮と血管内皮型一酸化窒素合成酵素 (eNOS, endothelial nitric oxide synthase) 遺伝子変異 Glu298Asp (Yoshimura *et al.* Hum Genet 1998;103:65) および T⁻⁷⁸⁶→C (Nakamura *et al.* Circulation 1999;99:2864) は有意に関連していることが明らかになった。今回は eNOS (NOS3) の 2 つの変異と緑内障との関連を、Case-control study により検討した。

B. 研究方法

Glu298Asp (G894T) 多型

① PCR プライマー

(E298D1)

5'- AAG GCA GGA GAC AGT GGA TGG A -3'

(E298D2)

5'- CCC AGT CAA TCC CTT TGG TGC TCA -3'

② 対象

正常対照：141 例、NTG：146 例、POAG：103

例

③ PCR 法 (計 15 μ l)

DNA (50ng/ μ l)	1.0 μ l
DW	8.5 μ l
PCR buffer	1.5 μ l
dNTP	1.5 μ l
MgCl ₂	1.8 μ l
Primer (E298D1)	0.3 μ l
Primer (E298D2)	0.3 μ l
AmpliTaq Gold polymerase	0.1 μ l

PCR 条件

95°C	9min	
95°C	1min	
63°C	30sec	
72°C	2min	35cycle
72°C	7min	

④ 制限酵素反応 (計 20 μ l 37°C 2 時間)

PCR 産物	15.0 μ l
DW	3.0 μ l
H buffer	2.0 μ l
制限酵素 Ban II	0.2 μ l

Ban II にて G allele は 163bp+85bp=248bp、
T allele は 248bp とする。

遺伝子解析に関しては倫理委員会の承認を得た。緑内障患者からの血液検体は、本研究の目的、研究対象者に対する人権保護上の配慮、

表 1

	Genotype Frequency			Genotype Frequency		p	Genotype Frequency		p	Allele Frequency		
	GG(Glu/Glu) (%)	GT(Glu/Asp) (%)	TT(Asp/Asp) (%)	GG (%)	GT+TT (%)		GG+GT (%)	TT (%)		G (%)	T (%)	p
正常対照 (N=141)	116 (82.3)	24 (17.0)	1 (0.7)	116 (82.3)	25 (17.7)		140 (99.3)	1 (0.7)		256 (90.8)	26 (9.2)	
POAG (N=103)	89 (86.4)	13 (12.6)	1 (1.0)	89 (86.4)	14 (13.6)	0.225	102 (99.0)	1 (1.0)	0.667	191 (92.7)	15 (7.3)	0.277
NTG (N=146)	119 (81.5)	25 (17.1)	2 (1.4)	119 (81.5)	27 (18.5)	0.495	144 (98.6)	2 (1.4)	0.513	263 (90.1)	29 (9.9)	0.442

Fisher's exact probability

研究方法による研究対象者に対する不利益、危険性の排除を説明し、理解を求めた。その後、患者の同意を得て同意書にサインした後血液を採取し、DNA を抽出した。

C. 研究結果

Glu298Asp (G894T) 多型

図 1 に制限酵素 Ban II によるアッセイの PCR-RFLP 法の結果を示す。G allele は 163bp と 85bp に切断され、T allele は 248bp のままである。3 本見えているのはヘテロ変異を示す。Case-control study の結果を表 1 に示す。

D. 考察

Glu298Asp 変異に関しては、野生型蛋白よりも変異型蛋白の方が細胞内で不安定で分解されやすい性質を持つと報告されている (Tesauro M, et al. Proc Natl Acad Sci USA 2000;97:2832)。また、T⁻⁷⁸⁶→C 変異型は野生型に比べ有意に転写活性が低下していることが報告されている (Nakamura M et al. Circulation 1999;99:2864)。この変異は喫煙よりも強い冠攣縮の危険因子である。高血圧では、T⁻⁷⁸⁶→C 変異は関連せず、Glu298Asp 変異と関連することが報告されている。心筋梗塞とは両者とも関連が報告されている。また、Glu298Asp 変異と重症妊娠中毒症や胎盤早期剥離との関連が報告されている。従って、eNOS 遺伝子変異は、酸化ストレスを引き起こす可能性が高く、酸化ストレスを基盤に持つ多くの疾患の病態と関連することが考えられる。しかしながら、緑内障発症と Glu298Asp 変異は関連がみられなかった

T⁻⁷⁸⁶→C 変異は Glu298Asp 変異とは連鎖していないことが報告されている。T⁻⁷⁸⁶→C 変異型は野生型に比べ有意に転写活性が低下する (Nakayama M, et al. Circulation

1999;99:2864)。

E. 結論

酸化ストレスと関連するとされている eNOS 遺伝子変異と緑内障との関連に関して、Glu298Asp 変異は関連がみられなかった。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

検体提供施設

遺伝子解析症例数

施設	正常対照	開放隅角緑内障	正常眼圧緑内障	合計
慶應義塾大学	132	44	117	293
出田眼科	9	31	22	62
順天堂大学	0	14	24	38
浜松医科大学	0	7	9	16
熊本大学	0	6	2	8
合計	141	102	174	417人

厚生労働科学研究費補助金（感覚器障害研究事業）
分担研究報告書

日本人開放隅角緑内障患者における緑内障感受性遺伝子の検索
— p53 の多型 (PT53: chromosome 17p13.1) —

主任研究者 真島 行彦 慶應義塾大学医学部 助教授
分担研究者 谷原 秀信 熊本大学医学部眼科 教授
堀田 喜裕 浜松医科大学眼科 教授
研究協力者 石川 果林 慶應義塾大学医学部

研究要旨：開放隅角緑内障患者（POAG および NTG）と p53 遺伝子変異との関連を Case-control study により検討した。Arg72Pro 変異は、PCR-RFLP 法にて解析した。その結果、Arg72Pro 変異に関しては genotype frequency、allele frequency とともに正常対照と POAG 患者および NTG 患者とで関連はなかった。

A. 研究目的

緑内障は多因子（多遺伝子）疾患であり、その発症には加齢、環境因子、遺伝的素因等いろいろな因子が関与している。現在、緑内障発症の危険因子として、高眼圧、加齢、人種、家族歴、近視、糖尿病、心血管障害（偏頭痛、血管攣縮等）が考えられている。緑内障性視神経障害ではアポトーシスによる網膜神経節細胞の障害が提唱されている。アポトーシスを生じる最初の反応の1つに p53 の活性化がある。これまでに、緑内障と p53 遺伝子変異 Arg72Pro との関連について、Chinese の緑内障患者において有意の関連があるとする報告と (Lin H-J, et al. B J Ophthalmol 2002;86:767)、インド人緑内障患者では関連がないという報告 (Achaya M, et al. Mol Vis 2002;8:367) がある。今回は p53 (PT53) 変異 Arg72Pro と緑内障との関連を、Case-control study により検討した。

DW	8.5 μl
PCR buffer	1.5 μl
dNTP	1.5 μl
MgCl ₂	1.8 μl
Primer (TP53F)	0.3 μl
Primer (TP53R)	0.3 μl
AmpliTaq Gold polymerase	0.1 μl

PCR 条件

95°C	9min	
95°C	1min	
63°C	30sec	
72°C	2min	35cycle
72°C	7min	

④制限酵素反応 (計 20μl 37°C 2時間)

PCR 産物	15.0 μl
DW	3.0 μl
H buffer	2.0 μl
制限酵素 Acc II	0.2 μl

Acc II にて G allele (Arg) は 113bp+86bp=199bp
C allele (Pro) は 199bp となる。

B. 研究方法

Arg72Pro (CGC to CCC) 多型

①PCRプライマー
(TP53F)

5'- TTG CCG TCC CAA GCA ATG GAT GA -3'
(TP53R)

5'- TCT GGG AAG GGA CAG AAG ATG AC -3'

②対象

正常対照：141 例、NTG：146 例、POAG：103 例

③PCR法 (計 15 μl)

DNA (50ng/ μl) 1.0 μl

遺伝子解析に関しては倫理委員会の承認を得た。緑内障患者からの血液検体は、本研究の目的、研究対象者に対する人権保護上の配慮、研究方法による研究対象者に対する不利益、危険性の排除を説明し、理解を求めた。その後、患者の同意を得て同意書にサインした後血液を採取し、DNA を抽出した。

C. 研究結果

図1に制限酵素 Acc II によるアッセイの PCR-RFLP 法の結果を示す。G allele は 113bp と 86bp に切断され、C allele は 199bp のま
表1

	Genotype Frequency			p	Genotype Frequency			p	Genotype Frequency			Allele Frequency		
	GG(Arg/Arg) (%)	GC(Arg/Pro) (%)	CC(Pro/Pro) (%)		GG (%)	GC+CC (%)	GG+GC (%)		CC (%)	G (%)	C (%)	p	G (%)	C (%)
正常対照 (N=132)	55 (41.7)	62 (47.0)	15 (11.4)		55 (41.7)	77 (58.3)		117 (88.6)	15 (11.4)		172 (65.2)	92 (34.8)		
POAG (N=104)	40 (38.5)	54 (51.9)	10 (9.6)	0.738	40 (38.5)	64 (61.5)	0.618	94 (90.4)	10 (9.6)	0.665	134 (64.4)	74 (35.6)	0.869	
NTG (N=154)	65 (42.2)	66 (42.9)	23 (14.9)	0.62	65 (42.2)	89 (57.8)	0.926	131 (85.1)	23 (14.9)	0.375	196 (63.6)	112 (36.4)	0.706	
3群間				0.57			0.82			0.41			0.93	

chi-square test for independence

までである。3本見えているのはヘテロ変異を示す。Case-control study の結果を表1に示す。

D. 考察

緑内障の視神経障害に関して、網膜神経節細胞のアポトーシスの関与が言われている (Nickells RW. Surv Ophthalmol 1999;43[Suppl I]:S151; Osborne NN, et al. B J Ophthalmol 2001;85:1252)。アポトーシスを生じる最初の反応の1つに p53 の活性化がある。特に、一過性網膜虚血では発現の亢進がみられる。また、正常眼圧緑内障患者と正常人のリンパ球での遺伝子発現の差を検討した結果、p53 遺伝子の発現が亢進していた (Golubnitschaja-Labudova O, et al. Curr Eye Res 2000;21:867)。

Arg72Pro 多型に関して、中国人 POAG 患者では、正常対照に比べ有意に関連していたが、POAG 患者は58名、正常対照は59名であり、サンプル数に問題があると思われる (Lin H-J, et al. B J Ophthalmol 2002;86:767)。今回我々は、3倍数の日本人緑内障患者で検討した結果、Arg72Pro 多型に関して両者に関連はみられなかった。一方、インド人の POAG 患者では、Arg72Pro 多型との関連はなかったが、POAG 患者は67名、正常対照は112名であった (Achaya M, et al. Mol Vis 2002;8:367)。今後は緑内障進行度との関連を検討する。

E. 結論

PT53 における Arg72Pro 多型と緑内障発症には関連はなかった。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

検体の提供先

遺伝子解析症例数

施設	正常対照	開放隅角緑内障	正常眼圧緑内障	合計
慶應義塾大学	132	44	117	293
出田眼科	9	31	22	62
順天堂大学	0	14	24	38
浜松医科大学	0	7	9	16
熊本大学	0	6	2	8
合計	141	102	174	417人

厚生労働科学研究費補助金 (感覚器障害研究事業)
分担研究報告書

日本人開放隅角緑内障患者における緑内障感受性遺伝子の検索
— Mn Superoxide dismutase の多型 (SOD2: chromosome 6q25.3) —

主任研究者 真島 行彦 慶應義塾大学医学部 助教授
分担研究者 谷原 秀信 熊本大学医学部眼科 教授
堀田 喜裕 浜松医科大学眼科 教授
研究協力者 石川 果林 慶應義塾大学医学部

研究要旨: 開放隅角緑内障患者 (POAG および NTG) と SOD2 遺伝子変異との関連を Case-control study により検討した。Val16Ala 変異は、PCR-RFLP 法にて解析した。その結果、Val-16-Ala 変異に関して genotype frequency、allele frequency とともに正常対照と POAG 患者および NTG 患者とで関連はなかった。

A. 研究目的

緑内障は多因子 (多遺伝子) 疾患であり、その発症には加齢、環境因子、遺伝的素因等いろいろな因子が関与している。現在、緑内障発症の危険因子として、高眼圧、加齢、人種、家族歴、近視、糖尿病、心血管障害 (偏頭痛、血管攣縮等) が考えられている。Manganese Superoxide dismutase (SOD2) はミトコンドリアにおける活性酸素を消去する機能を持つ。従って、その機能低下は活性酸素によるアポトーシスを来し組織障害を生じることが考えられる。緑内障性視神経障害ではアポトーシスによる網膜神経節細胞の障害が提唱されている。今回は SOD2 遺伝子多型である Val-16-Ala 変異と緑内障との関連を、Case-control study により検討した。

MgCl₂ 1.8 μl
Primer (SOD2F) 0.3 μl
Primer (SOD2R) 0.3 μl
AmpliTaq Gold polymerase 0.1 μl

PCR 条件

95°C	9min	
95°C	1min	
63°C	30sec	
72°C	2min	35cycle
72°C	7min	

B. 研究方法

Val16Ala (GTT to GCT) 多型

① PCRプライマー

(SOD2F):

5'- AGC CCA GCC TGC GTA GAC -3'

(SOD2R):

5'- TAC TTC TCC TCG GTG ACG -3'

②対象

正常対照: 141 例、NTG: 146 例、POAG: 103 例

③PCR法 (計 15 μl)

DNA (50ng/ μl)	1.0 μl
DW	8.5 μl
PCR buffer	1.5 μl
dNTP	1.5 μl

④制限酵素反応 (計 20μl 37°C 2時間)

PCR産物	15.0 μl
DW	3.0 μl
H buffer	2.0 μl
制限酵素 Bas WI	0.2 μl

Bas WIにて

T allele (Val) は 82bp + 164bp

C allele (Ala) は 246bp となる。

遺伝子解析に関しては倫理委員会の承認を得た。緑内障患者からの血液検体は、本研究の目的、研究対象者に対する人権保護上の配慮、研究方法による研究対象者に対する不利益、危険性の排除を説明し、理解を求めた。その後、患者の同意を得て同意書にサインした後血液を採取し、DNAを抽出した。

C. 研究結果

図1に制限酵素 Bas WI によるアッセイの PCR-RFLP 法の結果を示す。T allele は 164bp

表 1

	Genotype Frequency			p	Genotype Frequency			p	Allele Frequency			p	
	CC(Ala/Ala) (%)	CT(Ala/Val) (%)	TT(Val/Val) (%)		CC (%)	CT+TT (%)	CC+CT (%)		TT (%)	C (%)	T (%)		
正常対照 (N=139)	3 (2.2)	32 (23.0)	104 (74.8)		3 (2.2)	136 (97.8)		35 (25.2)	104 (74.8)	38 (13.7)	240 (86.3)		
POAG (N=106)	2 (1.9)	21 (19.8)	83 (78.3)	0.83	2 (1.9)	104 (98.1)	0.76	23 (21.7)	83 (78.3)	25 (11.8)	187 (88.2)	0.54	
NTG (N=156)	2 (1.3)	43 (27.6)	111 (71.2)	0.60	2 (1.3)	154 (98.7)	0.90	45 (28.8)	111 (71.2)	47 (15.1)	265 (84.9)	0.63	
3群間				0.67			0.85					0.42	0.56

chi-square test for independence

と 82bp に切断され、C allele は 246bp のままである。3本見えているのはヘテロ変異を示す。Case-control study の結果を表 1 に示す。

D. 考察

緑内障の視神経障害に関して、網膜神経節細胞のアポトーシスの関与が言われている (Nickells RW. Surv Ophthalmol 1999;43[Suppl I]:S151; Osborne NN, et al. B J Ophthalmol 2001;85:1252)。アポトーシスを生じる最初の反応の1つに、加齢による活性酸素の増加が考えられる。網膜は酸素需要の多い組織であり、ミトコンドリアにおける SOD2 活性の変化は発生する活性酸素の消去に影響を及ぼす。日本人の拡張性心筋症患者における Case-control study により、疾患に有意に Val が多く、Val-16-Ala 多型との関連が報告されている (Hiroi S, et al. Biochem Biophys Res Commun 1999;261:332)。Val-16-Ala 多型は、本酵素前駆体の最初の 24 アミノ酸の leader signal であり、活性を持つにはこの部分は切り離される。従って、この部の多型はプロセッシングに影響を与える可能性がある。

眼科疾患では、加齢性黄斑変性における Case-control study により、疾患に有意に Ala が多いことが報告された (Kimura K, et al. Am J Ophthalmol 2000;130:769)。

今回の検討では、Val-16-Ala 多型に関して緑内障 (POAG および NTG) 発症との関連はみられなかった。今後は緑内障の進行度との関連を検討する。

E. 結論

SOD2 における Val-16-Ala 多型と緑内障発症には関連はなかった。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

検体提供施設

遺伝子解析症例数

施設	正常対照	開放隅角緑内障	正常眼圧緑内障	合計
慶應義塾大学	132	44	117	293
出田眼科	9	31	22	62
順天堂大学	0	14	24	38
浜松医科大学	0	7	9	16
熊本大学	0	6	2	8
合計	141	102	174	417人

厚生労働科学研究費補助金（感覚器障害研究事業）
 分担研究報告書

日本人開放隅角緑内障患者における緑内障感受性遺伝子の検索
 — Retina specific amine oxidase の多型 (AOC2: chromosome 17q21) —

主任研究者 真島 行彦 慶應義塾大学医学部 助教授
 分担研究者 谷原 秀信 熊本大学医学部眼科 教授
 堀田 喜裕 浜松医科大学眼科 教授
 研究協力者 張 強 慶應義塾大学医学部

研究要旨：開放隅角緑内障患者（POAGおよびNTG）と Retina specific amine oxidase (AOC2) 遺伝子変異との関連を Case-control study により検討した。AOC2 プロモーター A-46G 多型は、PCR-RFLP 法にて解析した。その結果、A-46G 多型は genotype frequency、allele frequency とともに正常対照と POAG 患者および NTG 患者とで関連はなかった。

A. 研究目的

緑内障は多因子（多遺伝子）疾患であり、その発症には加齢、環境因子、遺伝的素因等いろいろな因子が関与している。現在、緑内障発症の危険因子として、高眼圧、加齢、人種、家族歴、近視、糖尿病、心血管障害（偏頭痛、血管攣縮等）が考えられている。Retina specific amine oxidase (AOC2) は、網膜神経節細胞に特異的に発現している遺伝子で、我々が1997年にクローニングした (Imamura Y, Kubota R, Wang Y, Asakawa S, Kudoh J, Mashima Y, Oguchi Y, Shimizu N. Genomics 40:277-283, 1997)。詳細な機能は不明であるが、GABA 合成酵素と考えられる。網膜神経節細胞に発現していることから、その機能障害は視神経萎縮を生じる可能性がある。今回、AOC2 遺伝子のプロモーター多型に注目し、緑内障との関連を、Case-control study により検討した。

DW	14.5 μl
PCR buffer	2.1 μl
dNTP	1.6 μl
Primer (hRAOprof1)	0.4 μl
Primer (hRAOpror1)	0.4 μl
AmpliTaq Gold polymerase	0.1 μl

PCR 条件

95°C	9min	
95°C	30sec	
63°C	30sec	
72°C	1min	35cycle
72°C	7min	

④制限酵素反応（計 22.7μl 37°C 2時間）

PCR 産物	20.0 μl
K buffer	2.3 μl
制限酵素 XspI	0.4 μl

Xsp Iにて A alleleは 58bp+163bp
 G alleleは 221bpとなる。

B. 研究方法

AOC2 プロモーター-: A-46G 多型

①PCRプライマー

(hRAOprof1)

5'-GGT CAG AAA TTT CCT GCC CA -3'

(hRAOpror1)

5'-GGC TGG TCA GCA AAA CAT AG -3'

②対象

正常対照：148例、NTG：156例、POAG：113例

③PCR法（計 20 μl）

DNA (50ng/ μl) 1.0 μl

遺伝子解析に関しては倫理委員会の承認を得た。緑内障患者からの血液検体は、本研究の目的、研究対象者に対する人権保護上の配慮、研究方法による研究対象者に対する不利益、危険性の排除を説明し、理解を求めた。その後、患者の同意を得て同意書にサインした後血液を採取し、DNAを抽出した。

C. 研究結果

図1に制限酵素 Xsp I によるアッセイの PCR-RFLP 法の結果を示す。A allele は 58bp と 163bp

表 1

	Genotype Frequency			Genotype Frequency		p	Genotype Frequency		p	Allele Frequency		
	A/A (%)	A/G (%)	G/G (%)	AA (%)	AG+GG (%)		AA+AG (%)	GG (%)		A (%)	G (%)	p
正常対照 (N=148)	122 (82.3)	25 (17.0)	1 (0.7)	122 (82.3)	26 (17.7)		147 (99.3)	1 (0.7)		269 (90.9)	27 (9.1)	
POAG (N=113)	85 (75.2)	28 (24.8)	0 (0.0)	85 (75.2)	28 (24.8)	0.204	113 (100.0)	0 (0.0)	0.892	198 (87.6)	28 (12.4)	0.289
NTG (N=159)	133 (83.7)	25 (15.7)	1 (0.6)	133 (83.7)	26 (16.3)	0.895	158 (99.4)	1 (0.6)	0.51	291 (91.5)	27 (8.5)	0.894

x2検定

に切断され、G allele は 221bp のままである。3本見えているのはヘテロ変異を示す。Case-control study の結果を表1に示す。

genotype frequency、allele frequency とともに正常対照と POAG 患者および NTG 患者とで関連はなかった。

D. 考察

緑内障の視神経障害に関して、網膜神経節細胞のアポトーシスの関与が言われている (Nickells RW. Surv Ophthalmol 1999;43[Suppl I]:S151; Osborne NN, et al. B J Ophthalmol 2001;85:1252)。AOC2 遺伝子は網膜神経節細胞に特異的に発現していることから、その発現の変化は機能障害を来すことが考えられた。しかし、今回のプロモーター多型では正常対照者と緑内障患者で有意の差はなかった。

E. 結論

AOC2 プロモーター A-46G 多型は緑内障発症と関連はなかった。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

厚生労働科学研究費補助金（感覚器障害研究事業）
分担研究報告書

正常眼圧緑内障における最高眼圧の違いによる視野・乳頭形態の比較

主任研究者 真島行彦 慶應義塾大学医学部 助教授
研究協力者 石川果林 慶應義塾大学医学部

研究要旨：正常眼圧緑内障患者を最高眼圧 16mmHg により 2 群に分け臨床的特徴を比較した。乳頭形態には差がなかったが、High-teen 群 (16mmHg 以上) が Low-teen 群 (15mmHg 以下) より高度な視野障害を示し、より眼圧の影響を受けていると考えられた。従って、High-teen 群では最高眼圧の 30% 眼圧下降が必要である。

A. 研究目的

本邦における後天性疾患の失明原因の上位として、糖尿病網膜症、緑内障、加齢性黄斑変性がある。開放隅角緑内障は加齢と共に有病率が上がり、40 歳以上では約 4% で、推定約 200 万人存在するが、実際に眼科で治療されているのは 20% にすぎない。高齢化社会を迎える日本において、失明への予防と新たな治療法が望まれる。本邦では開放隅角緑内障の 90% が正常眼圧緑内障とされ、患者の視野・視機能の維持のために、より早期の診断、予防、および緑内障の根本的治療が期待されている。

眼圧は統計学的に正常範囲にあっても緑内障性視神経障害進行の重大な危険因子であることや、眼圧は正常眼圧緑内障発症の一大因子であり眼圧を 30% 低下させると視野障害進行を遅らせるといった報告があり、正常眼圧緑内障における眼圧の関与が重要視されている。正常眼圧緑内障を最高眼圧により 2 群に分け、その臨床的特徴を比較する。

B. 研究方法

正常眼圧緑内障 48 例 96 眼に対し、入院の上眼圧日内変動を測定し、このうち最高眼圧が高い方の眼、または、両眼の最高眼圧が同一の場合は一律に右眼を対象とした。日内最高眼圧が 16mmHg 以上のものを High-teen 群 (H 群)、15mmHg 以下のものを Low-teen 群 (L 群) として分類し、年齢、性別、屈折、眼圧、視野、視神経乳頭形態について検討した。視野はハンフリー静的視野 (中心 30-2 プログラム) を行い、視神経乳頭は Nicoleta に従い 4 型に分類した。また、22 眼に対してはハイデルベルグ・レチナ・トモグラフを用い、乳頭

パラメータを解析し比較した。

C. 研究結果

年齢、性別、屈折、視神経乳頭の形態においては両群間に有意差はなかったが、最低眼圧、および眼圧日差において H 群 (13.0 ± 2.5 mmHg、および 5.4 ± 2.2 mmHg) が L 群 (10.2 ± 1.5 mmHg、および 3.7 ± 1.2 mmHg) よりそれぞれ有意に高値を示した ($p < 0.01$)。ハンフリー静的視野検査の mean deviation (MD) 値では H 群が有意に低値を示した ($p < 0.01$)。

D. 考察

今回の検討は、1 年以内に検診や近医で正常眼圧緑内障が疑われ当科で入院精査した NTG 患者をある一時点でみた断面的な検討であり、長期経過をみたものではない。しかしながら、H 群が L 群と比較して高度な視野障害を示したことから、眼圧が正常眼圧緑内障の重要な危険因子であると考えられた。現在、いわゆる眼圧の正常値は上限 21mmHg とされているが、これは正常欧米人を対象とした統計学的数値であり、この基準に従って NTG と POAG の疾患群に分けられているにすぎない。21mmHg を基準とすることについては多くの議論となっており、この値を境に NTG と POAG を鑑別することは、疾患の本質を反映していないと思われる。眼圧依存性の境界をどこにするかは明確にされていないが、重要な概念であることは言うまでもない。今回の最高眼圧 16mmHg という基準が妥当か否かは不明であるが、両群の MD 値に差を認めたことから、临床上の一つの参考になり得るのではないかと考えられた。今後、これらの症例の長期経過を検討し、特に眼圧 15mmHg 以下の L 群について眼圧以外

の因子を含めたさらなる検討を重ねることで、正常眼圧緑内障病態解明へ近づきたい。

E. 結論

H 群が L 群より高度な視野障害を示したことから、正常眼圧緑内障においても眼圧の影響を受けると考えられた。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

石川果林、谷野富彦、大竹雄一郎、木村 至、宮田 博、真島行彦：正常眼圧緑内障における最高眼圧の違いによる視野・乳頭形態の比較。日眼会誌 107, 2003 印刷中

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

表 1 患者背景と眼圧

	High-teen群 (最高眼圧 \geq 16mmHg)	Low-teen群 (最高眼圧 \leq 15mmHg)	p値
症例数 (例)	29	19	
検査対象眼数 (眼)	58	38	
解析対象眼数 (眼)	29	19	
性別 (男:女) (例)	16:13	12:17	NS #1
年齢 (歳)	56.6 \pm 13.1	50.7 \pm 11.7	NS #2
屈折 (D)	-3.6 \pm 3.8	-2.9 \pm 2.7	NS #2
最高眼圧 (mmHg)	18.5 \pm 1.6	13.9 \pm 1.0	p<0.0001 #2
最低眼圧 (mmHg)	13.0 \pm 2.5	10.2 \pm 1.5	p<0.0001 #2
眼圧日差 (mmHg)	5.4 \pm 2.2	3.7 \pm 1.2	p<0.01 #2

平均値 \pm 標準偏差

p値； #1： χ^2 検定， #2：Mann-WhitneyのU検定

NS：not significant

厚生労働科学研究費補助金（感覚器障害研究事業）
分担研究報告書

慶應義塾大学病院における正常眼圧緑内障患者の受診機転

主任研究者 真島行彦 慶應義塾大学医学部 助教授
研究協力者 佐藤裕理 慶應義塾大学医学部

研究要旨：慶應義塾大学病院を受診した正常眼圧緑内障患者の受診機転について検討した。対象は2000年1月1日～2001年12月31日に、正常眼圧緑内障と診断された77例である。前医受診歴がない群26例（33.8%）では、視野変化が小さい群（湖崎分類Ⅱb以下）では飛蚊症が最も多く、次いで人間ドック、検診での緑内障疑いであった。視野大きい群（湖崎分類Ⅲa以上）では、人間ドック、検診での緑内障疑いが最も多かった。前医院受診歴のある群61例（79.2%）では、緑内障診断に対するsecond opinionが最も多く、次いで、治療に対するsecond opinionであった。前医受診機転としては、いずれも人間ドックでの緑内障疑いが多かった。眼科を受診する動機として、人間ドックや検診での緑内障疑い（眼底検査）指摘が多かった。緑内障早期発見には人間ドックなどでの眼底検査が重要である。

A. 研究目的

緑内障は失明原因の第2位であり、有病率は加齢と共に上がり40歳以上では4%で推定約200万人以上存在するが、実際に眼科で治療されているのは20%にすぎないとされている。緑内障の初期は自覚症状が乏しいため、偶然の眼底検査や人間ドックや健康診断の眼底写真により疑われることも多い。また、一方では自覚症状が乏しいため、視野欠損がかなり進行してから眼科を受診すること患者も多い。高齢化社会を迎える日本において、患者の視野・視機能の維持のために、より早期の診断、予防、および緑内障の根本的治療が期待されている。自覚症状の乏しい正常眼圧緑内障患者の受診機転を検討するために、慶應義塾大学病院を受診した患者の受診機転について検討した。

B. 研究方法

対象は、2000年1月1日～2001年12月31日に、眼圧日内変動等入院検査にて正常眼圧緑内障と確定診断された77例（男性33例、女性44例）で、年齢は35～83歳（平均57.1±11.5歳）であった。慶應義塾大学病院を受診する前に他院受診歴がある群とない群に分け、更に、各群をそれぞれGoldmann動的視野検査による視野変化が小さい群（湖崎分類Ⅱb以下）と大きい群（湖崎分類Ⅲa以上）に分け、当院および他院受診機転につき比較検

討した。

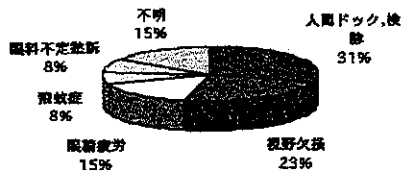
C. 研究結果

前医受診歴がない群は26例（33.8%）で、そのうち視野変化の小さい群（7例、9.1%）では受診機転として飛蚊症（44%）が最も多く、次いで人間ドック、検診での緑内障疑い（眼底検査）（14%）であった。視野変化の大きい群（19例、24.7%）では、人間ドック、検診での緑内障疑い（眼底検査）（40%）、視力低下（18%）であった。

前医受診歴のある群は51例（66.2%）で、そのうち視野変化の小さい群（12例、15.6%）では緑内障診断に対するsecond opinion目的が多く（58%）、次いで、治療に対するsecond opinion（17%）であった。視野変化の大きい群（39例、50.6%）でも同様に、緑内障診断に対するsecond opinion目的が多く（41%）、次いで、治療に対するsecond opinion（15%）であった。

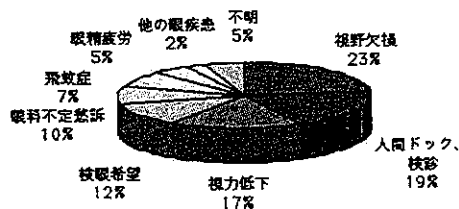
前医の受診機転としては（61例）、視野変化の小さい群（12例、15.6%）では、人間ドック、検診での緑内障疑い（眼底検査）（31%）が最も多く、次いで視野欠損（23%）、眼精疲労（15%）であった。

前医受診機転 (61例) 視野変化の小さい群 (12例)
(複数回答)



視野変化の大きい群 (39例、56.6%) では、視野欠損 (23%) が最も多く、次いで人間ドック、検診での緑内障疑い (眼底検査) (19%) であった。

前医受診機転 (61例) 視野変化の大きい群 (39例)
(複数回答)



D. 考察

慶應義塾大学病院眼科を受診した正常眼圧緑内障患者の約 8 割に前医受診歴があり、そのうち 3 割以上が人間ドックや検診で視神経乳頭形状の異常を指摘され緑内障が疑われた症例であった。いずれにしても、眼科を受診する動機として、人間ドックや検診での緑内障疑い (眼底検査) 指摘が多かった。緑内障早期発見には人間ドックなどでの眼底検査が重要である。また、飛蚊症や眼精疲労などを主訴に受診した場合も、眼底検査で視神経乳頭の状態を観察することが重要である。

前医受診歴のある場合の半数以上が second opinion 目的に当院を受診しており、緑内障患者は自分の病気の診断及び治療に対して不安が強いものと考えられる。これらの症例では十分なインフォームドコンセントを得られていなかったと推定される。

E. 結論

眼科の受診機転は、他院受診歴のない慶應初診例では緑内障性視野欠損で来院された患者は少なく、他院受診歴のある場合は、人間ドックで見つかり治療目的で当院へ紹介されていた。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

佐藤由裕、谷野富彦、大竹雄一郎、真島行彦、宮田 博：慶應義塾大学病院における正常眼圧緑内障患者の受診機転 第 13 回日本緑内障学会 平成 14 年 9 月 20 日 (横浜)

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

緑内障様乳頭陥凹を示すレーベル病萎縮期と正常眼圧緑内障における視神経乳頭の比較

主任研究者 真島行彦 慶應義塾大学医学部 助教授

研究要旨：萎縮期のレーベル病患者と正常眼圧緑内障患者の視神経乳頭を、Heidelberg retina tomograph (HRT)を用いて他覚的に3次元で比較検討した。HRTによる緑内障判定プログラムでは77%の乳頭所見を緑内障様と判定した。しかし、正常眼圧緑内障ではより深い陥凹所見が特徴であった。ミトコンドリアDNAの障害により視神経乳頭陥凹を来すことが推定された。

A. 研究目的

レーベル病は発症後1年以内に視神経萎縮に至る難治性の視神経疾患であるが、これまでに視神経乳頭陥凹を呈することが報告されている。今回、正常眼圧緑内障とレーベル病の視神経乳頭をHeidelberg retina tomograph (HRT)を用いて他覚的に比較した。

B. 研究方法

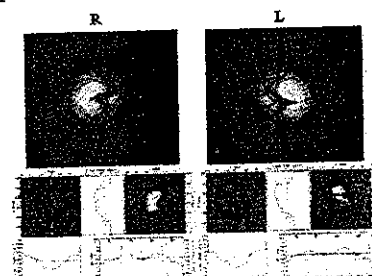
レーベル病は、11778変異を持つ萎縮期の患者13名26眼で平均年齢は26.2歳であった。正常眼圧緑内障は（24時間眼圧検査にて21mmHgを超えない）30歳代の6名12眼とし、平均年齢は36.0歳であった。正常人10名12眼を対照とし、平均年齢は25.5歳であった。HRTを用いて視神経乳頭計測を3回行い、各種トポグラフィック・パラメータを統計学的に比較した。

C. 研究結果

レーベル病13名26眼の内、緑内障判定プログラム(classification)にて10名20眼(77%)が緑内障と判定された。レーベル病はこの20眼のデータを採用した(-1.98±1.10)。正常眼圧緑内障は全例緑内障と判定された(-1.73±1.99)。レーベル病と正常眼圧緑内障の両群で、disk area, cup area, C/D ratio, rim area, cup volume, rim volume, cup shape measure, height variation contourのパラメーターには有意差はなかった。一方、mean cup depth, maximum cup depth, reference heightにおいて正常眼圧緑内障が有意に変化が強く、mean RNFL thickness, RNFL cross section areaにおいてはレーベル病が

有意に変化が強かった。

Fig. 1



D. 考察

レーベル病においても緑内障様の視神経乳頭の陥凹が認められたが、レーベル病の全体的な乳頭陥凹に比べ、NTGの方がより局所の変化が強く、陥凹は深い。一方、神経線維層の厚さは、レーベル病が正常眼圧緑内障に比べより広範囲に強い萎縮を認めた。レーベル病の本態は明らかではないが、視神経線維自体が障害され、その後アポトーシスにより視神経線維が消失するとされている。急性期に存在する特徴的な視神経乳頭周囲の微細血管症は虚血の関与も考えられる。また、動脈炎性の前部虚血性視神経症でも緑内障様の乳頭陥凹が報告されている。一方、正常眼圧緑内障の視神経障害の成因の1つに循環障害の関与が言われている。しかし、今回両者の視神経陥凹の形態に差を認めたことから、正常眼圧緑内障では虚血以外にも眼圧や篩状板の脆弱性などの他の要因も影響していることが示唆された。

また、常染色体優性視神経萎縮患者においても、緑内障様の視神経乳頭陥凹が報告されている。この原因遺伝子はミトコンドリア蛋白をコードする遺伝子である。また、この遺伝子多型は、Case-control study により正常眼圧緑内障患者に有意に多くみられている。従って、ミトコンドリア DNA の障害により視神経乳頭陥凹を来すことが推定された。今後は緑内障患者において、レーベル病に関連するミトコンドリア DNA 変異のヘテロプラスミーの有無およびその程度と緑内障発症・進行との関連を検討する意義がある。

E. 結論

レーベル病は眼圧の要因がない疾患であるが、緑内障様の乳頭陥凹を生じていた。しかし、その変化は NTG とは異なっており、両者の病態の違いを表していると思われる。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

Mashima Y, Kimura I, Yamamoto Y, Ohde H, Ohtake Y, Tanino T, Tomita G, Oguchi Y. Optic disc excavation in an atrophic stage of Leber's hereditary optic neuropathy: differentiation from normal-tension glaucoma. Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology 241:75-80, 2003.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

厚生労働科学研究費補助金（感覚器障害研究事業）
分担研究報告書

Invader 法を用いたミトコンドリア DNA のヘテロプラスミー定量法の開発

分担研究者 工藤 純 慶應義塾大学医学部・分子生物学・講師
研究協力者 株式会社 ビーエムエル社

研究要旨：Invader 法は、2セットの特異的なシグナルプローブ、インベーターオリゴ、FRET プローブと2色の蛍光標識を用いて、同時に野生型と変異型 1 塩基置換を検出する方法である。ミトコンドリア DNA (mtDNA) 変異の特徴としてヘテロプラスミーがあるが、臨床検査にて簡便かつ精密に計測する方法として、Invader 法を用いた mtDNA のヘテロプラスミー定量法を開発した。Invader 法によるヘテロプラスミーの割合の測定結果は、PCDR-SSCP 法とほぼ同じ結果が得られた。Invader 法により mtDNA ヘテロプラスミーの定量が可能となったが、定量には2つの蛍光強度値を補正する必要がある。今後は、緑内障患者多数例において、レーベル病と関連のある mtDNA の6つの SNPs のヘテロプラスミーの定量を行う。

A. 研究目的

ミトコンドリア蛋白の異常が見られるレーベル病では高頻度に視神経陥凹がみられることから (Mashima Y, et al. Graefes' Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology 2003)、正常眼圧緑内障患者において変異ミトコンドリア DNA (mtDNA) ヘテロプラスミーと関連が推測される。ヘテロプラスミーを臨床検査にて簡便かつ精密に計測する方法として、我々は Invader 法に注目したが、本法による mtDNA のヘテロプラスミーの報告はない。G3460A 変異、G11778A 変異、および T14484C 変異のヘテロプラスミー定量法を開発する。

B. 研究方法

ミトコンドリア病であるレーベル遺伝性視神経症 (Leber's hereditary optic neuropathy、レーベル病) 患者の90%は G3460A 変異、G11778A 変異、T14484C 変異のいずれかを持つ (Mashima Y, et al. Curr Eye Res 1998;17:403-8)。表1に3つの変異を検出するプローブを記載した。

Invader によるアッセイ法は、Third Wave Technologies 社から提供された 96-well プレートを用いた。各 well には Cleavase® enzyme XIII, FRET probe, MOPS buffer, および polyethylene glycol が乾燥された状態で予め入っている。アッセイには、wild primary probe、mutant primary probe および Invader® oligonucleotide を入れ、64度で2時間か

ら4時間反応させ、蛍光強度を計測する (CytoFlour 4000)。

以下の4項目を検討した。

- 1) 3 SNPs に関して、検出計測値と総 DNA 量およびアッセイ時間との関連を調べる。
- 2) 224 名の視神経萎縮患者において、以前に PCR 法+制限酵素反応により3つの SNPs の有無が確認された患者を対象に、Invader 法によりこれら3つの SNPs の検出精度を明らかにする。
- 3) 野生型と変異型の合成オリゴを作成し、人工的ヘテロプラスミーの状態を作成し、Invader 法によるヘテロプラスミー計測との関連を調べる。
- 4) 以前に PCR 法+SSCP 法により mtDNA11778 変異のヘテロプラスミーの計測を行った5家系のレーベル病家系を対象に、Invader 法によるヘテロプラスミー計測結果と比較する。

C. 研究結果

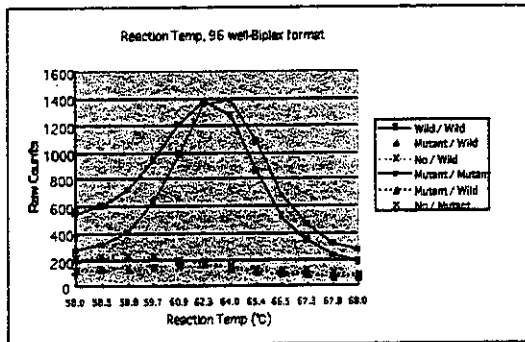
Invader 法は、Cleavase 酵素により反応が繰り返されるが至適温度は64度である。図1は G11778A 変異検出のプローブの特異性をみたが、この温度で反応が特異的に生じていた。

Table 1 The oligonucleotide sequence of wild type, mutant, and Invader[®] probes with Invader[®] assay to detect mutations of mtDNA

Position Mutation	Nucleotide	Target	Probe	Sequence	T _m	Dye
NADH dehydrogenase subunit 1 Ala52Thr	G3460A	Anti-sense	Wild	ACGGACGGGAG gccataaaactcttcacca	63.2	RED
			Mutant	CGCGCCGAGG accataaaactcttcaccaa	63.3	FAM
			Invader	ccctacgggctactacaacccttcgctgact	77.7	
NADH dehydrogenase subunit 4 Arg340His	G11778A	Anti-sense	Wild	ACGGACGGGAG gcatcataatcctctctcaag	63.5	RED
			Mutant	CGCGCCGAGG acatcataatcctctctcaag	62.2	FAM
			Invader	gcctagcaaaactcaaactacgaacgcactcacagtct	77.7	
NADH dehydrogenase subunit 6 Met64Val	T14484C	Sense	Wild	CGCGCCGAGG atggttctctttggataactac	63.4	FAM
			Mutant	ACGGACGGGAG gtggttctctttggataacta	62.8	RED
			Invader	ttttgggggaggttatatgggttaatggttttaattatttagggggaatgt	76.0	

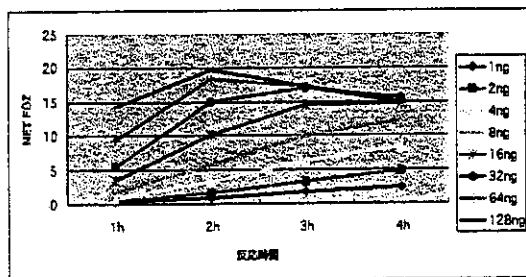
図 1

Invader法によるG11778A変異検出の特異性、温度依存性



1) 総 DNA 量 1ng—8ng ではアッセイ時間が 4 時間までは直線的に測定値 (蛍光強度値) が増加した。16ng 以上では 3—4 時間で飽和した。

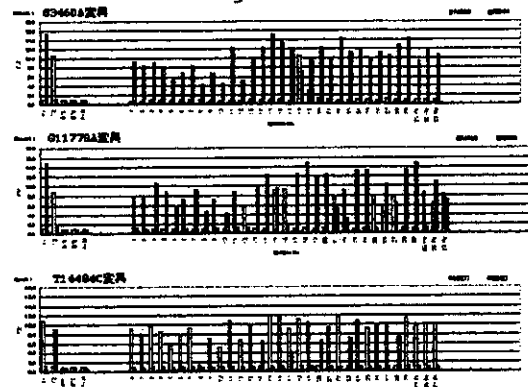
Figure 1A



2) 224 名の視神経萎縮患者において、PCR-RFLP 法により G3460G 変異は 3 名、

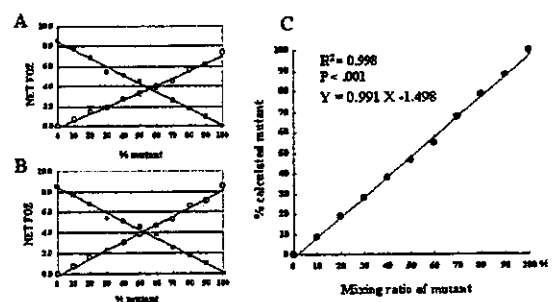
3) G11778AT 変異は 6 3 名、14484C 変異は 6 名に確認されていたが、Invader 法による検出でも全く同じ結果が得られた。

Figure 2



4) 人工的に作成したヘテロプラスミーの割合と Invader 法で計測されたヘテロプラスミーの割合とは直線関係が得られた ($R^2=0.998$ 、 $p<0.001$)。

Figure 3



5) 5家系20名の G11778A 変異レーベル病ヘテロプラスミー患者において、Invader 法によるヘテロプラスミーの割合の測定結果は、PCDR-SSCP 法とほぼ同じ結果が得られた。

Figure 4A

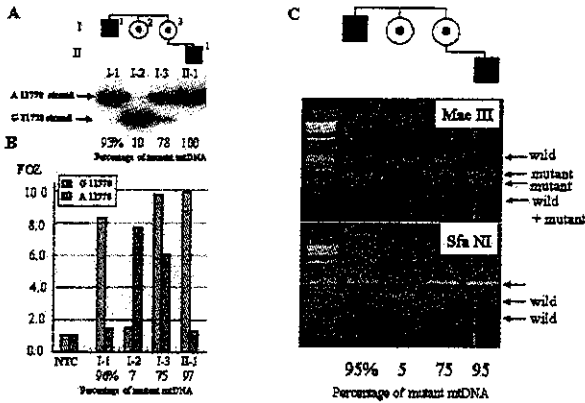


Figure 4B

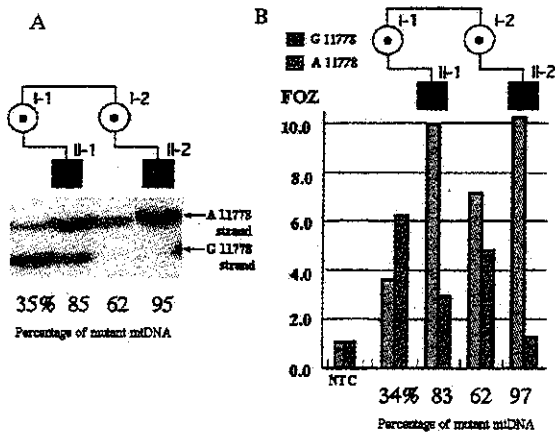
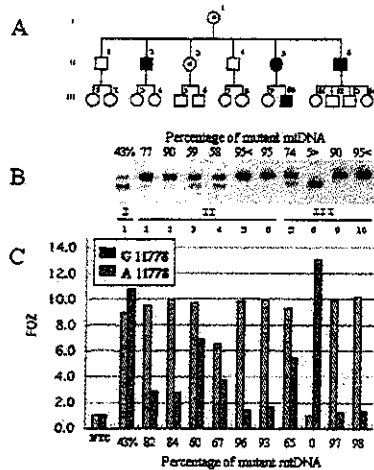


Figure 4C



D. 考察

Invader 法は PCR 法に依存せずゲノム DNA を用いて直接 SNPs を均一系で一挙に検出できる。PCR 法+DNA チップ法の測定精度は約 90%

とされているが、本法は 99.7%の測定精度をもつ。さらに Invader 法は迅速かつ容易に検出が可能である。本法は 2色の蛍光標識を用いて、同時に野生型と変異型ターゲットの SNPs を検出する方法である。しかしながら、mtDNA の分子量が同じであっても、2色の蛍光は同一の蛍光強度を示さないため、定量する場合補正が必要である。我々はコントロールオリゴを基準として、反応時間が 1 時間から 4 時間の間で、2色の蛍光強度が直線的に増加する時間において、その差を補正值として修正した。その結果、人工的に作成したヘテロプラスミーの割合と Invader 法で計測されたヘテロプラスミーの割合とは直線関係が得られた。

E. 結論

Invader 法により mtDNA ヘテロプラスミーの定量が可能となったので、今後は緑内障患者多数例において、レーベル病と関連のある mtDNA の 6つの SNPs、すなわち G3460A 変異、G11778A 変異、T14484C 変異、T9101C 変異、G9804A 変異、C14498T 変異を検討する。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし