

Fig. 5. Comparison of SSCP analysis of PCR-amplified mtDNA fragments and Invader® assay in three heteroplasmic LHON family. The upper and lower figures show PCR-SSCP analysis and Invader® assay analysis, respectively.

Detection of mtDNA mutations by Invader® assay

The results of tests for the three mtDNA mutations, G3460A, G11778A, and T14484C, simultaneously, in 96-well plates are shown in Fig. 3. There were 29 out of 294 individuals including 224 probands and 70 of their relatives who were selected at random, including 2 individuals with the G3460A mutation, 13 with the G11778A mutation, 5 with the T14484C mutation, and 9 with no mutation who were tested. The G3460A mutation was identified in cases 18 and 19 (Fig. 3A); the G11778A mutation was identified in cases 1, 2, 6, 9, 11, 12, 15, 16, 21, 22, 25, 26, and 27 (Fig. 3B); and the T14484C mutation was identified in cases 14, 17, 20, 23, and 28 (Fig. 3C). The rest of the cases (3, 4, 5, 7, 8, 10, 13, 24, and 29) had none of the three mutations. Interestingly, case 8 in Fig. 3C showed no reaction to both probes. Direct sequence analysis revealed that this case had a nucleotide substitution at G14476A, which is located within the primary probes (data not shown). Heteroplasmy was considered to be present in cases 15, 17, 18, 19, 21, 22, 26, and 27.

The FOZ values from control oligonucleotides of the wild form (T1, RED) and mutant form (T2, FAM) with the same molecules did not show the same values in the 3- and 4-h assays (Figs. 3A and B). The values of FOZ RED in T1 were saturated in the 4-h assay and those of FOZ FAM in T2 were saturated after a 3-h assay. In case 18, the FAM FOZ value was saturated in the 4-h assay (Fig. 3A). The same results were observed in cases 15, 16, and 22 after a 3-h assay (Fig. 3B). The FOZ values of control oligonucleotides of wild (T1, FAM) and mutant (T2, RED) were saturated in a 4-h assay, and the FAM FOZ value in case 17 was also saturated (Fig. 3C). In quantifying the percentage of mutant mtDNAs, data from the 2-h Invader® assay should be used in Fig. 3.

A complete concordance was observed between the earlier PCR-RFLP analysis [27] and Invader® assay genotyping of the 224 patients: 3 patients had the G3460A mutation; 63 had the G11778A mutation; and 6 had the T14484C mutation. False-positives or false-negatives were not observed with Invader® assay. The presence of heteroplasmy was also consistent with that of the PCR-RFLP analysis [11].

Heteroplasmy quantification

The mixture ratios of the synthesized oligonucleotides (64mers) including np G11778 and A11778 vs. NET FAM FOZ (mutant: open circles) and NET RED FOZ (wild: closed squares) curves in the 2-h assay are shown in Fig. 4A. Although each oligonucleotide has the same molecules (1 pM), the values of NET RED FOZ (8.52) with 0% mutant and NET FAM FOZ (7.29) at 100% mutant were not the same. Thus, each NET FAM FOZ value was modified by multiplying the ratio of NET RED FOZ at 0% mutation/NET FAM FOZ at 100% mutation, viz., $8.52/7.29 = 1.17$ (Fig. 4B).

A standard curve was constructed for the calculated values of NET FAM FOZ and modified NET RED FOZ against the known mixture ratios of mutant-synthesized oligonucleotides (Fig. 4C). A linear relationship was observed between the results obtained from the separate mixtures and from the Invader® assay analysis.

A comparison of the PCR-SSCP analysis previously reported [11] and Invader® assay for detecting heteroplasmy in three families with LHON is shown in Fig. 5. The values of RED FOZ were modified by multiplying the ratio of T2/T1 ($13.74/12.48 = 1.1$; Fig. 5A). The percentage of mutant mtDNAs was consistent in both analyses.

Discussion

Heteroplasmy is one of the significant factors determining the expression of mitochondrial diseases, for example, MELAS [6], MERRF [7], NARP [8], Leigh disease [9], and LHON [10]. Tissue-specific heteroplasmy is especially important to understand variation in clinical phenotypes.

The Invader® assay was recently developed to determine genotyping based on the cleavage of a specific structure formed by overlapping probes that are annealed to the targeted DNA [22]. It does not require PCR, restriction digestion, or gel electrophoresis. The Invader® assay enables simultaneous detection of two DNA sequences in a single well by using two fluorescent dyes, and can thus quantitatively detect specific mutations directly from genomic DNA. This technique can also make it suitable for direct quantification of specific RNAs [30].

We used Invader® technology with fluorescence polarization (FP) detection [27] to genotype mtDNA as well as to quantify heteroplasmy as an alternative to the PCR-RFLP analysis or the PCR-SSCP analysis for clinical use. By using two signal probes with two different fluorophores (FAM and RED) and FP detection, wild-type and mutant mtDNAs can be assayed under the same conditions. Furthermore, the non-PCR method of Invader® assay can be used to detect the degree of heteroplasmy more simply than the conventional two analyses method, and more accurately than PCR-RFLP analysis which is commonly applied clinically.

In Mendelian-inherited diseases, Third Wave Technologies provides cutoff values for allelic ratios which are used to interpret assay results of heterozygotes or homozygotes. In the Invader® assay, heterozygous alleles do not always show a ratio of 1.0 because the fluorescence intensities of FAM or RED are not the same. Some variation in signal strength in each patient sample was considered to be due to template quality [23]. Thus, we used modified allelic ratios as described in Results.

To overcome some problems, the optimum conditions for the Invader® assay were determined to quantify heteroplasmy in mtDNA. First, 5–10 ng of DNA are required for a 1–3-h assay to quantify mtDNA in Invader® assay because

a linear relationship is observed in these assay times. The kinetics of signal accumulation in this two-step Invader[®] assay with both primary and secondary reaction running simultaneously predicts that the signal is a quadratic function of time [31]. Because the NET FOZ has the background subtracted from total signal generation, it as a function of time shows as nearly linear for 1–8 ng of DNA. Second, the FOZ values of control-synthesized oligonucleotides must be evaluated within the range of the linear relationship established between FOZ values and assay time. We can observe the linearity of FOZ values for control oligonucleotides as well as examine the mtDNAs of patients against assay time by collecting data in 2-, 3-, and 4-h assays. Third, the intensity of FAM or RED from the same DNA molecules is not always the same with the Invader[®] assay. Thus, to quantify heteroplasmy of mtDNAs, one of the two fluorescent intensities has to be modified according to the difference of FOZ values of two control-synthesized oligonucleotides. To check the stability of this calibration for determining the degree of heteroplasmy, the performance of the standard mixtures containing the different amounts of wild-type and mutant DNAs is recommended with every analytical run. In the present study, when a standard curve was prepared using mixtures of mutant- and wild-type-synthesized oligonucleotides at np11778, we obtained a 1:1 correlation with a mixture ratio of mutant oligonucleotides and measured percentage of mutant oligonucleotides by Invader[®] assay. To construct this curve, 1 pM of oligonucleotide was used, and each well of the 96-well plate of the Invader[®] assay contained 15 μ l of reaction mixture. This includes approximately 4,200,000 ($7 \times 10^{-18} \times 6 \times 10^{23}$) molecules of the control oligonucleotide. Ten nanograms of DNA includes approximately $3-6 \times 10^6$ copies of mtDNA/well. Synthesized oligonucleotide (1 pM) can be recommended to use for control Invader[®] assay of mtDNA hereafter. In the conditions described, results obtained from the Invader[®] assay for heteroplasmy of G11778A mutation were consistent with those from labeled PCR-SSCP analysis in the same patients.

In mitochondrial diseases, tissue-specific heteroplasmy is important to know for the variable phenotypes or expression of the disease. PCR-RFLP analysis is usually used to evaluate heteroplasmy clinically, and PCR-amplified products of patients are assayed by restriction enzymes, run out on the gel, and then subjected to densitometry. Invader[®] assay is a sensitive and DNA-probe-based system for quantitatively detecting specific mutations directly from mtDNA and provides an assay for each sample in one reaction.

Thus far, nearly 20 point mutations of mtDNA in LHON have been reported [2,32]. As the microtiter plate format makes possible the simultaneous analysis of multiple analytes for each patient's sample, we can genotype several mtDNA SNPs and quantify their heteroplasmy simultaneously. Two different fluorophores can be counted depending on target sequences on a fluorescence plate reader

directly from the microtiter plate after incubation, thereby saving time. Because FP is independent of fluorescence intensity, it requires no separation of cleaved fluorescence probes from intact fluorescence probes. FP detection works best when the cleavage reaction is driven to completion. Invader[®] assay with dual-color FP detection may be a simple and rapid method for quantification of heteroplasmy in mitochondrial diseases.

Acknowledgments

This work was supported by Research on Eye and Ear Sciences from the Ministry of Health Labour and Welfare of Japan. This work was supported by a Fund for "Research for the Future" Program from the Japan Society for the Promotion of Science.

References

- [1] Newman NJ. Hereditary optic neuropathies. In: Miller NR, Newman NJ, editors. Walsh and Hoyt's clinical neuro-ophthalmology, vol. I. 5th ed. Baltimore: Williams and Wilkins; 1988. p. 741–73.
- [2] Brown MD, Wallace DC. Spectrum of mitochondrial DNA mutations in Leber's hereditary optic neuropathy. *Clin Neurosci* 1994;2:138–45.
- [3] Mackey DA, Oostra RJ, Rosenberg T, Nikoskelainen E, Bronte-Stewart J, Poulton J, et al. Primary pathogenic mtDNA mutations in multi-generation pedigrees with Leber hereditary optic neuropathy. *Am J Hum Genet* 1996;59:481–5.
- [4] Mashima Y, Yamada K, Wakakura M, Kigasawa K, Kudoh J, Shimizu N, et al. Spectrum of pathogenic mitochondrial DNA mutations and clinical features in Japanese families with Leber's hereditary optic neuropathy. *Curr Eye Res* 1998;17:403–8.
- [5] Schork NJ, Guo S-W. Pedigree models for complex human traits involving the mitochondrial genome. *Am J Hum Genet* 1993;1320–37.
- [6] Sato W, Hayasaka K, Komatsu K, Sawaisai Y, Sakemi K, Shoji Y, et al. Genetic analysis of three pedigrees of mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis, and stroke-like episodes (MELAS). *Am J Hum Genet* 1992;50:655–7.
- [7] Shoffner JM, Lott MT, Lezza AMJ, Seibel P, Bellingr SW, Wallace DC. Myoclonic epilepsy and ragged-red fiber disease (MERRF) is associated with a mitochondrial DNA tRNA^{Lys} mutation. *Cell* 1990; 61:931–7.
- [8] Holt IJ, Harding AE, Petty RKH, Morgan-Hughes JA. A new mitochondrial disease associated with mitochondrial DNA heteroplasmy. *Am J Hum Genet* 1990;46:428–33.
- [9] Tanuch Y, Christodoulou J, Feigenbaum A, Clarke JTR, Wherret J, Smith C, et al. Heteroplasmic mtDNA mutation (T-G) at 8993 can cause Leigh disease when the percentage of abnormal mtDNA is high. *Am J Hum Genet* 1992;50:852–8.
- [10] Smith KH, Johns DR, Heher KL, Miller NR. Heteroplasmy in Leber's hereditary optic neuropathy. *Arch Ophthalmol* 1993;111:1486–90.
- [11] Mashima Y, Saga M, Hiida Y, Oguchi Y, Wakakura M, Kudoh J, et al. Quantitative determination of heteroplasmy in Leber's hereditary optic neuropathy by single-strand conformation polymorphism. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1995;36:1714–20.
- [12] Holt IJ, Miller DH, Harding AE. Genetic heterogeneity and mitochondrial DNA heteroplasmy in Leber's hereditary optic neuropathy. *J Med Genet* 1989;26:739–43.
- [13] Vilkki J, Savontaus M-L, Nikoskelainen EK. Segregation of mitochondrial genomes in a heteroplasmic lineage with Leber hereditary optic neuroretinopathy. *Am J Hum Genet* 1990;47:95–100.

- [14] Bolhuis PA, Bleeker-Wagemakers EM, Ponne NJ, Van Schooneveld MJ, Westerveld A, Van den Bogert C, et al. Rapid shift in genotype of human mitochondrial DNA in a family with Leber's hereditary optic neuropathy. *Biochem Biophys Res Commun* 1990;170:994–7.
- [15] Howell N, Xu M, Halvorson S, Bodis-Wollner I, Sherman J. A heteroplasmic LHON family: tissue distribution and transmission of the 11778 mutation. *Am J Hum Genet* 1994;55:203–6.
- [16] Black GCM, Morten K, Laborde A, Poulton J. Leber's hereditary optic neuropathy: heteroplasmy is likely to be significant in the expression of LHON in families with the 3460 ND1 mutation. *Br J Ophthalmol* 1996;80:915–7.
- [17] Zhu D, Economou EP, Antonarakis SE, Maumenee IH. Mitochondrial DNA mutation and heteroplasmy in type I Leber hereditary optic neuropathy. *Am J Med Genet* 1992;42:173–9.
- [18] Juvonen V, Huoponen K, Syvanen A-C, Nikoskelainen E, Savontaus M-L. Quantification of point mutations associated with Leber hereditary optic neuropathy by solid-phase minisequencing. *Hum Genet* 1994;93:16–20.
- [19] Huoponen K, Juvonen V, Iitia A, Dahlen P, Siitari H, Aula P, et al. Time-resolved fluorometry in the diagnosis of Leber hereditary optic neuropathy. *Hum Mutat* 1994;3:29–36.
- [20] Ghosh SS, Fahy E, Bodis-Wollner I, Sherman J, Howell N. Longitudinal study of a heteroplasmic 3460 Leber hereditary optic neuropathy family by multiplexed primer-extension analysis and nucleotide sequencing. *Am J Hum Genet* 1996;58:325–34.
- [21] Shoffner JM, Lott MT, Lezza AMJ, Seibel P, Bellinger SW, Wallace DC. Myoclonic epilepsy and ragged-red fiber disease (MERRF) is associated with a mitochondrial DNA tRNA^{Lys} mutation. *Cell* 1990;61:931–7.
- [22] Lyamichev V, Mast AL, Hall JG, Prudent JR, Kaiser MW, Takova T, et al. Polymorphism identification and quantitative detection of genomic DNA by invasive cleavage of oligonucleotide probes. *Nat Biotechnol* 1999;17:292–6.
- [23] Hessner MJ, Budish MA, Friedman KD. Genotyping of factor V G1691A (Leiden) without the use of PCR by invasive cleavage of oligonucleotide probes. *Clin Chem* 2000;46:1051–6.
- [24] Hsu TM, Law SM, Duan S, Neri BP, Kwok PY. Genotyping single-nucleotide polymorphisms by the invader assay with dual-color fluorescence polarization detection. *Clin Chem* 2001;47:1337–73.
- [25] Nagano M, Yamashita S, Hirano K, Ito M, Maruyama T, Ishihara M, et al. Two novel missense mutations in the CETP gene in Japanese hyperalphalipoproteinemic subjects: high-throughput assay by Invader assay. *J Lipid Res* 2002;43:1011–8.
- [26] Olivier M, Chuang LM, Chang MS, Chen YT, Pei D, Ranade K, et al. High-throughput genotyping of single nucleotide polymorphisms using new biplex invader technology. *Nucleic Acids Res* 2002;30:e53.
- [27] Kwok P-Y. SNP genotyping with fluorescence polarization detection. *Hum Mutat* 2002;19:315–23.
- [28] Yamada K, Mashima Y, Hiida Y, Oguchi Y. DNA diagnosis of Leber's hereditary optic neuropathy performed at Keio University Hospital. *J Jpn Ophthalmol Soc* 2001;105:608–13.
- [29] Neville M, Selzer R, Aizenstein B, Maguire M, Hogan K, Walton R, et al. Characterization of cytochrome P450 2D6 alleles using the invader system. *BioTechniques* 2002;S34–43.
- [30] Eis PS, Olson MC, Takova T, Curtis ML, Olson SM, Vener TI, et al. An invasive cleavage assay for direct quantitation of specific RNAs. *Nat Biotechnol* 2001;19:673–6.
- [31] Hall JG, Eis PS, Law SM, Reynaldo LP, Prudent JR, Marshall DJ, et al. Sensitive detection of DNA polymorphisms by the serial invasive signal amplification reaction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000;97:8272–7.
- [32] Chinnery PF, Brown DT, Andrews RM, Singh-Kler R, Riordan-Eva P, Lindley J, et al. The mitochondrial ND6 gene is a hot spot for mutations that cause Leber's hereditary optic neuropathy. *Brain* 2001;124:209–18.

インベーター法を用いた緑内障の遺伝子解析

岩田 岳¹・真島 行彦²

国立病院東京医療センター臨床研究センター細胞・分子生物学研究室 室長¹
慶應義塾大学医学部眼科学教室 助教授²

緑内障は通常、眼圧の上昇により視神経が圧迫され、視神経萎縮をきたし、放置すると視野欠損を生じ、最後には失明にいたる眼疾患である。われわれは緑内障の早期診断・早期治療を目指し、遺伝性の緑内障に限って遺伝子変異や遺伝子多型を簡単に解析できる「緑内障遺伝子診断プレート」のプロトタイプを米国Third Wave社が開発したインベーター法（国内ではBML社が販売）を用いて完成させ、簡単な操作で多数の検体について既知の遺伝子変異あるいは遺伝子多型の検出が可能になった。本稿では眼科の分野で研究が遅れている遺伝子診断技術についてインベーター法を中心に考察する。

key
words

緑内障、眼圧、視神経、神経乳頭、遺伝子診断、遺伝子変異、
遺伝子多型、PCR、蛍光プレートリーダー、インベーター法

はじめに

緑内障は「視神経乳頭、視野の特徴的変化の少なくとも1つを有し、通常、眼圧を十分に下降させることにより視神経障害の改善あるいは進行を防止しうる眼の機能的構造異常を特徴とする疾患」と定義される（日本眼科学会誌107巻3号）。通常眼圧の上昇により視神経が圧迫され視神経萎縮をきたし、放置すると視野欠損を生じ、最後には失明にいたる眼疾患である。日本人成人の失明原因としては第2位の疾患である。40歳以上の有病率は約5%で、年齢

とともに有病率は増加しており、日本においては約200万人の患者が存在すると推測されている。しかしながら、緑内障患者は自覚症状が乏しいため、眼科を受診しているのはその1/3に過ぎない。眼圧上昇との関連性が長年示唆されてきたが、最近の調査によって、日本人には正常な眼圧をもちながら疾患にいたる患者が多数存在することが明らかとなり、視野検査、眼底検査、そして眼圧測定だけでは疾患の早期発見が難しい。

緑内障は、遺伝的要素と環境的因子の双方が発症に関係している多因子疾患（または多遺伝子疾患）

Takeshi Iwata¹・Yukihiko Mashima²

Laboratory of Cellular & Molecular Biology, National Institute of Sensory Organs, National Tokyo Medical Center,
Laboratory Chief¹

Department of Ophthalmology, School of Medicine, Keio University, Associate professor²

Molecular diagnostic of glaucoma using Invader technology

E-mail : iwataakeshi@kankakuki.go.jp

表1 緑内障遺伝子の染色体マッピング

遺伝子座	染色体部位	遺伝子	緑内障の型	遺伝形式	診断年齢(歳)
GLC1A	1q23-25	MYOC	JPOAG	常優	5~77
GLC1B	2cen-q13	不明	POAG	常優	>40
GLC1C	3q21-24	不明	POAG	常優	>40
GLC1D	8q23	不明	POAG	常優	
GLC1E	10p15-14	OPTN	NTG	常優	23~65
GLC1F	7q35-36	不明	POAG	常優	25~70
GLC3A	2p21	CYP1B1	PCG	常劣	<3
GLC3B	1p36	不明	PCG	常劣	<3

GLC1: 開放隅角緑内障, GLC2: 閉塞隅角緑内障, GLC3: 先天緑内障
 JPOAG: Juvenile primary open-angle glaucoma 若年性開放隅角緑内障
 POAG: Primary open-angle glaucoma 開放隅角緑内障
 NTG: Normal-tension glaucoma 正常眼圧緑内障
 PCG: Primary congenital glaucoma 先天緑内障
 (Human Genome Organization/Genome Database Nomenclature Committeeによる
 GLC分類)

と考えられている。現在、緑内障の危険因子として明らかなのは高眼圧と家族歴である。以前から、緑内障患者の30~50%に家族性のあることが広く知られていた。疫学調査で緑内障発症の相対危険度は、近親に緑内障患者がいると2.85倍と報告されている。緑内障患者のうち、実際に眼科を受診しているのはその1/3に過ぎないという現状を考えると、遺伝子検査により遺伝子変異が検出されれば、発症前に緑内障発症の危険因子を知ることになり、今後の管理・治療・予防の点で有用な情報となりうることを期待される。

今回われわれは緑内障の早期診断・早期治療を目指し、遺伝性の緑内障に限って遺伝子変異や遺伝子多型を簡単に解析できる「緑内障遺伝子診断プレート」のプロトタイプを米国Third Wave社が開発したInvader法(国内ではBML社が販売)を用いて完成させ、簡単な操作で多数の検体について既知の遺伝子変異あるいは遺伝子多型を解析することが可能となった。本稿では眼科の分野で研究が遅れている遺伝子診断技術についてインバーダー法を中心に考察する。

1. 緑内障の原因遺伝子

緑内障は大きく原発開放隅角緑内障, 原発閉塞隅角緑内障, 先天性緑内障に分類されているが、このなかには遺伝的な原因によって生じるものが約20%含まれており、開放隅角緑内障の明らかな発症因子ともいべき緑内障遺伝子(常染色体優性遺

伝形式)は、現在少なくとも6個その存在が染色体上に確認されている(表1)。このうち3つの遺伝子が同定されており、原因が特定できる緑内障として世界中で盛んに研究が行われている。

1. ミオシリン(Myocilin: MYOC)

緑内障発症の直接的な原因は長年不明のままであったが、1997年Stoneらによって、それまでTIGR(タイガー)と呼ばれていた線維柱帯細胞で発見されたステロイド感受性のタンパク質が開放隅角緑内障の原因であることが報告された。後に窪田らがクローニングしたミオシリン(Myocilin)遺伝子

と同一のものであることが判明し、遺伝子名登録機関であるHUGOに登録済みであったが、ミオシリンが正式な遺伝子名として定着した。ミオシリンによる発症は、特に若年(35歳以前)の開放隅角緑内障患者に比較的多く(約36%)遺伝子変異がみられるが、全年代を含めた開放隅角緑内障患者では約4%に遺伝子変異がみられる。表2に、日本人緑内障患者に報告されたミオシリン変異を記載した。

2. チトクロームP4501B1(CYP1B1)

先天異常である先天緑内障は常染色体劣性遺伝形式で、多くは出生時、または少なくとも出生後1年以内に発症する疾患である。原発先天緑内障に関しては、1番染色体と2番染色体の2カ所に疾患遺伝子(それぞれGLC3BとGLC3A)が存在しており、GLC3Aは1997年に薬物代謝酵素関連のチトクロームP4501B1(遺伝子記号はCYP1B1)が明らかになった。先天緑内障の発症頻度は、欧州では5000人から22000人に1人、中近東では2500人に1人、スロバキアのジブシーでは1250人に1人と、地域によりかなり異なる。中近東やスロバキアのジブシーでは、先天緑内障が失明の上位を占める。日本においては、先天緑内障の発症頻度は不明である。先天緑内障の多くは家族歴がみられないが、約10%に常染色体劣性遺伝の家系が報告されている。外国では両親が血族結婚でみられることが多いが、日本において現在血族結婚はまれであり、両親が異なる変異をもつ保因者である場合がほとんどである。

われわれは、日本人の先天緑内障患者における

表2 日本人開放隅角緑内障のMYOC変異

変異	診断時年齢(歳)	家族歴	文献
Ile 360 Asn	59	+	日眼 106 : 201, 2002
Ala 363 Thr	32	+	Hum Mut 16 : 270, 2000
Gly 367 Arg	29,36,45	+	Jpn J Ophthalmol 44 : 445, 2000
Pro 370 Leu	13,26	+	Jpn J Ophthalmol 43 : 80, 1999
Thr 448 Pro	32,35,42	+	Jpn J Ophthalmol 43 : 85, 1999
Ile 465 Met	?	?	Hum Mol Get 8 : 899, 1999
多型の可能性		文献	
Arg 46 Stop	Hum Mut 16 : 270, 2000	Clin Genet 59 : 263, 2001	
Arg 158 Gln	Hum Mut 16 : 270, 2000	Clin Genet 59 : 263, 2001	
Asp 208 Glu	Hum Mut 16 : 270, 2000	Clin Genet 59 : 263, 2001	
Thr 353 Ile	Hum Mol Get 8 : 899, 1999	IOVS 41 : 1386, 2000	
Pro 481 Ser	Clin Genet 59 : 263, 2001		

表3 日本人の先天緑内障患者にみられたCYP1B1遺伝子変異(文献1より)

家系数	塩基変化(塩基番号)	アミノ酸変化(コドン番号)
3	4776 insAT/G7927A	Frameshift/ Val 364 Met
1	A4380T/A4380T	Asp 192 Val/Asp 192 Val
1	A4380T/G7927A	Asp 192 Val/Val 364 Met
1	G4793T, C4794T/G7927A	Ala 330 Phe/Val 364 Met
1	G7927A/G8168A	Val 364 Met/Arg 444 Gln
1	3964 del C/G8168A	Frameshift/Arg 444 Gln
1	C4645A/G8168A	Cys 280 stop/Arg 444 Gln
2	C3130T/G4763T	Unknown/Val 320 Leu
1	G4397A/Unidentified	Val 198 Ile/Unidentified
1	A8333G/Unidentified	Glu 499 Gly/Unidentified

13家系

表4 緑内障遺伝子OPTN変異(文献2より)

Exon		Glaucoma	Normal
4	Glu 50 Lys	7/52 (13.5%)	0/540
6	InsAG (Premature stop)	1/46 (2.2%)	0/200
16	Arg 545 Gln	1/46 (2.2%)	0/100
危険因子			
5	Met 98 Lys	23/169 (13.6%)	9/422 (2.1%)

CYP1B1遺伝子変異を検討したが、65家系中13家系(20%)に日本人特有の11種類の新しい変異が確認された(表3)。今回の日本人患者では血縁結婚はみられず、13家系中ホモ変異は1家系のみであり、ほかは複合ヘテロ変異であった。興味あることに、11種類の変異のうち、Val364Met変異は9人中6人に確認された。ハプロタイプは調べていないが、同一の祖先から出てきた可能性(創始者変異)も考えられる。

3. オプチニューリン

(Optineurin : OPTN)

2002年に発見された最も新しい緑内障遺伝子としてオプチニューリン(遺伝子記号はOPTN)がある。米国では家族性の正常眼圧緑内障家系の17%に遺伝子異常がみられたと報告されている(表4)。この遺伝子についての最初の論文では複数の遺伝子変異が報告されていたが、世界中でこれを追試した結果、アミノ酸番号50番の変異と核酸番号691番の2塩基挿入による変異以外はすべて正常者にも観察されるアミノ酸の変化を伴う遺伝子多型であることが判明した。最近の報告では日本人緑内障患者の300人に1名しか、この遺伝子に変異がないことが報告されている。しかしながら、この遺伝子の変異によって確実に正常眼圧緑内障が発症することから、患者数の多いわが国で詳細な研究が望まれている。

4. その他の緑内障遺伝子

開放隅角緑内障において少なくとも6個の緑内障遺伝子が存在するということは、緑内障患者の30~40%は遺伝的要因が強いといえる。若年発症の開放隅角緑内障患者でミオシリン遺伝子変異をもつ家系では、家族内での発症患者は、メンデルの遺伝形式に従い約50%の発症率がみられる。しかしながら、40歳以降に発症した開放隅角緑内障患者でミオシリン遺伝子変異をもっているにもかかわらず発症しない人もいて、発症には環境因子や遺伝子多型が影響する場合も考えられる。

II. 緑内障の遺伝子診断

1. 感覚器臨床研究センターの発足

国立病院東京医療センター・臨床研究センターは感覚器疾患の専門研究機関として2003年度に発足し、研究事業の一環として慶應義塾大学医学部眼科学教室と共同で遺伝子診断システムの構築を開始した。全国から集まる多数のDNA検体について、これを解析するためには、これまでに利用し

てきたSSCP (single strand conformation polymorphism) 法やダイレクトシーケンス法をベースにした方法では、労働力、時間、コストの面で不相当と考えた。既知遺伝子変異あるいは既知遺伝子多型を正確にそして迅速に検出する新たな方法を市場で紹介されている技術の中から選択することにした。

2. 市場で紹介された主な遺伝子診断法

遺伝子診断システムについては市場で多数紹介されている方法をすべて検討し、そのなかから将来的に有効と思われる方式について、さらに検出感度、工程数、検出装置の価格、試薬の価格、試薬の安定性、新たな遺伝子変異・多型の追加の容易性、他疾患での診断実績、受託サービスを含む販売会社のサポート体制などについて検討を行った。現在市場には多数の遺伝子変異検出法が紹介されているが [GeneChip (Affymetrix社), Invader (Third Wave Technologies社), Sniper (Amersham Biosciences社), SNP-IT (Orchid Bioscience社), TaqMan-PCR (Applied Biosystems社), Pyro Sequencing (Pyrosequencing AB社), DNA Mass Array (Sequenom社), MALDI-TOF (Bruker社), ECA Chip (TUM研究所), Dynamic Allele Specific Hybridization (Thermo Electron Corporation社)], 評価の対象となった検出法は実績があり、一般の病院に普及させることを考えて、検出器の価格が1千万円を超えるものについては対象外とした。

(1) 一塩基伸長法による遺伝子解析

ガラススライドにオリゴDNAをスポットして一塩基伸長法によって遺伝子変異を検出する方法としては、Asper Biotech社 (www.asperbio.com) のAPEX法やOrchid Biosciences社 (www.orchid.com) のSNP-IT法などがある。特にSNP-IT法は384穴プレートからガラススライドまで検体数に応じて複数の支持体を利用することができる。販売当初は桑和貿易からキットや検出器の販売が行われたが、現在は受託サービスのみとなっている。APEX法の特徴としては、スライドをエストニア (旧ソ連) で製造しているために安い人件費と高い技術力で先進国よりもコストが安く抑えられている。1万以上の変異オリゴDNAを1枚のスライドガラス上に

スポットして検出することに成功している。

(2) WAVEによる遺伝子解析

Transgenomic社 (www.transgenomic.com) が販売する液体クロマトグラフィー (denaturing high performance liquid chromatography : DHPLC) を基本とした検出法である。ヘテロタイプの遺伝子変異である場合、患者DNAのPCR産物をいったん一本鎖に分離して再びハイブリダイゼーションさせたときに生じるヘテロドゥープレックスについて温度を調整しながら逆相カラムで分離することにより、部分的に解離した二本鎖DNAがその塩基配列に特有なパターンで分離される。PCR産物を液体クロマトグラフィーに流すだけなので、紹介する検出法のなかでは最も維持費がかからない方法である。未知遺伝子変異や遺伝子多型の検出に特に適しているが、変異の塩基配列の情報はSSCPと同様に得られない。

(3) 一分子蛍光検出法による遺伝子解析

一分子蛍光検出法 (single molecule fluorescence detection) は蛍光励起用のレーザー光を開口数の大きな対物レンズで細く絞り、試料中に点状の微小光照射領域を作り、試料の濃度を調整することによって、この微小領域に1つの蛍光標識した分子しか観察できないようにする。この分子はブラウン運動によって激しく振動するが、これに他の分子を結合すると分子量が増加し、振動数が大幅に減少する。蛍光標識されたオリゴDNAと患者DNAのPCR産物が相補的に結合すると、ブラウン運動が鈍化し、結合したことが検出される。この方法はDNA検体のPCRを必要とするが、遺伝子変異あるいは遺伝子多型別に用意されたオリゴDNAとPCR産物を混合するのみで検出が可能であるため、大量の検体を同時に解析することが可能である。この方法を開発したノバスジーン社 (www.novus-gene.co.jp) は検出器と検出キットの販売だけでなく、受託サービスも行っている。

(4) インベーター法による遺伝子解析

インベーター法は唯一PCRを不要とする遺伝子検出法で、米国 Third Wave Technologies社 (www.twt.com) が開発した方法である。遺伝子変異の塩基配列をもつインベーターオリゴDNAとプ

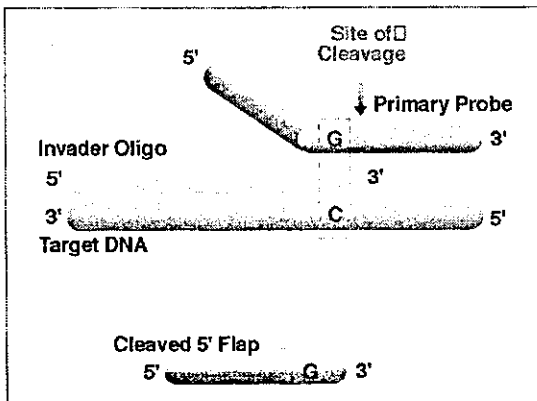


図1 インベーターオリゴDNAとプライマリープローブDNAがターゲットDNAと三重らせんを形成し、フラップが切断される

プライマリープローブオリゴDNAそしてゲノムDNAが複雑に96穴ウェル内で反応して、3重らせんDNAを形成し、これを認識してプライマリープローブが切断される(図1)。切断されて遊離したプライマリープローブはFRETカセットと呼ばれるオリゴDNAと結合して再び3重らせんDNAを形成する(図2)。FRETカセットには蛍光と蛍光を吸収するクエンチャーが近接しており、蛍光がクエンチャーによって吸収されるために発光しないが、3重らせんDNAが再び形成されると蛍光とクエンチャーの間が切断されて蛍光が遊離され、クエンチャーの影響を受けなくなるために発光が観察されるようになる。反応に必要な検体DNAと水以外の各種オリゴDNAと酵素類は乾燥した状態で各ウェルの底に封入して保存することができる。このために疾患別あるいは遺伝子別に診断用96穴プレートを作製して、測定時にプレートを開封して検体DNAと水を加えるだけで解析することができる。

Ⅲ. インベーター法検出プロトコール

インベーター法の具体的な操作法は図3のとおりである。インベーター法による臨床検査についてはBML社が国内販売権を所有している。われわれは、この方式に基づいて緑内障遺伝子ミオシリン、チトクロムP4501B1およびオブチニューリンについて、日本人で発見された合計20の遺伝子変異を選択して、これを検出する世界で初めての緑

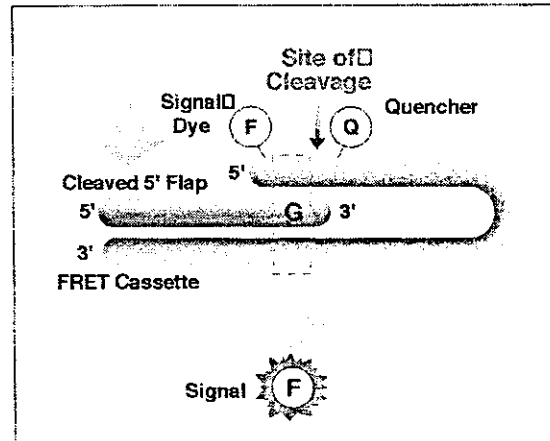


図2 切断されたフラップDNAはFRETカセットDNAと三重らせんを再び形成して切断されて蛍光色素とクエンチャーが離れて発光する

内障遺伝子診断用プレートの開発を行った。この開発については2003年7月に日経バイオテックなどで報道され、多くの臨床医の先生方に興味をもっていただいたが、インベーター法や一塩基伸長法にも欠点は存在する。それはオリゴDNAと患者DNAが結合する際に、オリゴDNAの範囲内に変異が存在した場合には結合が不十分なために反応が起こらず、結果が得られないことである。この問題を解決するために、遺伝子エクソン内のすべての塩基配列について検出できるようにプローブを作製しなければならない。

おわりに

最近、岐阜県多治見市(人口106,000人)で行われた、日本緑内障学会多治見市疫学調査による受診者の調査(3021人、参加率78%)によると、40歳以上の5.8%にあたる人が原発開放隅角緑内障であることが判明し、このなかで正常眼圧緑内障が60%以上と、世界的にも類をみないほど正常眼圧の患者が多いことが判明した。視野測定、眼圧測定そして眼底観察などの診断に加えて遺伝子診断が簡単に行えるようになれば、今後の診断に大いに助けとなると考えられる。しかしながら、癌や糖尿病など患者数の多い国民病については順調に遺伝子診断法の開発が行われているが、眼科の分野については企業側の情報不足によってその重要

図3 インベーター法のプロトコール (96well Wet Format)

1. Invader Biplex 96-well Plateのレイアウトを決める (次ページ参照)
2. ゲノムDNAを95℃で10分間インキュベートする
3. Probe/Cleavase/MgCl₂ mixを作る

Solution	1 反応あたりの量 (ul)
PPI mix	3.0
FRET Buffer	3.5
Cleavase XI / MgCl ₂	1.0
Total	7.5

4. 3で作った Probe/MgCl₂ mixを Invader Biplex 96well Plateに7.5ul/well入れる
5. 2のゲノムDNAまたはコントロール用合成オリゴヌクレオチドをInvader Biplex 96well Plateに7.5ul/well (ゲノムDNA:15ng/ul,約100ng/7.5ul/well) 入れる
6. ミネラルオイルを Invader Biplex 96well Plateに15ul/well入れる
7. ヒートブロックまたはサーマルサイクラーで63℃で4時間インキュベートする
8. 蛍光プレートリーダーで以下の波長を用い測定する

	Wavelength/Bandwidth
FAM	Excitation 485nm/20nm
	Emission 530nm/25nm
RED	Excitation 560nm/20nm
	Emission 620nm/40nm

9. 以下の基準で判定する
判定基準

判定	Allelic Ratio	FOZ
Allele 1 (FAM) Homozygous	>=4.0	FAM FOZ>=1.6
Equivocal-1	>2.5 to <4.0	
Allele 1 and 2 Heterozygous		>=0.4 to <=2.5
FAM (RED) FOZ>=1.3		
Equivocal-2	>0.25 to <0.4	
Allele 2 (RED) Homozygous	<=0.25	RED FOZ>=1.6

$$\text{Allelic Ratio} = \frac{(\text{FAM Raw Counts} / \text{FAM NTC Raw Counts}) - 1}{(\text{RED Raw Counts} / \text{RED NTC Raw Counts}) - 1}$$

$$= \frac{(\text{FAM FOZ}) - 1}{(\text{RED FOZ}) - 1}$$

$$= \frac{\text{NET FAM FOZ}}{\text{NET RED FOZ}}$$

注) NET FAM (RED) FOZが、0以下のときはNET FAM (RED) FOZを0.01として計算する
FOZ: Fold Over Zero, NTC: No Target Control

性が十分に知られておらず、開発が遅れている。

これまでに発見された多数の遺伝性眼疾患の変異については日本人と欧米人ととの比較が行われているが、位置やその頻度について異なる場合が多く、米国を中心とした遺伝子変異の情報が必ずしも日本人に当てはまらないケースが多い。今回構築中の症例登録システム、遺伝子診断システム、そしてデータベースシステムは日本人の遺伝子解析を目的としており、遺伝子診断システムについても日本人で発見された既知遺伝子変異や既知

遺伝子多型が中心となる。より多くの研究室そして診療病院で臨床医が正確にそして簡単に遺伝子解析ができることを目標に、利用可能な方式のなかからインベーター法を選択したが、この分野での進歩は凄まじいものがあり、より正確に、より少ないDNA量で、より早く、そして安価に解析できる装置が今後開発されていくと考えられる。

インベーター法は96穴プレートの各ウェルがそれぞれ1変異に対応しており、塩基配列が一致した場合にのみ発光する、極めてわかりやすい測定法である。希釈した患者ゲノムDNAと水を加えて、反応を開始して、検出は簡単な蛍光プレートリーダーで検出することができる。この操作性の良さは自動化を可能とし、臨床の現場で使用できる診断装置に成長させることが期待される。

参考文献

- 1) Mashima Y, et al: IOVS 42, 2211-2216, 2001.
- 2) Rezaie T, et al: Science 295, 1077-1079, 2002.
- 3) Izumi K, et al: Ophthalmic Res 35, 345-350, 2003.
- 4) Obazawa M, et al: IOVS (in press)

著者プロフィール

岩田 岳:

1988年名城大学農学部大学院博士課程卒業。1988年Visiting Fellow, National Eye Institute, NIH。網膜色素変性症の遺伝解析を行う。1989年Research Associate, Bascom Palmer Eye Institute。1991年Visiting Associate, National Eye Institute, NIH。1995年Visiting Scientist, National Eye Institute, NIH。糖尿病性網膜症に関係するソルビトール経路(アルドース還元酵素とソルビトール脱水素酵素)の転写・シグナル伝達の仕事に携わる。1999年～現在、国立病院東京医療センター臨床研究センター細胞・分子生物学研究室長。緑内障と加齢黄斑変性の原因解明と早期診断法の開発に力を注いでいる。今回紹介した研究内容は厚生労働省感覚器障害研究事業の一環として行われた。

無散瞳眼底写真による緑内障スクリーニング精度と教育効果

兼田英子 大竹雄一郎 奥田恵美 木村 至 谷野富彦 真島行彦 小口芳久

慶應義塾大学医学部眼科学教室

Accuracy and Educational Effect of Glaucoma Screening by Non-Mydriasis Fundus Photography

Eiko Kaneda, Yuichiro Ohtake, Emi Okuda, Itaru Kimura, Tomihiko Tanino, Yukihiko Mashima and Yoshihisa Oguchi

Department of Ophthalmology, Keio University School of Medicine

目的：緑内障の早期発見を目的とする写真判定スクリーニングの社会的要請は高く、また医療経済的にもその精度が重要である。今回筆者らは、内科医・眼科研修医・緑内障専門医の眼底写真スクリーニング精度、および眼科研修医に対する教育学習効果について検討した。方法：健診で緑内障を疑われて当科を受診した症例から20眼を選び、眼底写真のデジタルプレゼンテーションを作成した。内訳は、健常眼11眼、正常眼圧緑内障6眼、開放隅角緑内障3眼である。方法1として、判定者は内科医・眼科研修医(2年目)・眼科専門医・緑内障専門医とし、CRT(ディスプレイ)モニターで眼底写真を最大20秒提示し緑内障性変化を判定させた。方法2として、研修を始めたばかりの眼科研修医10人に対して、3、4、6、7カ月目の計4回行い、うち4カ月目と7カ月目は緑内障専門医による視神経乳頭判定の教育を受けた直後とした。また、判定者は各判定後に正答を知らされていない。結果：感度は、内科医で83.3%と最も高かったが、特異度は緑内障専門医・眼科専門医・研修医の順で、内科医に比べて有意に高かった。また、1年目の眼科研修医のスクリーニング感度は、3カ月で67.8%、4カ月91.1%、6カ月74.4%、7カ月95.6%、特異度はそれぞれ52.7%、57.3%、73.6%、91.8%であった。感度は、乳頭判定教育を受けた直後に上昇したが、特異度については臨床経験に応じて上昇する傾向にあった。健常者を診るという臨床経験が特異度の向上に重要であると考えられた。最終的には、緑内障専門医とほぼ同等の精度となった。結論：眼底写真判定の緑内障スクリーニング精度および教育効果を判定するうえで、デジタルプレゼンテーションを用いたシミュレーションが有用であった。またスクリーニング効率を上げるためには、緑内障専門医による反復教育と臨床経験が重要である。

Purpose: Glaucoma screening by fundus photography is highly valued; its accuracy is also economically important. We investigated the screening accuracy of physician, ophthalmic residents, and glaucoma specialists, and examined the efficiency of screening training for ophthalmic residents. Methods: We selected 20 eyes of patients who consulted an ophthalmologist at our hospital after being diagnosed with possible glaucomatous cupping on health check. Of the 20 eyes, 11 were normal, 6 had normal-tension glaucoma, and 3 had primary open-angle glaucoma. Digital slides were prepared from the fundus photographs of these eyes. In method 1, a physician, second-year ophthalmic residents, ophthalmologists, and glaucoma specialists judged glaucomatous changes after fundus photographs were presented on a CRT (cathode ray tube) monitor for a maximum of 20 seconds. In method 2, the same experiment was repeated with 10 first-year ophthalmic residents four different times, at periods of 3, 4, 6 and 7 months. The 4- and 7-month experiments were performed immediately after the residents had received a lecture from a glaucoma specialist on detecting optic disc cupping. None of the judges were offered correct answers. Results: The sensitivity of the physician was 83.3% and was the highest. However, specificity was significantly higher in glaucoma specialists, ophthalmologists, and second-year residents, in descending order, compared to the physician. The sensitivity of the first-year residents was 67.8%, 91.1%, 74.4%, and 95.6%, and the

【別刷請求先】 兼田英子：〒160-8582 東京都新宿区信濃町35 慶應義塾大学医学部眼科学教室

Reprint requests: Eiko Kaneda, M.D., Department of Ophthalmology, Keio University School of Medicine, 35 Shinanomachi, Shinjuku-ku, Tokyo 160-8582, JAPAN

specificity values were 52.7%, 57.3%, 73.6%, and 91.8% at 3, 4, 6, and 7 months, respectively. Sensitivity increased just after the first-year residents received the glaucoma detection lecture; however, specificity increased as their clinical experience increased. Numerous experiences observing normal eyes seemed to improve specificity. Ultimately, the accuracy of detection approximated that of the glaucoma specialists. Conclusion: Simulation using digital slides was effective for judging both the accuracy of glaucoma screening and the efficiency of educational training. To improve screening efficiency, repeated lectures from specialists, as well as adequate clinical experience, are required.

[Atarashii Ganka (Journal of the Eye) 21 (2): 261~264, 2004]

Key words: 緑内障スクリーニング, 眼底写真, シミュレーション, 精度, 教育効果, glaucoma screening, fundus photography, simulation, accuracy, educational effect.

はじめに

1988~1989年にわが国で実施された緑内障疫学調査では、40歳以上に占める緑内障有病率は3.56%と報告された¹⁾。また、2000~2001年に実施された多治見スタディでは、40歳以上に占める緑内障有病率は約5.78%であり、開放隅角緑内障のうち9割以上が正常眼圧緑内障であったと報告されている。このように、緑内障の早期発見を目的とする写真判定スクリーニングの社会的要請は近年高まっており、また、医療経済の見地からもその精度が重要となる²⁾。現時点では傑出したスクリーニング機器はなく、これまでは、眼底写真以外に細隙灯顕微鏡検査、眼底検査、眼圧、視野検査などを施行し総合的に判定しているところが多い^{3~10)}。さらに、視野異常よりも視神経乳頭の変化のほうが早期に出現すること^{11,12)}、日本人では正常眼圧緑内障が多いこと¹⁾から、検診による緑内障スクリーニングには眼圧よりも視神経乳頭の評価のほうが重要とされる^{5~10)}。どの時点で緑内障と診断・検出するのが良いかはいまだ統一した見解はないが、健診という条件下での簡便性および早期発見の点からも、現時点では眼底写真による視神経乳頭判定が妥当である考えられる。

今回、筆者らは患者の眼底写真よりデジタルプレゼンテーションを作成し、緑内障スクリーニングシミュレーションを行い、内科医・眼科研修医(2年目)・眼科専門医・緑内障専門医の写真判定スクリーニング精度を比較した。また、本シミュレーションを用いて眼科研修医に対する教育効果について検討した。

I 対象および方法

検診で緑内障疑いと指摘されて当科を受診した症例から20例20眼を抽出し、眼底写真よりデジタルプレゼンテーション用スライドを作成した。その内訳は、正常眼圧緑内障6眼、開放隅角緑内障3眼、健常眼11眼である。これらをCRT(ディスプレイ)モニターで最大20秒提示して、各検者に緑内障性変化の有無を判定させ、確定診断と一致する割合、すなわちスクリーニング精度を検討した。

1. 判定者によるスクリーニング精度の違い

判定者を緑内障専門医3名、眼科専門医8名、眼科研修医(2年目)13名、内科医6名とし、緑内障スクリーニングシミュレーションを行った。医師としての経験年数は、緑内障専門医6~15年、眼科専門医6~10年、内科医3~11年であった。スクリーニング精度の指標として、感度、特異度、陽性尤度比(likelihood ratio)を求めた。陽性尤度比は、感度/(1-特異度)で定義され、スクリーニング後の健常人1人に対する緑内障患者の割合を示す。感度・特異度についてはFisher's exact probability testで統計学的に検討し、 $p < 0.05$ を有意とした。

2. 眼科研修医に対する視神経乳頭判定教育の効果

判定者を眼科研修医をはじめばかりの研修医10名とした。シミュレーション時期は、研修開始後3カ月目、4カ月目、6カ月目、7カ月目の4回である。このうち、4カ月目と7カ月目は緑内障専門医による視神経乳頭判定教育の直後である。また、判定者は各シミュレーション後に正答を知らされていない。統計学的検討はpaired *t*-testを用い、2群間多重比較であるためにBonferroniの方法による補正を加えて判定した。

研修医の視神経乳頭判定教育は、以下の内容であった。

陥凹と乳頭辺縁部については、血管走行の変化に着目しrimの形状の不規則性、cupの大きさ・形状・C/D比(乳頭陥凹比)(水平よりも垂直方向を重視)、に注意する。特に視神経乳頭の耳側上下方の象限のrim変化に注目して緑内障性変化を判定し、乳頭線条出血、網膜神経層欠損(near fiber layer defect: NFLD)と相関していれば緑内障の疑いが強まるとした^{3,6)}。

II 結 果

1. 判定者によるスクリーニング精度の違い

各判定医の判定精度を表1に示す。感度には有意差を認めなかったが、特異度においては内科医と眼科医各群の間で有意差を認めた。また、緑内障専門医と眼科研修医(2年目)の間にも有意差を認めた($p < 0.05$)。内科医では、感度はや

表 1 判定者による精度の差

	緑内障専門医	眼科専門医	眼科研修医	内科医
平均正答数	17.3	15.9	15.7	13.7
感度%	77.8	69.4	76.0	83.3
特異度%	93.9**	87.5**	80.4*	56.0
陽性尤度比	12.8	5.5	3.9	1.9

内科医に比べ特異度は有意に高かった(** p<0.01, * p<0.05).

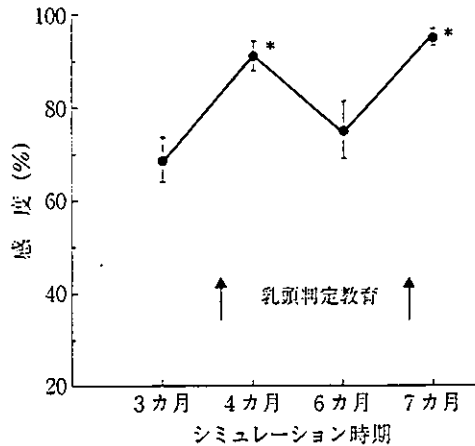


図 1 研修医の緑内障スクリーニング感度
Error bar は標準誤差 (SE) を示す。* p<0.01.

や高いものの特異度が低く、乳頭陥凹を過大評価する傾向があると考えられた。陽性尤度比は、緑内障専門医で12.8と最も高く、眼科研修医の3倍、内科医の6倍であった。

2. 眼科研修医に対する視神経乳頭判定教育の効果

結果を図1, 2に示す。感度、特異度のいずれにおいても、全体的に経時的な向上がみられた。特に感度については、視神経乳頭判定教育を受けた直後(4カ月, 7カ月)には有意に上昇した(図1)。しかしながら、特異度に関しては、1回の教育だけではあまり変化なく、2回目の教育後、すなわち7カ月目には有意に上昇した(図2)。最終的には感度95.6%、特異度91.8%となり、1年目の眼科研修医でも緑内障専門医とほぼ同等となった。

III 考 察

緑内障の確定診断には緑内障性乳頭陥凹とそれに相当する視野異常を証明することが不可欠であるが、一次スクリーニングとして全例に視野閾値検査を行うことは測定時間が長く不可能である⁷⁾。近年、Frequency Doubling Technology (FDT) 検査が、短時間で測定できることから、緑内障スクリーニングとして注目されている^{13,14)}。しかしながら、スクリーニング機器としてはやや高価であり、FDTの異常が必ずしもHumphrey視野と一致しない点^{13,14)}、緑内障極早期の小さな暗点が検出できず検出率が劣る点¹⁵⁾など、まだ一般検診に普及するには至らず、現時点では眼底検査、乳頭鏡

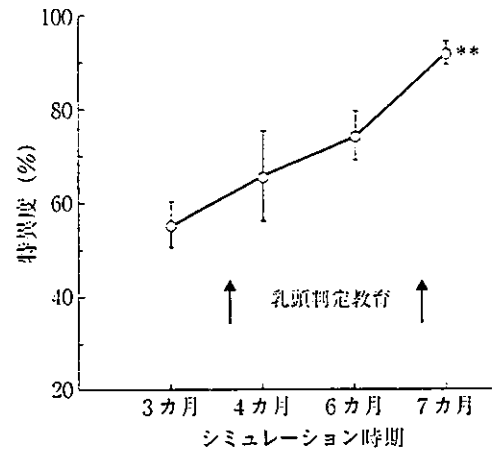


図 2 研修医の緑内障スクリーニング特異度
Error bar は標準誤差 (SE) を示す。** p<0.001.

察を併せて行う必要がある^{13,14)}。一方、無散瞳眼底撮影による写真判定は簡便であり、いわゆる人間ドックを含めた一次緑内障スクリーニングとして広く普及している。しかし、現状の問題点として、眼底写真判定のスクリーニング精度は、判定医ごとの力量に大きく左右されることがあげられる^{2,1)}。今回の検討では、シミュレーションという特殊な状況下ではあるが、陽性尤度比をみると、緑内障専門医が最も高く、眼科専門医、眼科研修医、内科医の順であった。以上から、熟練した眼科医による眼底写真判定が最も妥当なスクリーニング方法であることが確認された。

今回の結果を踏まえて、1,000名が検診にて眼底写真判定を受けたと想定した場合、緑内障専門医と内科医のスクリーニング効率を試算してみた。受診者の緑内障有病率が4%と仮定すると、緑内障専門医は88名を緑内障疑いと判定し、うち真の緑内障患者は32名となる。一方、内科医は455名を緑内障疑いと判定し、うち真の緑内障患者は33名となる。結果として内科医は緑内障患者は1人多く検出できるが、400人以上の偽陽性患者が含まれることになり、二次検査にかかる医療経済的効率が大きく異なる。

眼底の緑内障性乳頭変化は、視野変化に先行して現れることが指摘されており^{11,12)}、緑内障スクリーニングにおける視神経乳頭評価の重要性が唱えられている^{3,5-10)}。検診において、どの時点で緑内障と判断すべきであるかについては統一した見解はないが、早期発見という観点と、経済面、検査の簡便性を考慮すると、現在広く普及している無散瞳眼底写真判定の精度を上げることが重要であり、的確に判定できる眼科医を多く育てることが必要と考えられる。そこでつぎに、眼科研修をはじめばかりの研修医に対して、本シミュレーションを行ってその教育学習効果を検討した。

緑内障専門医による乳頭判定教育を受けた直後には、有意に感度が向上した。ただし、一度の教育だけでは特異度には

変化はなく、かえって過剰に緑内障と診断する傾向があった。つまり、臨床経験が少ない時点での生半かな知識では、視神経乳頭陥凹を過大評価することが推察され、健常者を診るといふ臨床経験が特異度の向上に重要であると考えられた。また、6カ月目のシミュレーションで感度がやや低下したことから、一度の教育効果は2カ月も持続せず、くり返しの教育が重要であると考えられた。2回目の教育後には感度・特異度ともに有意に上昇し、1年目の眼科研修医でも、緑内障専門医とほぼ同等の感度、特異度となった。ただし、今回のシミュレーションでは研修医教育の見地から、判定に苦慮する高度近視や傾斜乳頭は除外したため、実際の緑内障スクリーニング精度は本結果よりも若干低くなることが予想されるが、研修医も的確な教育と臨床経験を積めば、比較的短期間に緑内障専門医と同等のスクリーニング精度を習得できると考えられた。

筆者らの渉猟するかぎり、緑内障スクリーニングに対する眼科研修医の教育方法についての報告はない。今回報告した、デジタルプレゼンテーションを用いた研修医教育は有用であると考えられる。今後症例数を増やし、反復自己学習できるような教育用眼底写真シミュレーションの構築を目指したい。

本論文の要旨は、第107回日本眼科学会総会で発表した。

文 献

1) Shiose Y, Kitazawa Y, Tsukahara S et al : Epidemiology of glaucoma in Japan — A nationwide glaucoma survey. *Jpn J Ophthalmol* 35 : 133-155, 1991

2) 塚原重雄, 細田源浩 : 緑内障の疫学—失明原因第3位. *あたらしい眼科* 16 : 893-898, 1999

3) 塩瀬芳彦, 小室邦子, 伊藤照子ほか : 新しい緑内障集団検診システム. *臨眼* 34 : 509-517, 1980

4) 片倉富芳, 斎藤久子, 村松 歩, 中西克朗 : 人間ドックにおける眼科診察の意義. *日本人間ドック会誌* 12 : 313-317, 1997

5) 兩宮哲士, 関 希和子, 笹森典雄ほか : 当院人間ドックにおける緑内障検診の特異性. *健康医学* 12 : 92-94, 1997

6) 木村奈都子, 林 裕美, 大越洋治ほか : 人間ドックにおいて眼底所見から正常眼圧緑内障が疑われた症例について. *眼臨* 92 : 516-519, 1998

7) 宮内 修, 伊藤 彰, 佐野信昭ほか : 人間ドックにおける緑内障のスクリーニングテスト. *臨眼* 52 : 1151-1154, 1998

8) 日比野佐和子, 大鳥安正, 渡辺 仁ほか : 人間ドックにおける緑内障検診の検討. *眼紀* 52 : 652-655, 2001

9) 荻原智恵, 奥川加寿子, 井上賢治ほか : 人間ドックにおける緑内障の有病率. *あたらしい眼科* 19 : 521-524, 2002

10) 岡田真弓, 塚本秀利, 高松倫也ほか : 広島県御調町における眼科検診. *臨眼* 56 : 871-873, 2002

11) 岩田和雄 : 原発開放隅角緑内障の初期病態. *臨眼* 39 : 407-424, 1985

12) Quigley HA, Addicks EM : Quantitative studies of retinal nerve fiber layer defects. *Arch Ophthalmol* 100 : 807-814, 1982

13) 松原悦子, 岩瀬愛子, 山本哲也 : Frequency Doubling Technology スクリーニング検査の緑内障視野異常検出能力の検討. *あたらしい眼科* 19 : 349-351, 2002

14) 斎藤 守, 山城博子, 松本千美ほか : Frequency doubling technology による緑内障スクリーニング検査の有用性. *日眼会誌* 105 : 20-23, 2001

15) 山城博子, 田中麻以, 斎藤 守ほか : Frequency Doubling Technology の極早期緑内障性視機能異常検出能力の検討. *日眼会誌* 105 : 488-493, 2001

* * *

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

佐藤裕理 谷野富彦 大竹雄一郎 木村 至 宮田 博 真島行彦 小口芳久

慶應義塾大学医学部眼科学教室

Why Normal-Tension Glaucoma Patients Visits to Keio University Hospital Clinic

Yuri Sato, Tomihiko Tanino, Yuichiro Ohtake, Itaru Kimura, Hiroshi Miyata, Yukihiko Mashima and Yoshihisa Oguchi

Department of Ophthalmology, Keio University School of Medicine

目的：慶應義塾大学病院を受診した正常眼圧緑内障 (normal-tension glaucoma : NTG) 患者の受診機転について検討する。**対象と方法：**2000年1月1日から2001年12月31日の間に、入院精査のうえNTGと診断された患者77例(男性33例, 女性44例)を対象とした。受診時年齢は35~83歳(平均57.1±11.5歳)であった。対象のうち、当科ではじめて緑内障と診断された患者は26例(前医受診歴がない群)で、当院眼科受診前に他院を受診した患者は51例(前医受診歴がある群)であった。医療機関受診時の視野変化の程度によって、Goldmann 動的視野で湖崎分類Ⅱb以下である視野変化の小さい群19例と、湖崎分類Ⅲa以上の視野変化の大きい群58例に分類した。問診により当科および前医の受診機転を調査し、各群で比較検討した。また、受診機転は複数回答を含むものとした。結果：他院受診歴のない群のうち、視野変化の小さい群7例では受診機転として飛蚊症が最も多く、視野変化の大きい群19例では人間ドックや検診での視神経乳頭異常の指摘が多かった。他院受診歴のある群のうち、視野変化の少ない群では緑内障診断に対するsecond opinion目的が多く、視野変化の大きい群では治療目的の紹介とsecond opinion目的が多かった。また、これらの前医受診機転は、視野欠損の自覚13例、人間ドックや検診13例であり、ほとんどは他の眼疾患の症状であった。結論：NTG患者の受診機転として、視野欠損の自覚は少なく、人間ドックで視神経乳頭異常を指摘された症例や他の眼疾患で受診したものが多かった。

Purpose : To examine the reasons why normal-tension glaucoma patients visit Keio University Hospital clinic. **Subjects and methods :** Subjects comprised 77 patients (44 females, 33 males) aged 35 through 83 years (mean age : 57.1 ± 11.5 yrs) who were admitted to the hospital for close examination of glaucoma between January 1, 2000 and December 31, 2001, and were diagnosed with normal-tension glaucoma (NTG). Of these patients, 26 were first diagnosed with glaucoma in our hospital (group without previous clinical visits) ; the other 51 patients had already visited other hospitals (group with previous clinical visits). According to visual field defect severity at the time of consultation, the subjects were subdivided as follows : (1) 19 early-defect patients (24.7 %) who were classified as within Kozaki's classification grade IIb on the basis of Goldmann perimetry, and (2) 58 severe-defect patients (75.3 %) who were classified as equal to or above grade IIIa on the basis of perimetry. Subjects were asked the reason for their visit to our hospital or to previous hospitals ; these reasons were compared among the groups. Multiple reasons were included. **Results :** Among the 26 patients without previous clinical visits, 7 early-defect patients consulted an ophthalmologist, floaters being the most common reason ; the 19 severe-defect patients cited optic disc cupping, found on health screening or medical examination. Among the 51 cases with previous clinical visits, the early-defect patients visited us to obtain a second opinion on the diagnosis of NTG ; the severe-defect patients were introduced to us by a previous hospital, or to obtain a second opinion. The reasons for their visits to previous hospitals were insight into visual field defects in 13 cases, optic disc cupping found on health screenings in 13 cases, and other eye diseases. **Conclusion :** Among subjective symptoms, insights into visual field defects were minimal. The reasons for visits were mostly to treat optic disc cupping found on health screenings or medical examinations, or other eye diseases.

(Atarashii Ganka (Journal of the Eye) 21(3) : 405~408, 2004)

〔別刷請求先〕 佐藤裕理：〒160-8582 東京都新宿区信濃町35 慶應義塾大学医学部眼科学教室

Reprint requests : Yuri Sato, M.D., Department of Ophthalmology, Keio University School of Medicine, 35 Shinanomachi, Shinjuku-ku, Tokyo 160-8582, JAPAN

Key words : 正常眼圧緑内障, 受診機転, 自覚症状, 視野欠損, 緑内障スクリーニング, normal-tension glaucoma, reason for clinical visit, subjective symptom, visual field defect, glaucoma screening.

はじめに

緑内障は、わが国における後天性失明原因の第3位である¹⁾。1988年から1989年に行われたわが国における緑内障疫学共同調査では、緑内障の有病率は3.56%であるが、そのなかに占める正常眼圧緑内障(normal-tension glaucoma: NTG)の割合は2.04%と、欧米の緑内障疫学調査と比較してNTG有病率が高いと報告されている²⁾。また、2000年から2001年に実施された多治見スタディでは、40歳以上の緑内障有病率は約5.78%であり、開放隅角緑内障のうち9割以上が正常眼圧緑内障であったと報告されている。緑内障は初期には自覚症状に乏しく、自覚症状が現れたときにはすでに病状が相当進行している場合が多い¹⁾。したがって、緑内障を早期に発見し早期に治療を開始することで、一生涯にわたる視機能を維持することが重要である。

今回、筆者らは慶應義塾大学病院(以下、当院)を受診したNTG患者の受診機転について調査し、NTG患者の発見方法について若干の考察を加えた。

I 対象および方法

対象は、2000年1月1日から2001年12月31日の2年間に、当院眼科を初診し、入院のうえ眼圧日内変動を測定し、NTGと診断された患者77例である。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。

NTGの診断は、隅角鏡検査で正常開放隅角であり、視神経乳頭と網膜神経線維層に緑内障性変化を認め、それに対応した視野異常を伴うもので、他の視神経疾患や先天異常を除外されたものとした。眼圧は、日内変動を含めて21 mmHgを超えないものとした。

対象のうち、当院を受診してはじめて緑内障と診断された患者は26例(前医受診歴がない群)で、当科を受診する前に他院を受診し診断を受けていた患者は51例(前医受診歴がある群)であった。

医療機関受診時の視野変化の程度によって、Goldmann動的視野検査で湖崎分類Ⅱb以下である視野変化の小さい群19例(24.7%)と、湖崎分類Ⅲa以上の視野変化の大きい群58例(75.3%)に分類し、当院受診時年齢を比較し、unpaired t-testで統計学的に検討した。

問診により当院および前医の受診機転を調査し、各群で比較検討した。また、受診機転は複数回答を含むものとした。

II 結 果

今回対象となったNTG患者77例において、前医受診歴

の有無と視野変化の関係を表1に示す。診断時にはすでに湖崎分類Ⅲa以上と視野変化の大きい症例が多かった。また、各群の受診時年齢に有意差はみられなかった。

前医受診歴のない患者26例の当院受診機転を表2に示す。視野変化の小さい群では受診機転として飛蚊症(44%)が最も多いのに対し、視野変化の大きい群では、人間ドックや検診での視神経乳頭陥凹の指摘(47%)が最も多かった。

前医受診歴のある患者51例の当院受診機転を表3に示す。視野変化の小さい群ではNTGの診断に対するsecond opinion目的が多いのに対し、視野変化の大きい群では前医からの紹介(44%)とNTGの診断に対するsecond opinion目的(41%)が多かった。

当科を受診する前に前医で診断を受けた患者51例の前医への受診機転を表4に示す。視野変化の小さい群、大きい群

表1 各群の患者の割合と受診時年齢

	前医受診歴がない群 26例(33.8%)	前医受診歴がある群 51例(66.2%)
視野変化の小さい群 19例(24.7%)	7例(9.1%) 年齢68.3±10.3歳	12例(15.6%) 年齢58.6±12.1歳
視野変化の大きい群 58例(75.3%)	19例(24.7%) 年齢58.1±11.1歳	39例(50.6%) 年齢54.5±10.8歳

(%)は、全受診者に対する割合を示す。

表2 前医受診歴のない群の当院受診機転(複数回答)

受診機転	視野変化の小さい群	視野変化の大きい群
人間ドック、検診	1(14%)	9(47%)
視力低下	0(0%)	4(21%)
飛蚊症	3(44%)	0(0%)
視野欠損	1(14%)	2(10%)
眼科不定愁訴	1(14%)	2(10%)
眼精疲労	0(0%)	1(5%)
他の眼疾患	1(14%)	3(16%)
症状なし、不明	0(0%)	1(5%)
合計	7(100%)	19(100%)

表3 前医受診歴のある群の当院受診機転

受診機転	視野変化の小さい群	視野変化の大きい群
診断に対するsecond opinion	7(58%)	16(41%)
治療に対するsecond opinion	2(17%)	6(15%)
前医からの紹介	3(25%)	17(44%)
合計	12(100%)	39(100%)

表 4 前医受診機転 (複数回答)

受診機転	視野変化の小さい群	視野変化の大きい群
人間ドック, 検診	4 (33%)	9 (23%)
視力低下	0 (0%)	8 (20%)
飛蚊症	1 (8%)	3 (8%)
視野欠損	3 (25%)	10 (26%)
眼科不定愁訴	1 (8%)	4 (10%)
眼精疲労	2 (17%)	2 (5%)
他の眼疾患	0 (0%)	1 (2%)
検眼希望	0 (0%)	5 (12%)
症状なし, 不明	2 (17%)	2 (5%)
合 計	12 (100%)	39 (100%)

の両者とも, 人間ドックや検診での指摘や他の眼疾患での受診が多かった。表2と表4を併せると, 今回の対象77例中, 人間ドックや検診で指摘されたものが23例(29.9%)であり, 視野欠損を自覚して医療機関を受診したのは16例(20.8%)であった。

III 考 按

今回の検討では, 人間ドックや検診で視神経の異常を指摘され眼科を受診する率が比較的高く, NTGの早期発見のために, 人間ドックなどの眼底検査が緑内障発見の契機となる事が確認された。しかしながら, 検診での指摘を受けた23例中18例では, 医療機関受診時にすでに視野が湖崎分類Ⅲa以上に進行しており, 早期発見という点からはまだまだ不十分であるといわざるをえない。視野変化の小さい緑内障初期の患者26例のうち, 人間ドックや検診で発見されたのは5例(19.2%)であったのに対して, 視野変化の大きい群58例のうち, 人間ドックや検診で発見されたのは18例(31.3%)であった。すなわち, 人間ドックや検診では, 緑内障が進行して視神経乳頭陥凹が大きくなった時点で発見されることが多いと考えられる。人間ドックや検診での判定は眼科医以外の医師が行っている場合も多く, 今後は人間ドックや検診での発見率を上げることが重要と思われる。

また, 飛蚊症や視力低下, 眼精疲労などが受診機転となった症例が多いことから, 緑内障の症状以外の主訴で受診した患者に対しても積極的に眼底検査を行い, 視神経乳頭を評価することが眼科医に要求される。

一方, 前医を受診後に当科を受診した患者のうち, 半数以上はsecond opinion目的であった。これは, 大学病院の特殊性を反映しているとも考えられるが, 患者の立場に立って考えてみると, 緑内障と診断されたものの自覚症状がないことから, NTG診断に対する疑いを持ち, 他の医療機関を受診していると推察される。特に視野変化の大きい群で治療中の患者においても, 診断に対するsecond opinion目的が多いことは注目に値する。このことは, 患者へのインフォーム

ド・コンセントが十分ではなく, NTGの疾患自体が患者に十分に理解されていないことを反映していると考えられた。

今回の検討において, 視野欠損を自覚して医療機関を受診したのは, 全体の20.8%にすぎなかった。1988年から1989年に施行された緑内障疫学共同調査では, 検診で新たに発見された緑内障患者の約8割は無自覚であったと報告されており¹⁾, 今回の結果とほぼ同様であった。自覚症状のない患者に緑内障治療の必要性を理解してもらうことは, 重要で, かつ, むずかしいことである。緑内障は慢性疾患であり生涯にわたる管理が必要で, 医師と患者の信頼関係が非常に重要である。そのためには, 病状や治療について十分な説明を行うと同時に, 患者の不安を医師が理解することも大切である。

一方, 緑内障の早期発見, 早期治療のためには, 高い敏感度, 特異度をもつ良いスクリーニング法を選択することが重要である。日本人ではNTG有病率が特に高いので, 眼圧測定だけでは緑内障の発見につながらず, 眼底検査, 視野検査が必須となる³⁻¹⁰⁾。しかし, 視野閾値測定は敏感度, 特異度ともに高いが, 被検者が検査をよく理解していないと不正確となること, 測定時間がかかること, 検査機器が高価なことなど, スクリーニングとしては不向きな点が多い。また一方では, 検診で緑内障疑いの指摘を受けても, 医療機関を受診しない患者が多いことも問題である^{5,6)}。これまで, 新聞報道, 視野検査の新聞広告, テレビでの啓蒙活動により, 一般の人々の関心が高まり, 少なくとも一時的には眼科受診率の上昇につながったと考えられる。

現在300万人の緑内障患者が存在するとされ, そのうち眼科を受診中であるのは20%と推定されている¹⁾。日本人のほとんどはNTGと報告されているので, 今後は潜在患者の早期発見のために, 啓蒙活動の継続とともに, より高い敏感度, 特異度を持ち, 簡便かつ安価なスクリーニング法の開発が望まれる。

文 献

- 1) 塚原重雄, 細田源浩: 緑内障の疫学—失明原因第3位—, あたらしい眼科 16: 893-898, 1999
- 2) Shiose Y, Kitazawa Y, Akamatsu T, Mizokami, K, Futa R, Katsushima H, Kosaki H: Epidemiology of glaucoma in Japan—a nationwide glaucoma survey. *Jpn J Ophthalmol* 35: 133-155, 1991
- 3) 雨宮哲士, 関 希和子, 笹森典雄: 当院人間ドックにおける緑内障検診の特異性. *健康医学* 12: 92-94, 1997
- 4) 木村奈都子, 林 裕美, 大越洋治, 遠藤成美, 山澤増宏, 白井正彦: 人間ドックにおいて眼底所見から正常眼圧緑内障が疑われた症例について. *眼臨* 92: 516-519, 1998
- 5) 宮内 修, 伊藤 彰, 佐野信昭, 前田智里, 渡部美博: 人間ドックにおける緑内障のスクリーニングテスト. *臨眼* 52: 1151-1154, 1998
- 6) 小松重昭, 天川智博, 鈴木美奈, 酒井良子, 小豆澤優子,

- 峯 克彰：当院における成人病健診の眼底スクリーニング。
眼臨 94：381-383, 2000
- 7) 日比野佐和子, 大鳥安正, 渡辺 仁, 吉田 豊, 田野保雄：人間ドックにおける緑内障検診の検討。眼紀 52：652-655, 2001
- 8) 荻原智恵, 奥川加寿子, 井上賢治：人間ドックにおける緑内障の有病率。あたらしい眼科 19：521-524, 2002
- 9) 岡田真弓, 塚本秀利, 高松倫也, 岡田康志, 向井 聖, 三嶋 弘：広島県御調町における眼科検診。臨眼 56：871-873, 2002
- 10) 鈴木浩太郎, 大竹雄一郎, 谷野富彦, 山田昌和, 真島行彦, 小口芳久：眼底写真による緑内障スクリーニングの評価。眼紀 55 (3)：印刷中, 2004

* * *

眼底写真による緑内障スクリーニング

鈴木浩太郎, 大竹雄一郎, 谷野 富彦, 山田 昌和, 真島 行彦, 小口 芳久
慶應義塾大学医学部眼科学講座

Evaluation of Glaucoma Screening by Fundus Photography Alone versus with Direct Ophthalmoscopy

Kotaro Suzuki, Yuichiro Ohtake, Tomihiko Tanino, Masakazu Yamada, Yukihiro Mashima and Yoshihisa Oguchi

Department of Ophthalmology, Keio University School of Medicine

目的：2種類の検診方法による緑内障発見の効率について検討した。

方法：対象は、人間ドックまたは企業検診で緑内障疑いを指摘され、1999年1月～2000年12月の2年間に慶應義塾大学病院眼科（当科）を紹介された85例である。緑内障診断のために当科では、ゴールドマン圧平眼圧測定、ハンフリー自動視野（C30-2）、散瞳下眼底検査を含む諸検査を施行した。1次検診の方法としては、無散瞳眼底写真判定のみの施設（A群；51例）と無散瞳眼底写真で疑わしい例に直像鏡眼底検査を行った施設（B群；34例）があった。両群での視野異常検出効率を、検査後確率と検査後オッズを用いて比較検討した。

結果：視野異常を認めたのは40例48眼（47.1%）であり、Aulhorn分類 Greve変法にて、stage1が4眼、stage2が17眼、stage3が6眼、stage4が2眼、stage5が15眼、分類不能が4眼であった。各スクリーニングの検査後確率はA群で51例中16例（31.4%）、B群で34例中24例（70.6%）であり、検査後オッズはA群0.46、B群2.4であった。

結論：無散瞳眼底写真で緑内障が疑われる症例に対しては、直像鏡による視神経乳頭評価を加えることで偽陽性が減少し、緑内障の検出効率が高まると考えられた。
(眼 紀 55 : 202-205, 2004)

キーワード：緑内障、スクリーニング、眼底写真、直像鏡、臨床疫学

Purpose : To compare the results of 2 programs for glaucoma screening in the community.

Methods : The subjects were 85 individuals in whom glaucoma was suspected based on a glaucoma screening program and who were referred to Keio University Hospital between January 1999 and December 2000 for further evaluation. They were evaluated for glaucoma using Goldmann tonometry, Humphrey Field Analyzer testing, and mydriatic fundus examination. The screening test consisted of either evaluation of a nonmydriatic fundus photograph only (group A, 51 patients) or evaluation of a fundus photograph followed by direct ophthalmoscopic examination (group B, 34 patients). We compared the post-test probability and post-test odds ratios of detecting a visual field defect using the 2 screening programs.

Results : A visual field defect was detected in 48 eyes of 40 patients (47.1%), including a stage 1 defect in 4 eyes, a stage 2 defect in 17 eyes, a stage 3 defect in 6 eyes, a stage 4 defect in 2 eyes, a stage 5 defect in 15 eyes, and an unclassified defect in 4 eyes. The post-test probability of detecting a visual field defect was 31.4% in group A and 70.6% in group B. The post-test odds ratio for detection of a visual field defect was 2.4 in group B, which was significantly higher than the odds ratio of 0.46 in group A.

Conclusion : Glaucoma can be detected more efficiently by ophthalmoscopic evaluation of the disc after a fundus photograph reading than by fundus photography alone.
(Folia Ophthalmol Jpn 55 : 202-205, 2004)

Key Words : Glaucoma, Screening Program, Fundus Photograph, Direct Ophthalmoscope, Clinical Epidemiology

緒 言

眼科検査を含む総合健康診断。いわゆる人間ドックが現

在多くの施設で行われている。とくに最近では、自覚症状に乏しい緑内障の早期発見に対する社会的要請は高く、検診による緑内障スクリーニングの重要性は増している^{1,2)}。ドックでは短時間に多くの患者の判定を行わなければなら

ず、無散瞳カメラによる後極部眼底写真を眼科医が読影、診断することが広く行われている³⁻¹⁰⁾。散瞳という患者の負担を軽減できる反面、眼底写真の解像度の限界などの欠点も有している⁷⁾。

今回我々は、健康診断で行われている眼底写真による緑内障発見の現状について、検討を試みた。

対象ならびに方法

1999年1月～2000年12月の間に、人間ドックまたは企業検診で視神経乳頭陥凹を指摘され、緑内障精査目的で慶應義塾大学病院（以下 当院）眼科（以下 当科）を紹介され受診した85例を対象とした。その内訳は男性60例、女性25例で、年齢は28～74歳（平均 50.8±9.9歳）であった。眼科検診の方法として、眼底写真判定のみで直像鏡検査なしの検診を受けた人は2,500名で、そのうち異常と判定され当科を受診した者が51名（A群）、直像鏡検査ありの検診を受けた人は1,351名で、そのうち異常と判定され当科を受診した者が34名（B群）であった。1次検診では、視神経乳頭陥凹の拡大 cup/disc ratio（以下 C/D 比）0.7 以上、視神経乳頭辺縁の局所的菲薄化、網膜神経線維層欠損（以下 NFLD）、乳頭出血、から緑内障疑いの有無を判定した。

1次検診にて緑内障疑いとされた患者に対しては眼科精査を勧めたが、医療機関の限定はしなかった。当院を受診した患者に対しては、緑内障2次精査として、ゴールドマ

表1 検診患者における視野異常の割合（検査後確率と検査後オッズ）

	視野異常を認めた症例	検査後確率	検査後オッズ
A群	16例 / 51例	31.4%	0.46
B群	24例 / 34例	70.6%	2.4
全体	40例 / 85例	47.1%	0.89

表2 検診患者の眼圧分布

	例数		
	IOP ≤ 15mmHg	16 ≤ IOP ≤ 21	22mmHg ≤ IOP
A群	23	27	1
B群	12	20	2
全体	35	47	3

IOP: intra ocular pressure

表3 検診患者の視神経乳頭の陥凹比

	例数		
	C/D ≤ 0.6	0.6 < C/D ≤ 0.8	0.8 < C/D
A群	23	15	13
B群	4	16	14

両群間で有意差を認めた (Mann Whitney's U-test: p < 0.005)

ン圧平眼圧計による眼圧測定、ハンフリー自動視野測定（プログラム C30-2）、散瞳下眼底検査を含む眼科諸検査を施行した。今回の検討では、いわゆる緑内障性乳頭変化とそれに一致する視野変化を認めた場合に、緑内障と診断した。

まず、1次検診方法の異なる2群間で緑内障の検出効率を比較するために、検査後確率と検査後オッズを算出し、統計学的に検討した。それぞれ、

$$\text{検査後確率} = \frac{\text{陽性数}}{\text{全体数}}, \quad \text{検査後オッズ} = \frac{\text{検査後確率}}{1 - \text{検査後確率}}$$

と定義され¹¹⁾、検診を施行した後の緑内障患者の割合を反映する。

また、これらの対象患者について、初診時の所見、すなわち眼圧、視神経乳頭陥凹、視野異常の有無について2群間で比較した。眼圧については左右眼のうち高い測定値を採用し、視神経乳頭陥凹については、左右眼のうち陥凹の大きい方の垂直 C/D 比を採用した。また、初診時の緑内障性視野の進行度は Aulhorn 分類 Greve 変法を用いて評価した。

結 果

当科での2次検診の結果、視野異常を認め緑内障と診断されたのは、A群で51例中16例、B群で34例中24例であり、検査後確率はそれぞれ 31.4%、70.6%であった。また、検査後オッズは、眼底写真判定のみのA群で0.46、写真判定に加え眼底観察を行ったB群で2.4であり、両群のオッズ比は5.22であった（表1）。

対象全体の平均眼圧は 16.8±2.4mmHg であり、初診時眼圧が 22mmHg 以上であったのは3例（3.5%）のみであった（表2）。

視神経乳頭陥凹は、A群に比べB群で有意に高かった (Mann Whitney's U-test, p=0.0012)（表3）。一般に C/D 比が 0.7 以上の場合は緑内障疑いとされる^{6,9)}が、今回の検討において散瞳下眼底検査にて C/D 比が 0.6 以下であった症例に注目すると、A群で23例、B群で4例あった。この

表4 視野異常症例の進行度 (Aulhorn 分類 Greve 変法)

Grade	眼数		
	A群	B群	計
Stage 1	2	2	4
Stage 2	7	10	17
Stage 3	1	5	6
Stage 4	1	1	2
Stage 5	6	9	15
非典型的変化	2	2	4
計	19	29	48