

31. Michels-Rautenstrauss K, Mardin C, Wakili N, et al. Novel mutations in the MYOC/GLC1A gene in a large group of glaucoma patients. *Hum Mutat.* 2002;20:479-480 [Online Citation: Human Mutation, Mutation in Brief #563 (2002)].
32. Jansson M, Marknell T, Tomic L, et al. Allelic variants in the MYOC/TIGR gene in patients with primary open-angle, exfoliative glaucoma and unaffected controls. *Ophthalmic Genet.* 2003;24:103-110.
33. Melki R, Idhajji A, Driouiche S, et al. Mutational analysis of the MYOCILIN gene in patients with primary open-angle glaucoma in Morocco. *Ophthalmic Genet.* 2003;24:153-160.
34. Mabuchi F, Yamagata Z, Kashiwagi K, et al. Analysis of myocilin gene mutations in Japanese patients with normal tension glaucoma and primary open-angle glaucoma. *Clin Genet.* 2001;59:263-268.
35. Taniguchi F, Suzuki Y, Shirato S, et al. Clinical phenotype of a Japanese family with primary open angle glaucoma caused by a Pro370Leu mutation in the MYOC/TIGR gene. *Jpn J Ophthalmol.* 1999; 43:80-84.
36. Taniguchi F, Suzuki Y, Shirato S, et al. The Gly367Arg mutation in the myocilin gene causes adult-onset primary open angle glaucoma. *Jpn J Ophthalmol.* 2000;44:445-448.



ELSEVIER

LETTER TO THE EDITOR

The MICA5.1 allele is not associated with susceptibility to effects of ultraviolet-B radiation on induction of contact hypersensitivity

Acute low-dose ultraviolet radiation (UVR) impairs the induction of contact hypersensitivity (CH) when hapten is epicutaneously applied to the exposed site [1]. This outcome occurs only in certain inbred strains of mice, referred to as UVB-susceptible (UVB-S) mice [1]. In these mice, with susceptibility alleles at the *Tlr4* and *Tnfa* loci, UVR prevents CH induction through a process that requires the intracutaneous tumor necrosis factor (TNF)- α [1]. In humans, approximately half of the normal, healthy volunteers represent the UVB-S phenotype [2]. It was reported that the human TNF locus, which is identical to that of mice, was associated with the UVB phenotype in human subjects, this implied that a susceptible locus, which determined the UVB phenotype, was identical in mice and humans [3].

The gene product of the major histocompatibility complex (MHC) class I chain-related gene A (MICA) is a cell stress-induced glycoprotein that is expressed in epithelial cell lines, gastrointestinal epithelia, freshly isolated keratinocytes, and monocytes. Although the role of MICA has not been completely elucidated, its reaction with $\gamma\delta$ T and natural killer (NK) cells suggests an association with tumor rejection [4]. The insertion polymorphism of nucleotide G in the transmembrane region of MICA, namely MICA5.1 (or MICA*0801 according to WHO nomenclature), is characterized by a frame-shift mutation leading to a premature intradomain stop codon; thus, denying the molecule of its 42 aa cytoplasmic tail [5]. In polarized epithelial cells, although the full-length MICA protein is sorted to the basolateral membrane, the gene product of the MICA5.1 allele is aberrantly transported to the apical surface [5]. The physiological location of MICA within epithelial cells is governed by its cytoplasmic tail, implying that impairment in MICA5.1 homozygous individuals may be relevant to the immunological surveillance exerted by NK and T lymphocytes on epithelial malignancies. Since the UVB phenotype is asso-

ciated with the occurrence of skin cancers [1], we determined whether the MICA5.1 allele was associated with the UVB phenotype.

Normal Caucasoid volunteers were enrolled for these studies, as previously described [2]. All participants gave informed consent and the local committee of Ethics for Clinical Investigation approved of the study.

The method used for delivering UVB light to buttock skin has previously been described in detail [2]. Briefly, all subjects were exposed to 144 mJ/cm² of UVB light per day for four consecutive days. Induction of CH was achieved with 2000 μ g dinitrochlorobenzene (DNCB) [2]. This dose was carefully applied to irradiated buttock skin within 1 h of the fourth UVB treatment (on day 0). On day 30, elicitation of CH was accomplished by painting 50 μ g DNCB on the ventral surface of the forearm. The cutaneous responses were clinically assessed 2, 4, and 7 days thereafter, according to the scoring method described earlier [2]. Individuals who exhibited contact dermatitis were designated as UVB-R, while the other individuals were designated as UVB-S.

The genomic DNA samples used in this study were obtained from 24 individuals who were ascertained as belonging to the UVB phenotype. We failed to amplify DNA from 2 samples that were taken from individuals enrolled in a previous study, probably due to a lack of DNA in the samples [2]. We also used 6 DNA samples (3 samples carrying the MICA5.1 allele) from the 10th International Histocompatibility Workshop.

The insertion polymorphism at position 959 of the MICA gene was defined by a polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) technique developed in our laboratory. Briefly, primers were designed to yield a 98 bp product; 5' primer (MICA5.1F), 5'-CAT GTT TCT GCT GTT GCT GCC G-3', and a 3' primer (MICA5.1R), 5'-CTG GAC CCT CTG CAG CTG A-3'. These complemented areas at positions 937–958 and 1029–1047 of the MICA gene [6,7]. A single nucleotide substitution at position 957 (see above; underlined) was included in the forward primer to generate an *Hpa*II

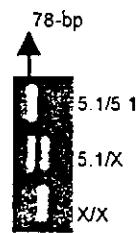


Fig. 1 Detection of the MICA5.1 allele. The PCR products were treated with *Hpa*II. A 98 bp fragment was detected solely in the MICA5.1-positive samples (5.1). Fragments other than the 98 bp fragment were detected when samples had alleles other than MICA5.1 (X). Samples were assigned as MICA5.1 positive when the MICA5.1 specific fragments (78 bp) were detected following cleavage of samples with *Hpa*II. Detection of SNP (insertion of G at position 959) was validated in the various HLA-homozygous cell lines with and without the MICA5.1 allele.

restriction endonuclease site (CCGG) in after the insertion of G at position 959 (solely in the MICA5.1 allele). Genomic DNA was amplified in 25 μ l of reaction mixture, as described previously [2,3]. The cycling conditions were as follows: following preincubation at 94 °C for 1 min, 40 cycles at 94 °C for 0.5 min, 50 °C for 0.5 min and 72 °C for 0.5 min. Following a 3 h digestion with *Hpa*II (New England Biolabs, MA, USA), the alleles were separated by electrophoresis using a 3% agarose gel, and subsequently visualized by ethidium bromide staining. The presence of nucleotide G at position 959 (*Hpa*II site) was suggested by the presence of two 78 and 20 bp digestion products (Fig. 1).

The differences in allele distribution and allele frequency amongst each group were examined for statistical significance by application of the Chi-square (χ^2) test. The probability (*P*) values of <0.05 were considered significant. Two-loci associations were calculated by the 2 \times 2 contingency table analysis [2].

First, we examined single nucleotide polymorphisms (SNPs) typing in the various HLA-homozygous cell lines with and without the MICA5.1 allele. The MICA alleles pertaining to these cell lines have been reported previously [8]. The detection of a fragment pattern was consistent with the expected specificity of the MICA allele that each cell line carried (see figure legend). Fig. 1 shows examples of the detection of MICA5.1-specific fragments. We considered the subjects to be MICA5.1 positive when MICA5.1-specific fragments (78 bp) were detected in samples that were cleaved by the restriction enzyme *Hpa*II.

Table 1 shows the frequency of MICA5.1-positive and -negative samples in UVB-S and UVB-R individuals. There were no differences in the frequency

Table 1 Frequencies of samples with (5.1) and without (X) MICA5.1 allele in the UVB-S and UVB-R groups

	UVB-S (n = 11)		UVB-R (n = 13)	
	N	%	N	%
5.1/5.1	2	19	3	23
5.1/X	4	36	6	46
X/X	5	45	4	31

of MICA5.1-positive individuals between the two groups. We checked the association between HLA-B and MICA alleles because linkage between them has been reported [9]. Individual typing of the HLA-B phenotypes has been previously reported [2]. No associations between HLA-B phenotypes and the MICA5.1 allele were observed in this study (data not shown). We conclude that the MICA5.1 allele has no association with the susceptibility to the effects of UVR on the induction of CH. Further analysis is currently underway to exclude the MICA gene from the susceptible locus of the UVB phenotype associated with the TNF region, which is located in an approximate 160-kb interval centromeric of the MICA gene. We believe that detection of this SNP by the method developed in this study is simpler and cheaper than detection by direct sequencing, since the length of the nucleotide alignment is dependent on each allele (number of GCT repeats) and nucleotide G at position 959 is located within the (GCT)*n* microsatellite polymorphism in exon 5.

References

- [1] Strellein JW, Taylor JR, Vincek V, Kurimoto I, Shimizu T, Tie C, et al. Immune surveillance and sunlight-induced skin cancer. *Immunol Today* 1994;15:174–9.
- [2] Niizeki H, Naruse T, Hecker KH, Taylor JR, Kurimoto I, Shimizu T, et al. Polymorphisms in the tumor necrosis factor (TNF) genes are associated with susceptibility to effects of ultraviolet-B radiation on induction of contact hypersensitivity. *Tissue Antigens* 2001;58:369–78.
- [3] Niizeki H, Inoko H, Wayne Strellein J. Polymorphisms in the TNF region confer susceptibility to UVB-induced impairment of contact hypersensitivity induction in mice and humans. *Methods* 2002;28:46–54.
- [4] Bauer S, Groh V, Wu J, Steinle A, Phillips JH, Lanier LL, et al. Activation of NK cells and T cells by NKG2D, a receptor for stress-inducible MICA. *Science* 1999;285:727–9.
- [5] Suemizu H, Radosavljevic M, Kimura M, Sadahiro S, Yoshimura S, Bahram S, et al. A basolateral sorting motif in the MICA cytoplasmic tail. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99:2971–6.
- [6] Goto K, Ota M, Ohno S, Mizuki N, Ando H, Katsuyama Y, et al. MICA gene and ankylosing spondylitis: linkage analysis via a transmembrane-encoded triplet repeat polymorphism. *Tissue Antigens* 1997;49:503–7.

- [7] Robinson J, Perez-Rodriguez M, Waller MJ, Cuillerier B, Bahram S, Yao Z, et al. MICA sequences. *Immunogenetics* 2001;53:150–69.
- [8] Fischer G, Arguello JR, Perez-Rodriguez M, McWhinnie A, Marsh SG, Travers PJ, et al. Sequence-specific oligonucleotide probing for MICB alleles reveals associations with MICA and HLA-B. *Immunogenetics* 2000;51:591–9.
- [9] Glas J, Werner AI, Brunner G, Witter K, Scholz S, Weiss EH, et al. Linkage disequilibrium between HLA-B, C1_4_1, MICA and MICB. *Tissue Antigens* 2001;58:411–8.

Hironori Niizeki*
*Department of Dermatology and
Clinical Research Institute
National Tokyo Medical Center, Tokyo, Japan*

Tatsuo Matsunaga
*Department of Otolaryngology and
National Institute of Sensory Organs
National Tokyo Medical Center, Tokyo, Japan*

Takeshi Iwata
*National Institute of Sensory Organs
National Tokyo Medical Center, Tokyo, Japan*

Tadamichi Shimizu
*Department of Dermatology, Hokkaido University
School of Medicine, Hokkaido, Japan*

Iwao Kurimoto
*Department of Dermatology
Osaka University School of Medicine
Osaka, Japan*

Taeko Naruse
Hidetoshi Inoko
*Division of Basic Medical Science and
Molecular Medicine
Department of Molecular Life Science
Tokai University School of Medicine
Kanagawa, Japan*

J. Wayne Streilein
*Schepens Eye Research Institute and
Department of Ophthalmology
Harvard Medical School
Boston, MA, USA*

*Corresponding author. Present address:
Department of Dermatology
Nara Medical University, 840 Shijo-cho
Kashihara, Nara 634-8522, Japan
Tel.: +81 744 298891; fax: +81 744 258511
E-mail address: hniizeki@naramed-u.ac.jp

25 March 2004

Available online at www.sciencedirect.com

SCIENCE @ DIRECT®




Bio Medical Quick Review Net

No. 4001

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

 株式会社メディカル ドウ

Medical Do Co., Ltd.

本Reviewの内容を無断で複製、転載すると、著作権、出版権侵害となる場合がありますのでご注意ください。

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、視野的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%に家族性のものが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事が期待される。

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ベータ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事は、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、コストの面で不適当と考えた。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P

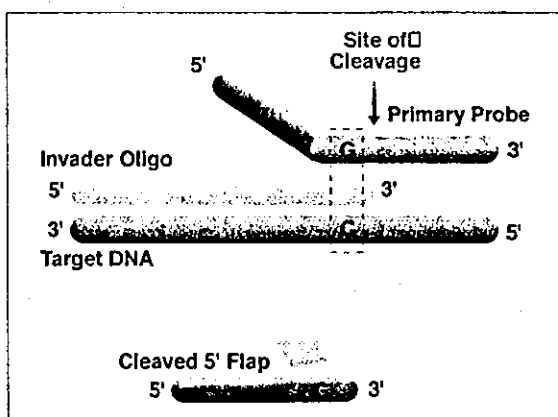


図1 インベーターオリゴDNAとプライマリープローブDNAがターゲットDNAと三重らせんを形成し、フラップが切断される

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

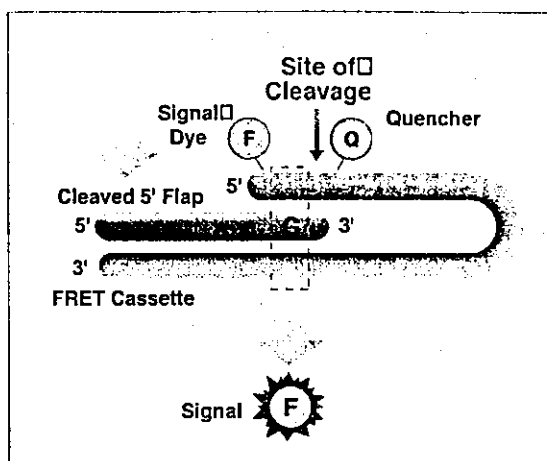


図2 切断されたフラップDNAはFRETカセットDNAと三重らせんを再び形成して切断されて蛍光色素とクエンチャーが離れて発光する

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 インベダ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/MgCl ₂ 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/MgCl ₂ 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
Allelic Ratio = $\frac{(FAM \text{ Raw Counts} / FAM \text{ NTC Raw Counts}) - 1}{(RED \text{ Raw Counts} / RED \text{ NTC Raw Counts}) - 1}$		
= $\frac{(FAM \text{ FOZ}) - 1}{(RED \text{ FOZ}) - 1}$		
= $\frac{NET \text{ FAM} \text{ FOZ}}{NET \text{ RED} \text{ FOZ}}$		

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ダー法を選択したが、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。

インベダー法は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

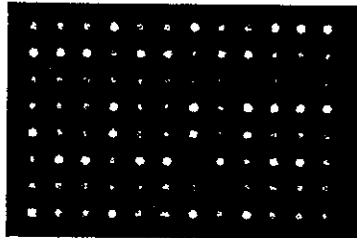
岩田 岳:

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, 網膜色素変性症の連鎖解析を行う。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。



◆遺伝子検査◆

国立感覚器セ、慶大、BML、
緑内障の遺伝子検査パネルプロトタイプ開発、主要病院に配布へ



国立感覚器センター主任研究員の岩田岳氏、慶応義塾大学眼科学講座助教授の真島行彦氏らとビー・エム・エル(BML)の研究グループは、緑内障原因遺伝子変異のパネル検査の最初のプロトタイプを完成させたことをこのほど明らかにした。迅速、低コストで遺伝子の変異を検出できるInvader技術を用いて、今

までに報告されている3つの遺伝子にある合計23個の変異を検出するものだ。

岩田氏らは、全国の国立病院や慶応義塾大学、順天堂大学などの主要病院に遺伝子検査パネルを配布して、医療現場で測定してもらおう計画だ。各病院の評価がよければ、BMLでも受託検査を実施していく。岩田氏らは、1000例を目標にデータを集め、病態と遺伝子変異の関係を調べ、どういった変異があればどういう病態が起こるのか明らかにすることを目指している。治療の選択などにもつながる可能性がありそうだ。岩田氏らは、既にインフォームド・コンセントを得た患者の情報をウェブ上で登録できる症例登録システムの開発にも成功している。また、プロトタイプで慶応義塾大学の検体を調べたところ、良い結果が得られているという。

緑内障は、一般的に眼圧の上昇で視神経が圧迫されて萎縮を生じ、そのままにしておくと最終的には失明する疾患。わが国の失明原因の第2位を占めているが、わが国では、正常眼圧の患者も多い。緑内障遺伝子は、少なくとも8つの遺伝子の存在が報告されている。そのうち、ミオシリン(MYOC、TIGR遺伝子と同じもの)とオプチニューリン(OPTN)、シクロムP4501B1(CYP1B1)の3つが同定されている。開発されたパネルは、MYOCの6変異、OPTNの4変異、CYP1B1の13変異を検出できる。緑内障発症遺伝子の変異は多種類報告されており、開発されたパネルはごく一部にすぎないが、将来的には緑内障全てをカバーできるパネル検査に発展することも期待できそうだ。

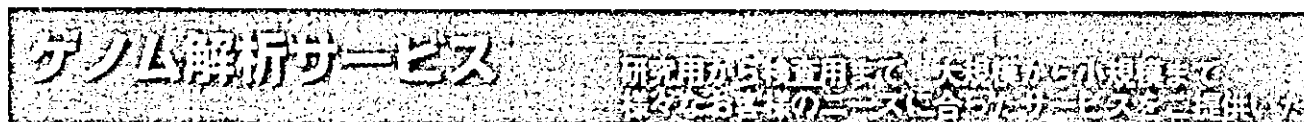
BMLは、Invader法を利用した一塩基多型(SNPs)解析について業務提携し、試薬の開発などを進めている。今回開発に成功したパネル検査とは別に、信州大学と難聴のパネル検査の開発も行っている。

写真は開発された遺伝子検査パネルの患者検体で反応後のプレートの蛍光画像(フルオロ・イメージアナライザーFLA-5000(Fuji Film)で解析)。黄色で発色している部分に変異のあった遺伝子で、複合ヘテロ接合体だった。(横山勇生)

+ジェノタイプ++++

Copyright(c) Nikkei Business Publications, Inc. All Rights Reserved.

最新ニュース



Genome Home	Product & Service	Invader® Technology	Nano Invader Array	Ethical Code	Contact us
● 遺伝子多型解析パネル	● SNP解析受託サービス	● Other fields			
薬物反応関連遺伝子	脂質代謝関連遺伝子	耳鼻科・眼科領域遺伝子			

Product & Service

遺伝子多型解析パネル ～耳鼻科・眼科領域遺伝子多型

mt1555 | MYOC | mt3snps

耳鼻科領域遺伝子多型

ミトコンドリア遺伝子1555 変異

ミトコンドリア遺伝子1555 位の塩基がA(アデニンからG(グアニン)に変異した、1555A → G 点変異をもつ患者は、アミノ配糖体抗生剤により、容易に難聴をきたすことが知られています。同じ難聴の原因遺伝子変異として報告のあるミトコンドリア7445A → G では皮膚疾患を伴うことがあるのに対して、1555A → G では難聴以外の合併する症候の報告はありません。また、中にはアミノ配糖体抗生剤の投与歴がなく、いわゆる特発性難聴の形で発症する例もあり、この遺伝子変異が内耳の易受傷性と関連している可能性が示唆されます。

項目名

ミトコンドリア遺伝子1555 変異

【mt1555】

- 1) Prezant TR et al. Mitochondrial ribosomal RNA mutation associated with both antibiotic-induced and non-syndromic deafness. Nat Genet. 4: 289-294, 1993.
- 2) Usami et al. Prevalence of mitochondrial gene mutations among hearing impaired patients. J Med Genet. 37: 38-40, 2000.

眼科領域遺伝子多型

ミオシリン(MYOC)遺伝子変異5 項目セット

緑内障は遺伝的素因と環境因子の双方が発症に関係している多因子疾患であると考えられており、40 歳以上の有病率は約5 %で年齢とともにその比率は増加し、日本においては約200 万人の患者がいると推測されています。緑内障は、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ます。開放隅角緑内障患者の約4 %にミオシリン遺伝子変異が検出されます。本検査は現在までに日本人緑内障患者に報告された5 種類のミオシリン遺伝子変異を検出するものです。

項目名

ミオシリン(MYOC)遺伝子変異5 項目セット
(Ile360Asn / Ala363Thr / Gly367Arg / Pro370Leu / Thr448Pro)

【MYOC】

- 1) Kubota R et al. A novel myosin-like protein (myocilin) expressed in the connecting cilium of the photoreceptor: molecular cloning, tissue expression, and chromosomal mapping. Genomics. 41: 360-369, 1997.
- 2) 岩田 岳ほか. インベーター法を用いた緑内障の遺伝子解析
Bio Medical Quick Review Net No.4001



平成 16 年 10 月 8 日

報道関係 各位

独立行政法人国立病院機構東京医療センター臨床研究センター(感覚器センター)

インテック・ウェブ・アンド・ゲノム・インフォマティクス株式会社

病態と遺伝子、たんぱく質との相関性を調査
インターネットを利用した感覚器疾患オンライン症例登録を開始
まずは緑内障、加齢黄斑変性症、難聴から

独立行政法人国立病院機構東京医療センター（東京、田中靖彦院長）臨床研究センターは、2004年10月より、感覚器ネットワークに参加する国立病院機構病院や大学病院から、インターネットを介したシステムでの緑内障、加齢黄斑変性症、難聴などの感覚器疾患の症例収集を開始する。収集した症例情報は患者の遺伝子解析や血漿解析に利用し、その相関性を調べる。インターネットを利用した感覚器疾患の症例情報収集は日本では初めてである。

臨床研究センターは感覚器政策医療ネットワークの中心的な施設として全国の国立病院機構病院や大学病院と共同で症例情報の収集を行い、同時に血液検体の収集も行う。

インターネットを介して安全に症例情報を送信できるシステムの開発は、インテック・ウェブ・アンド・ゲノム・インフォマティクス株式会社（本社：東京、平井俊邦社長、以下W&G）が担当した。

まずは緑内障、加齢黄斑変性症、難聴から収集開始

症例情報は、治療を行う病院側からインターネットブラウザを利用して登録し、東京医療センター側でその症例情報を保存する。臨床研究センター、細胞・分子生物学研究室長 岩田岳（いわたたけし）、眼科医長 野田徹（のたとおる）、聴覚障害研究室長 松永達雄（まつながたつお）は、収集した情報を遺伝子解析や血漿タンパク質解析とのデータと比較して、その相関性を調べる。

今回は国内での失明率が高い緑内障と最近顕著に増加が認められる加齢黄斑変性症と難聴の3疾患から登録が始められる。合計 1000 検体を目標に検体を収集し、病態、タンパク質、遺伝子の関係を調べることにより、将来、診断や治療につながる情報が得られると期待されている。東京医療センターではインフォームド・コンセントを得た患者に限って症例情報を登録している。

緑内障は、視神経の萎縮が進行することにより、そのままにしておくと最終的には失明に至る場合もある疾患である。日本の失明原因の第2位を占めているが、特に日本では正常眼圧の患者が多い。緑内障遺伝子には少なくとも8つの遺伝子の存在が報告されている。そのうち、ミオシリン（MYOC）、オプチニューリン（OPTN）、そしてチトクロム P4501B1（CYP11B1）の3つが同定されている。

黄斑変性症は角膜、水晶体を通過した光が収束する網膜の中心にある黄斑部で起こる疾患である。黄斑部は高い視力を有する唯一の網膜部位であるため、この部分を損傷すると視力障害をおこす。黄斑部の疾患には、先天的なものや後天的なものがあるが、なかでも近年、特に高く注目されている疾患が加齢黄斑変性症である。特に米国では加齢黄斑変性症による失明率が高齢者の中で最も高く、日本でも毎年顕著な増加が報告されている。決定的な治療法がなく、今回の症例収集から貴重なデータが得られると期待される。

登録情報の保護を厳重に

インターネットを介して安全に症例情報を送信できるシステムの開発は、W&Gが担当した。

症例情報収集システムの登録内容には患者の個人情報に含まれないが、暗号技術を用いたデータの盗聴防止及び盗難防止を図っている。臨床研究センターで受信された情報は複合化され、内容が確認されるとデータベースに保存される仕組みになっている。症例登録できる医師は特定のパスワードによる認証が必要で、データベースの管理も厳しく行われる。

感覚器ネットワークへの参加を希望する大学が増えており、海外からの登録にも対応できるように現在の日本語版に加えて英語版の準備も進行中である。W&Gは、今後、データベース改築や相関解析及び解析結果のインターネット上での公開をIT面から支援する。

【本件のお問合せ先】

■東京都目黒区東が丘2-5-1

独立行政法人国立病院機構東京医療センター 臨床研究センター

細胞・分子生物学研究室長 岩田 岳

TEL/FAX 03-3411-1026

■インテック・ウェブ・アンド・ゲノム・インフォマティクス株式会社

東京都江東区新砂1-3-3

総務部 島倉、久保田

電話：03-5665-5011

以上

高機能材、安価で合成

三井化学はエチレンなど安価な基
 花学原料から、大画面ディスプレイ
 向けフィルムや人工骨などの高機
 材料を合成できる新型触媒を開発
 た。既存の生産設備を使用するため
 子材料や生体材料の生産コストを
 幅に低減できる可能性がある。合
 樹脂分野は国際競争が激しく、化
 メーカーは高付加価値製品のコス
 削減にしのぎを削っている。同社
 二〇〇五年度にも新技術を実用化
 、競争力強化につなげる。

三井化が新型触媒開発

汎用樹脂原料 人工骨などに

現在、エチレンやプロ
 ビレンなどから作った汎
 用樹脂は「ゴミ袋や容器
 類、衣装ケースなどが主
 な用途。高付加価値の電
 子・生体材料などを作る
 うとしても、必要な機能
 や性能を実現するのが難
 しかった。

現在、乱反射防止フイ
 ルムは有機材料、人工骨
 はカルシウム系化合物な
 り。三井化学は既に化粧品
 ド・ゲノム・インフォマ

十億分の二（メートル単
 位で制御する働きがあ
 り、汎用樹脂から従来に
 ない機能を引き出せるよ
 うになった。

三井化学は新技術を使
 ったエチレン分子が二百
 万個以上連なる新しい樹
 脂の試作に成功。耐久性
 や耐熱性の高いフック
 ス、肌になじみやすい化
 粧品、リサイクルしやす
 い樹脂などへの応用も有
 望とみている。

現在、乱反射防止フイ
 ルムは有機材料、人工骨
 はカルシウム系化合物な
 り。三井化学は既に化粧品
 ド・ゲノム・インフォマ

用素材に比べ価格が一ケ
 タ以上高かった。

新触媒は金属の周りに
 「フェノキシイミン」と
 いう有機物がくっついた
 構造。原料分子をナノレ
 ベルで制御できるほか、
 エチレンやプロピレンな
 ど混ざりにくい素材同士
 を分子レベルで結びつけ
 る働きがある。

ナノ制御が可能な触媒
 としてはドイツの研究者
 が開発した「メタロセン」
 が実用化しているが、新
 触媒はこれに比べて分子
 にバラツキが少ない。

緑内障患者情報 ネットでも収集

東京医療センター
 国立病院機構東京医療
 センター（東京・目黒）
 と情報システム開発のイ
 ンテック・ウェブ・アン
 ド・ゲノム・インフォマ

研究成果情報 発信で提携

科学未来館とATR
 日本科学未来館（東京
 ・江東）と国際電気通信
 基礎技術研究所（ATR、
 京都府精華町）は七日、
 研究成果などの情報を一
 般向けに発信する活動で
 提携したと発表した。A
 TRの研究成果を日本科
 学未来館が展示や講演な
 どで積極的に取り上げる
 ほか、双方の職員が交流
 する機会も設ける。

高強度繊維
 防弾チョッキ
 建設資材建設
 ロープ
 新しい環境
 に再生
 袋類
 容器類
 エレクトロニクス
 画面のちらつき
 防止フィルム
 日用品
 化粧品の配合剤
 高耐久
 フック
 電子部品の保護
 材と帯電防止材



情報通信研究機構と語学
 で、一、二年後をめどに普
 教材出版のアルク（東京・
 杉並）は共同で、英語学習
 者の会話能力を文字情報に
 変換し、データベースと照
 合ソフトウエアを開発し、
 日本人にありがちな定
 英会話能力を自動判定

情通機構・アルクがソフト 文法中心、9段階で

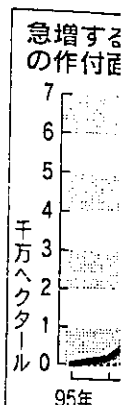
の英語学習者千三百人分
 （約二百万語）の会話文を
 収めてあり、英会話ができ
 る日本人の中での実力を相
 対的に評価する仕組み。判
 定の信頼性は約六割で、英
 語教師などがチェックする
 のとはほぼ同程度という。

科学未来館とATR
 日本科学未来館（東京
 ・江東）と国際電気通信
 基礎技術研究所（ATR、
 京都府精華町）は七日、
 研究成果などの情報を一
 般向けに発信する活動で
 提携したと発表した。A
 TRの研究成果を日本科
 学未来館が展示や講演な
 どで積極的に取り上げる
 ほか、双方の職員が交流
 する機会も設ける。

映画一本、1秒で

ヨコ、美三言青報置1上立口

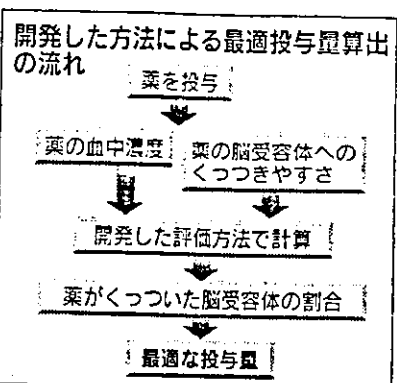
新技術は無線通信で一
 般的な「多値技術」を心
 用し、光で情報を送る際
 は波が重ならないよう工
 信で使うと雑音が大き
 なり、波形も崩れて受信
 できなかった。新技術で
 たタイプを二〇〇七年
 らから導入し、一〇年
 ると見込んでいる。誰
 もどこでもインターネット
 トに接続できる「ユビキ
 タス社会」の基盤技術と



米国では組み換えトウモロコシの栽培面積が急増

薬の適切量計算

研、副作用の危険防止



計算結果と観察結果に大きな違いはなく、開発した評価方法の精度の高さを確認した。

リスペリドンは薬の血中量が約十八時間で半減したが、薬がくっついた

低誘電率絶縁膜 日

日本ゼオンは七日、半導体の基盤材料となる新しい低誘電率絶縁膜（ローク）を開発したと発表した。従来品に比べて強度が二倍以上高いなど性能が向上した。今月にも

2004-10-8
日本経済新聞

2倍

現した。従来絶縁的な空孔を「ラスシラ」材料を用いて強度を上げる物を用いる。誘電率が二倍は難しかった。半導体は高速化、低消費電力化を目指して微細化が進んでいる。現在実用化している半導体で回路線幅は九十ナノメートル（十分の一）程度。二〇〇五年からは線幅六十五ナノメートルの半導体の生産が開始された。

Techno onli

大学も同様に苦しい状況だ。政府は教官の給与を来年から倍増するという。政府は

ウクライナの

業の動きを支援しないだろうが、では日本の産業高まっている。本経験を活かす力も考えられよう（横浜国立大学）

平的に
上席研究員ら
血中濃度と、薬
体へのくっつき
ら、薬がくっつ
体の割合を計算
を開発した。
ロン断層撮影装
間後、五十三時間後に観

国立病院機構東京医療センターと情報システム開発のインテック・ウェーブ・アンド・ゲノム・インフォマティクス（W&G）は七日、緑内障など三種の病気の患者情報をインターネットで全国の病院から収集するシステムを構築、運用を始めたと発表した。病気を遺伝子の関係などを詳しく調べ、治療法の開発に役

緑内障 加齢黄斑変性症 難聴

ネットで患者情報収集

東京医療センターとW&G社
診断・治療法開発狙い

新システムではまず、限り、情報を完全に匿名化してデータベースに蓄積する。五年間で一千人を目標とする。また、治療が遅れると失明することもある。関連遺伝子が見つかったら、発症の詳しい仕組みが、発症の詳しい仕組みは分かっている。

加齢黄斑変性症は米国の高齢者の失明原因の第一位。国内でも患者数が約四百万人いるが、治療

「DNAコン」で培った高術を応用。どから、目Pを含む遺伝、その型で同時に判別を開発した。一度の解NPを判別、試薬などの準備。運転コン約一割に抑えしという。

これまで同類のSNP本置もあつたが点があり、大とした基礎研究でも遺伝子診断には向か

「DNAコン」で培った高術を応用。どから、目Pを含む遺伝、その型で同時に判別を開発した。一度の解NPを判別、試薬などの準備。運転コン約一割に抑えしという。

磁力維持

ど、表面処理技術

高温環境下で磁力維持技術が求められる。この磁石の表面から

無線操縦カー用モーターにこの磁石を組み込んだところ、耐熱温度が従来より三十度向上してセ氏百五十度になった。テルビウムより安価なジスプロシウムと呼ぶ希土類元

薬でも同様の効果が見込めるという。高温でも磁力の高い永久磁石を製造できれば、高温環境で使う自動車用モーターの省電力化が期待できる。

遺伝子の微妙な個人差を考慮されている。オリパスなどは、遺伝子の働きをDNA（デオキシリボ核酸）の化学反応を利用して調べる

オリパスにした手法を応用して、装置を作り、にも東大のSリンクセンター

北信組の大橋 相談文には 山守敬雄理事 未時まで、両 預金残高は二 億四千二百万 円百十五億七 十億金計 百万円で、石 組では最大規 比率は金沢中 野、大野が、 ずれば9.49 の全国平均を

北陸の金融機関 主な再編の動き

1999年 9月	石川、富山など朝銀系5信組が合併
2000年 3月	石川商銀信組が破たん処理に移行 (01年4月、北陸商銀信組に事業譲渡)
6月	富山商銀信組が北陸商銀信組に事業譲渡
10月	金沢信金と加南信金が合併
12月	不動信組が破たん処理に移行 輪島信組が破たん処理に移行
2001年 4月	たいしん信組、加賀信組が破たん処理に移行
5月	福井、福井中央、鯖江の3信金が合併し福井信金に
10月	香江信組が破たん処理に移行
12月	石川、富山、福井県の3労金が合併し北陸労金に
2002年 1月	石川たばこ信組が破たん処理に移行
2月	不動信組が金沢中央信組に事業譲渡
3月	輪島信組が福井信金に事業譲渡
3月	石川、富山、福井3県の鉄道信組が合併し金沢鉄道信組に
4月	香江信組が福井信金に事業譲渡
4月	石川銀が日本承継銀行と営業譲渡契約
5月	たいしん信組が金沢信金と北陸信金に事業譲渡
5月	加賀信組が北陸信金に事業譲渡
6月	金沢信金と福光信金が業務提携を発表
7月	石川たばこ信組が北陸信金に事業譲渡
9月	富山信金と時水信金が03年10月合併で基本合資
12月	福井県たばこ信組が解散
12月	石川銀と北陸銀、北國銀、富山第一銀、金沢信金、福井信金が営業譲渡契約
2003年 2月	能登信金と共栄信金が03年11月合併で基本合資
3月	奥能信金と高浜信組が04年3月合併で基本合資
4月	金沢信金と福光信金が04年3月合併で基本
10月	富山信金と時水信金が合併
11月	能登信金と共栄信金が合併し能登共栄信金に
2004年 2月	奥能信金と高浜信組が合併
3月	金沢信金と福光信金が合併
9月	北陸銀行の持ち株会社と北海道銀行が経営統合し
10月	はくはくフィナンシャルグループ(FG)が発足
	金沢中央信組と大野信組が05年3月合併で合資

半年間前倒し

昨年十月に山守理事は大橋 理事長を助ね、もたためて合併 交渉の開始を打診した。 当初は来年九月という線も 考えついた(大橋理事長)。 合併時期を前倒ししたのは、来 年四月のメーンバンク全国解禁を控 え、全国規模の共同センターと して、金沢信金と福井信金に本 体化する必要があるためだ。 ATMの回線やインターネットの組 み 替えを終え、来年四月以降、「一 体 会合形式」(山守理事)のメー ンバンクとして思いもつた。

預貸率と自己資本比率と不良債権比率 (2004年3月期末、単位は%)

	預貸率	自己資本比率	不良債権比率
金沢中央信組	59.92	10.83	20.83
大野信組	34.61	8.15	19.06
全国の信組平均	58.75	9.36	13.84

規模の小ささがネック

信用組合は収益力で地 銀や信用金を下回ると ころが多い。収益の柱と なる貸し出しが組合員に 限られるため、規模が 小さいと、預金や貸出金の 割合は低く、余った貸 金は国債など有価証券に 振り回さざるを得ない。 貸出金は現金債権を不 動産とする割合を比較す ると、信用組合は比較し て低い。また、自己資本 比率は、信用組合は比較 的に低い。このため、 金沢中央信組と大野信組は、 合併による規模の拡大が、 収益力向上の鍵となると 見られている。

10/9 富山新聞
2面 北陸経済

率が上がる。一方で規模 が増える。均 59 保有 16 債 比 2004年 2月 3月 9月 10月

信用組合は業務内容に 対して地域、職域、業種の 三種類に区別され、とま に地域を営業対象にした 金沢中央、大野の両信組 は合併により、川内内、 唯一の地域信組となる。 金沢市の中央卸売市 場、近江町市場を拠点と する金沢中央は、経営破 たんした不動信組の事業 を一昨年一月に引き継 ぎ、関が生業の再編の動 向が注目される。 「高く評価する」 西村北國野務局長 北陸野務局長の西村則 局長は金沢中央、大野野 信組の合併について「経 営態勢の強化に向けた取 り組むを高く評価する。 利便性の向上や地域経済 ・社会の発展に二層の貢 献を期待する」とコメン トした。

魚と野菜を醤油で 〇〇(金沢市)の臨 した金沢中央の大橋、大 野の山守の両理事長。説 明役はもつぱら山守信組 の大橋氏で、山守氏は歴 史的な信組の再編と、 なるためか、言葉少なな 対談的な二人がともに

疾患症例をネット収集 インテック・ウェブ、一 システムを開発した。 症例情報を収集するオ マチシステム(東京)は、 同時に関、各医療機関から 血液検体も収集し、患者 の遺伝子や血球を解析 してからインターネットを 介して、感病性疾患の症 例情報を安全に収集して

秋絢爛。ヒット曲の豪華競演

恋歌サミットコンサート

in KANAZAWA 2004

10-12:09:22AM:17509:01774M17

0784448128

（H.C.S.）編
 症例情報ネット
 インテックW&G
 インテック・ウェビ
 アンド・ゲーム・イン
 オマイクス（W&G）
 は、採用の症例情報ネット
 インターネットで安全に送
 信できるシステムを、独
 立行政法人国立病院機構
 東京医療センター向けに
 開発した。

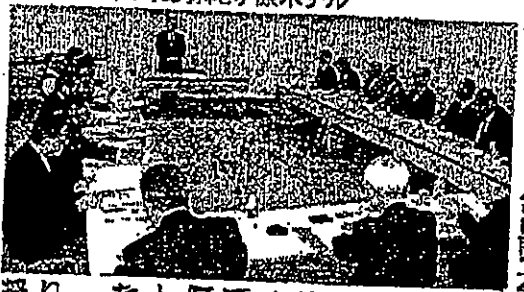
症例情報 ネット送信

国立病院機構向けに開発

国立病院機構は、企業間や
 リアルタイムでやり取
 りの技術として注目
 されているインターネット（WWW）
 を活用し、中小、中堅の納入業
 者や物流業者などは既存
 の商品情報を、既に十一社
 から発信している。
 同社は十一月十日に初
 の自社専用ウェブページを山
 市のホームページで開
 示し、同システムを約三
 十種類の商品を表示す
 る。

八月、位置付けている。平成七
 年からの住宅用でも急な
 シェン
 の建材加工を段階的
 に移転、集約しており、
 （同市）今回は第五期工事とな
 る。
 新工場は鉄骨二階建て
 三万二千平方。切断機
 やプレス機、自動加工機
 など最新設備を導入し、
 百七十人体制で操業す
 る。

富山商工会議所の弥陀ヶ原サミット
 で、佐々成政のさらさら感について
 話す荒井大町市産業建設部長（中央）
 二立山町の弥陀ヶ原ホテル



成政生かし連携

大町市と観光協議

富山商工会議所の観光
 政の「さらさら感」を
 生かすことも、長野県
 大町市の関係者と成政
 を生かしたまちづくり
 は八月、北
 アルプス
 立山の弥陀
 ケ原ホテル
 で「弥陀ヶ
 原サミット」を開い
 た。

サミットは同ホテルを
 会場に毎年開催し、同商
 議所会長と市、市の幹部
 市議らが観光や物流につ
 いて考えている。六回目
 の今回は成政をテーマと
 し、初めて大町市、大町
 商工会議所の関係者も招
 いた。

大町市の荒井今朝二副
 建設部長は「佐々成政
 とその時代」成政は、本
 当に北アルプスを越えた
 か」と基調講演。史料
 を基に成政が成政の立山
 を越えたこと、成政の
 さらさら感「はあつたこ
 う移動を促し」、「立山
 を取り囲んだ高山、長野
 阿具に山岳宗教施設があ
 ったから実現できた」な
 どを語った。

引継ぎ、大町との観
 光連携などを中心に参加
 者が意見交換。「成政は
 富山と大町を結びつくる
 きっかけになる」「両市
 に成政の記念館が建てら
 れる。」との意見が出た。

サミットには八幡三
 金頭、森政雄、鎌倉敏
 朝日新聞の三副会長の同
 商議所会長のほか、永森
 富山商工労働部、
 同市観光振興協議会連
 盟の松本弘行会長ら二十
 四人が出席した。

金沢の二信組
 来年3月に今年
 金沢市に本店を移す金
 沢中央信組（大橋
 信組）と大野信組
 合（山手敏雄理事長）は
 八月、来年3月中旬を
 目途に合併する意向を
 示した。合併後、金沢中央

活用し、大半病院などが
 ら難題や疑問など意見
 交換のネットによる症
 例情報収集を国内で初め
 て開始した。

システムは暗号技術な
 どを駆使し、盗聴や盗難
 の防止を図ったのが特
 徴。

国立病院機構は、既に十一社
 から発信している。
 同社は十一月十日に初
 の自社専用ウェブページを山
 市のホームページで開
 示し、同システムを約三
 十種類の商品を表示す
 る。

デザインは、シンプルに。

居心地は、木の優しさに満ちて温かく

私たちの設計士とH氏は対話
 デザインはあくまでもシンプルに
 居住空間は木の温もりと優しい
 家族がゆったりと暮らしを楽しむ
 設計プランを練り上げていきま
 完成した住まいの真ん中にはリビング
 24坪大のLDKと続き間のお座
 2階はプライベート居室的空間
 として、木の優しさが家中に感じ
 リビングにはH氏が目利きで選
 ムクのケヤキ8寸角の大黒柱が



目次
Breakthrough Stories
Hot Paper
Technology Update
User's Article
Conference Reports
On Line Lecture

HOME > BioBEAT > User's Article > REF-1の機能解析



APPLIED BIOSYSTEMS ONLINE MAGAZINE

REF-1の機能解析

Applied Biosystems 1700ケミルミネッセントマイクロアレイアナライザを用いた網膜色素上皮の機能解析



1岩田 岳 (研究室長)
2,1渋谷 昌彦 (薬剤師)

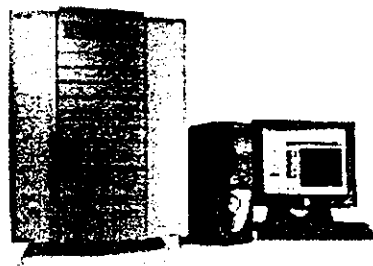
1独立行政法人国立病院機構東J
一、臨床研究センター、視覚研
分子生物学研究室
2独立行政法人国立病院機構東J
一、薬剤科

【写真の説明】

岩田先生と研究室の皆さん
右より岩田先生、渋谷先生、黒
生、岡本先生、皆見先生

はじめに

網膜は角膜と水晶体を通過した光が像を結ぶ位置に存在し、光感受性のある視細胞とその光信号を電
伝える視神経細胞やその周辺を取り巻くグリア細胞などから構成される。さらにその奥には1層の網膜
pigment epithelial (RPE) 細胞が存在する。この細胞は、網膜の恒常性を維持し、網膜と脈絡膜毛細
細胞外節の貪食等の重要な役割を果たすことが知られている。老化によるこの細胞の機能低下によって
起る代表的な眼疾患に加齢黄斑変性症がある。さらに、遺伝性の網膜色素変性症などRPE細胞の機能障
が知られており、何れも決め手となる治療法が存在しない。我々は疾患網膜下において正常なRPE細
ることにより、網膜の機能回復が得られると考え、このような増殖因子の検索を行った。その結果、
子を豊富に生成する繊維芽細胞抽出液中にRPE細胞に特異的な増殖機能を持つ31kDaの増殖因子を発見し
Epithelial Cell Factor-1 (REF-1)と命名した。このタンパク質はTissue-factor pathway inhibitor
に属するserine protease inhibitor であることがわかっている。複数の培養細胞を対象にしたREF-1
ば特異的に増殖することが明らかとなり、REF-1添加によるヒトRPE細胞への影響について解析するこ
頃、1700ケミルミネッセントマイクロアレイアナライザの米国での発売が開始され、早速この機械を使っ
た。



Applied Biosystems
1700 ケミルミネッセントマイクロアレイアナライザ

REF-1添加によるRPE細胞による成長因子やサイトカインの分泌

これまでにREF-1の添加によってRPE細胞から複数の成長因子やサイトカインの分泌が検出されており、
ンパク質産生が促進されていることが推察されていた (表1)。