

9. クリスタリン網膜症の CYP4V2 遺伝子異常と臨床像

中村 誠、林 建、西口康二、近藤峰生、寺崎浩子、三宅養三
(名古屋大)

研究要旨 クリスタリン網膜症は、夜盲症と眼底後極部を中心とした黄白色の結晶沈着、脈絡膜の硬化性変化を特徴とする、常染色体劣性遺伝形式の進行性の網脈絡膜変性疾患である。近年原因遺伝子として CYP4V2 遺伝子が報告された。今回我々は 8 家系 8 症例のクリスタリン網膜症の CYP4V2 を検討したところ、全症例にホモ接合体の変異を検出し、本邦でのクリスタリン網膜症のほとんどは CYP4V2 遺伝子の異常が原因と考えられた。7 症例に IVS6-8_810del/insGC 変異を検出し、創始者効果が考えられ、またその起源は非常に古いと考えられた。ほぼ同じ年齢で同じ変異を持つ症例の間でも、視力や網膜電図の反応は様々で、進行には環境因子や他の遺伝因子が関与すると考えられた。

A. 研究目的

クリスタリン網膜症は、夜盲症と眼底後極部を中心とした黄白色の結晶沈着、脈絡膜の硬化性変化を特徴とする、常染色体劣性遺伝形式の進行性の網脈絡膜変性疾患である。^{1, 2)} しばしば角膜輪部や血液中のリンパ球にも結晶の沈着が見られる。世界中から報告されているが、東洋人、特に日本人と中国人に多い疾患である。近年原因遺伝子として、cytochrome p450 family に属し、脂質の代謝に関わると考えられる CYP4V2 遺伝子が報告された。³⁾ 本研究では、クリスタリン網膜症 8 家系 8 症例の CYP4V2 遺伝子の解析を行い、臨床像について検討した。

B. 研究方法

眼底所見等からクリスタリン網膜症と考えられた 8 家系 8 症例に対して、インフォームドコンセントを得たうえで、末梢血の白血球から DNA を抽出し、CYP4V2 遺伝子のエクソン 1-11 を PCR 法によって増幅し、

ABI 3100 オートシーケンサーによって直接塩基配列を決定した。異常が認められたエクソンについてはコントロールとして正常 100 アレルについても同様に塩基配列を決定した。すべて孤発例で親族に罹患者はなく、3 症例の両親は近親婚だった。各症例について視力、視野、網膜電図、角膜の結晶沈着の有無等の臨床像の検討を行った。

C. 研究結果

クリスタリン網膜症 8 症例すべてに CYP4V2 遺伝子の変異をホモ接合体で検出した。7 症例にはすでに報告のある IVS6-8_810del/insGC 変異を、1 症例には新規の L173W の変異を検出した。L173W の変異は正常コントロール 100 人からは検出されず、またコドン 173 のロイシンは、人から植物にいたるまですべての種の CYP4V2 の相同タンパクで保存されていた。⁴⁾

CYP4V2 遺伝子は染色体上約 21.7kb にわた

ってコードされており、本スクリーニングでは疾患の原因と考えられる変異以外に7つのポリモルフィズムが検出された。*IVS6-8_810del/insGC* の変異を持つ7症例では、すべての症例でイントロン1からエクソン7の間の5つのポリモルフィズムがホモ接合体で認められたが、エクソン1やイントロン9にあるポリモルフィズムは必ずしも認められなかった。従ってこの *splice site* の変異が生じて以後、この変異を含んで、長くて17.1kb、短くて6.7kbのみが染色体上で保存されていると考えられ、このことからこの変異の起源は非常に古いと考えられた。⁴⁾

これらの症例の視力は0.2から1.5で、ゴールドマン視野検査では中心暗点や、傍中心暗点、あるいは輪状暗点が検出された。細隙灯顕微鏡による観察では5例に角膜輪部の結晶沈着が見られた。眼底にはすべての症例で網膜に特徴的な結晶沈着が見られ、様々な程度の網膜色素上皮の萎縮性変化が認められた。⁴⁾ 視神経乳頭はおおむね正常で、血管の狭細はあっても軽度だった。蛍光眼底造影では網膜色素上皮の萎縮と様々な程度の脈絡膜毛細管板の閉塞が認められ、長期間経過観察した症例では脈絡膜毛細管板の閉塞領域の拡大がみられた。全視野ERGでは杆体機能、錐体機能が正常範囲のものから、著しく減弱しているものまでさまざま、ほぼ同じ年齢で同じ *IVS6-8_810del/insGC* の変異を持つ症例の間でも、反応はさまざまだった。⁴⁾ また17年間の長期に亘って経過観察した症例では、経過とともに網膜機能が著しく低下した。中心15度の黄斑部局所ERGでは、全症例で正常より反応が低下していたが、その低下

の程度は様々だった。

D. 考察

CYP4V2 遺伝子の遺伝子変異については、これまでに一報しか報告されていないが、その報告では家族歴のある14家系中13家系、孤発例11例中10例のクリスタリン網膜症でこの遺伝子に変異が検出されている。³⁾ 本研究でも全ての症例で *CYP4V2* 遺伝子にホモ接合体の変異を検出し、クリスタリン網膜症のほとんどは *CYP4V2* 遺伝子の異常が原因で発症すると考えられた。⁴⁾

高頻度で認められた *IVS6-8_810del/insGC* の変異は、イントロン6の *splice acceptor site* を含む17bp欠失2bp挿入の変異で、患者のリンパ球のRNAの検討から、この変異はエクソン7の *in-frame skipping* を起こすことが報告されている。³⁾ この変異は最初の報告でも日本人8家系中7家系、中国人10家系中7家系で検出されており、³⁾ 今回の検討でも日本人の罹患者の多くの原因になっていることが確認された。東洋人にクリスタリン網膜症が多いのは、この変異の創始者効果によると考えられた。

cytochrome p450 family は有害な物質を含むいろいろな基質を酸化する酵素である。また *cytochrome p450 family* の中には脂質の代謝に関わるものがあり、クリスタリン網膜症の患者のリンパ球からは異常に高い濃度のトリグリセリドとコレステロールが検出されることなどから、*CYP4V2* も脂肪酸やステロイドの代謝に関わっていることが予想される。原因遺伝子が判明したことにより、今後クリスタリン網膜症の病態や発症機序に関わる研究が可能となった。

E. 結論

クリスタリン網膜症8症例すべてにCYP4V2遺伝子の変異をホモ接合体で検出したことから、クリスタリン網膜症のほとんどはCYP4V2遺伝子の異常が原因と考えられた。7症例にIVS6-8_810del/insGCの変異が検出され、創始者効果によると考えられ、その起源は非常に古いと考えられた。ほぼ同じ年齢で同じ変異を持つ症例の間でも、視力や網膜電図の反応は様々で、進行には環境因子や他の遺伝因子が関与すると考えられた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

J Med Genet (in press)

2. 学会発表

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

I. 参考文献

1. Bietti GB. Ueber familiaeres vorkommen von "retinitis punctata albescens" (verbunden mit "dystrophia marginalis cristallinea corneae"), glitzern des glaskoerpers

und anderen degenerativen augenveraenderungen. Klin Mbl Augenheilk.99: 737-757,1937

2. 矢ヶ崎克哉、三宅養三:クリスタリン網膜症. 日眼会誌 90 : 711-719、1986.
3. Li A, Jiao X, Munier FL, Schorderet DF, Yao W, Iwata F, Hayakawa M, Kanai A, Shy CM, Alan LR, Heckenlively J, Weleber RG, Traboulsi EI, Zhang Q, Xiao X, Kaiser-Kupfer M, Sergeev YV, Hejtmancik JF. Bietti crystalline corneoretinal dystrophy is caused by mutations in the novel gene CYP4V2. Am J Hum Genet. May 74(5):817-826,2004
4. Lin J, Nishiguchi KM, Nakamura M, Dryja TP, Berson EL, Miyake Y. Recessive mutations in the CYP4V2 gene in East Asian and Middle Eastern patients with Bietti crytalline corneoretinal dystrophy. J Med Genet (in press)

10. 網膜色素線条症の原因遺伝子検索 - *ABCC6* 遺伝子内の一塩基多型を用いたハプロタイプ解析 -

水谷吉宏¹⁾、中山智祥²⁾、石原菜奈恵¹⁾、猪俣公一¹⁾、栃木香寿美¹⁾、
浅井 聡³⁾、島田宏之¹⁾、湯沢美都子¹⁾

(¹⁾ 日本大、²⁾ 日本大受容体生物学部門、³⁾ 日本大遺伝子・ゲノム医学研究部門)

研究要旨 網膜色素線条症 (AS) はブルッフ膜に断裂が存在する眼疾患であり、皮膚疾患である弾力線維性仮性黄色腫 (PXE) を合併することが多い。今回、*ABCC6* 遺伝子内にある複数の一塩基多型 (SNP) から構築したハプロタイプを用いて case-control study を行い、*ABCC6* 遺伝子が AS の原因遺伝子であるかどうかを検討した。

今回検討した 5 か所の SNPs のうち 4 か所で AS 群とコントロール群とで遺伝子型の頻度に有意差が認められた。ハプロタイプ頻度は AS 群全体とコントロール群との間に有意差が認められ、PXE を合併しない AS 群とコントロール群との間でも有意差が認められた。これらのことから *ABCC6* 遺伝子が AS の原因遺伝子でもあり、*ABCC6* 遺伝子異常症の表現型として AS や PXE が表れると考えられた。

A. 研究目的

網膜色素線条症 (AS) はブルッフ膜に色素線条と呼ばれる断裂が存在する眼疾患であり、皮膚疾患である弾力線維性仮性黄色腫 (PXE) を合併することが多い。AS の原因は現在のところ明らかにされておらず、遺伝性疾患かどうかは明らかではない。最近我々は PXE の原因遺伝子とされる *ABCC6* 遺伝子^{1~4)} が AS の原因遺伝子のひとつである可能性を報告した⁵⁾。今回は *ABCC6* 遺伝子内にある複数の既知の SNPs から構築したハプロタイプを用いて case-control study を行い、*ABCC6* 遺伝子が AS の原因遺伝子であるかを検討する。

B. 研究方法

対象は、AS 群 54 例 (うち PXE 合併あり 34 例、PXE 合併なし 7 例、未検査 13 例) と、眼底疾患および全身疾患のない正常コン

ロール群 150 例である。*ABCC6* 遺伝子内にある 5 か所の SNPs の遺伝子型を TaqMan®法により決定し、個々の SNP について AS 群とコントロール群で遺伝子型頻度を比較した。また、それらの SNPs からハプロタイプ (Haplotype, 1 本の染色体上での複数の対立遺伝子の並び) を構築し、Expectation-Maximization (EM) アルゴリズムを用いてハプロタイプ頻度を推定し AS 群とコントロール群とで比較した (ハプロタイプを用いた case-control study)。

(倫理面への配慮)

研究実施にあたり、日本大学医学部倫理委員会の承認を得た。また、対象者全員に対して文書による同意を得てから採血を行った。

C. 研究結果

5 か所の SNPs のうち 4 か所で AS 群とコン

コントロール群とで遺伝子型頻度に有意差が認められた (表 1)。

SNPs	遺伝子型	コントロール群	AS群	p値
rs2239324	GG	89	29	0.004
	GA	56	16	
	AA	5	9	
rs212820	TT	39	47	N.C.
	TC	75	7	
	CC	36	0	
rs2238470	GG	78	40	0.001
	GA	65	8	
	AA	9	6	
rs2238472	GG	105	22	< 0.0001
	GA	42	23	
	AA	3	9	
rs212097	AA	94	29	0.009
	GA	50	18	
	GG	6	9	

表 1 各 SNPs における case-control study の結果

全体のハプロタイプ頻度は AS 群とコントロール群との間で、 χ^2 検定と permutation 法による検定ともに有意差が認められた ($p < 0.0001$)。個々のハプロタイプの頻度分布を表 2 に示す。

また、PXE を合併しない AS 群 ($n=7$) とコントロール群との間でも全体のハプロタイプ頻度に χ^2 検定で有意差が認められた ($p < 0.0001$)。個々のハプロタイプの頻度分布を表 3 に示す。ここでハプロタイプ頻度に有意差の認められた 3 種類のハプロタイプは AS 群全体との比較でも有意差の認められたハプロタイプであった。

ハプロタイプ	推定ハプロタイプ頻度		χ^2 p値	permutation p値
	コントロール群	AS群全体		
GCAGA	0.269	0.010	0.000 *	0.000 *
GTGGA	0.233	0.204	0.528	0.610
GCGGA	0.163	0.019	0.000 *	0.002 *
ATGGA	0.114	0.245	0.001 *	0.008 *
ATGAG	0.095	0.032	0.028 *	0.046 *
GTGAG	0.053	0.283	0.000 *	0.000 *
GCGGG	0.050	0.000	0.018 *	0.020 *
GTAGA	0.007	0.123	0.000 *	0.000 *
ATGAG	0.007	0.019	0.284	0.439
ACAGA	0.000	0.019	0.018 *	0.007 *
GTGAA	0.000	0.013	0.095	0.111
GTAAG	0.000	0.016	0.018 *	0.018 *
GCAAA	0.000	0.017	0.018 *	0.000 *

コントロール群またはAS群の推定ハプロタイプ頻度が0.01以上のものを表示 * $p < 0.05$

表 2 個々のハプロタイプの頻度分布 (コントロール群と AS 群全体との比較)

ハプロタイプ	推定ハプロタイプ頻度		χ^2 p値	permutation p値
	コントロール群	AS群PXE(-) ($n=7$)		
GCAGA	0.269	0.071	0.098	0.273
GTGGA	0.233	0.143	0.431	0.601
GAGGA	0.163	0.071	0.358	0.432
ATGGA	0.114	0.357	0.007 *	0.035 *
ATGAG	0.095	0.000	0.231	0.087
GTGAG	0.053	0.143	0.159	0.064
GCGGG	0.050	0.000	0.391	0.144
GTAGA	0.007	0.143	0.000 *	0.017 *
GCAAA	0.000	0.071	1.000	0.000 *

コントロール群またはAS群の推定ハプロタイプ頻度が0.01以上のものを表示 * $p < 0.05$

表 3 個々のハプロタイプの頻度分布 (コントロール群と PXE 非合併 AS 群との比較)

D. 考察

ハプロタイプを用いた case-control study において、コントロール群と AS 群全体、また、コントロール群と PXE 合併のない AS 群で、ともにハプロタイプ頻度に著明な有意差が認められた。このことから *ABCC6* 遺伝子は PXE のみならず AS の原因遺伝子であると考えられた。

E. 結論

ABCC6 遺伝子は AS の原因遺伝子であり、*ABCC6* 遺伝子異常症の表現型として AS や PXE が表れる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

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

I. 参考文献

1. Struk B et al: Mutations of the gene encoding the transmembrane transporter protein ABC-C6 cause pseudoxanthoma elasticum. *J Mol Med* 78, 282-286, 2000.
2. Ringpfeil F et al: Pseudoxanthoma elasticum: mutations in the MRP6 gene encoding a transmembrane ATP-binding cassette (ABC) transporter. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 6001-6006, 2000.
3. Le Saux O et al: Mutations in a gene encoding an ABC transporter cause pseudoxanthoma elasticum. *Nat Genet* 25, 223-227, 2000.
4. Bergen AA et al: Mutations in ABCC6 cause pseudoxanthoma elasticum. *Nat Genet* 25, 228-231, 2000.
5. 水谷吉宏 他：網膜色素線条症と *ABCC6* 遺伝子、*日大医学雑誌* 61, 314-318, 2002.

11. 樹状細胞を用いた自己免疫網膜症診断法開発の試み

平見恭彦¹⁾、万代道子²⁾、川越直顕¹⁾、横田友子²⁾、高橋政代²⁾、吉村長久¹⁾

(¹⁾ 京都大、²⁾ 京都大探索医療センター)

研究要旨 自己免疫網膜症は血清中の網膜特異抗原に対する自己抗体により網膜視細胞の変性をきたす疾患である。今回我々は臨床所見より自己免疫網膜症が疑われたがサル網膜全蛋白に対するウェスタンブロット法では血清中の自己抗体を検出できなかった症例で、蛋白別ウェスタン、ELISA 法により抗リカバリン抗体を検出し、さらに樹状細胞を用いて T 細胞の免疫応答を IFN γ の産生および表面抗原 CD107a の発現の解析によって評価することにより自己免疫網膜症と診断した。

A. 研究目的

自己免疫網膜症は血清中の網膜特異抗原に対する自己抗体により網膜視細胞の変性をきたす疾患で癌関連網膜症と臨床所見は類似するが悪性腫瘍は存在しない。また後天的要因が関与するため、同様の眼底像を呈するが遺伝的要因に基づく網膜色素変性との鑑別は重要である。今回我々は臨床所見より自己免疫網膜症が疑われたがサル網膜全蛋白に対するウェスタンブロット法では血清中の自己抗体を検出できなかった症例で、個別の網膜特異蛋白に対するウェスタン、ELISA 法により抗リカバリン抗体を検出し、さらに樹状細胞を用いたアッセイで自己免疫網膜症と診断したので報告する。

B. 研究方法

患者は 53 歳女性で、若年時夜盲の自覚はなかった。初診時矯正視力は両眼とも 0.01 で、視野は狭窄、眼底は無色素性網膜色素変性様であり、ERG は non-recordable であった。病歴および臨床所見より自己免疫網膜症を疑い、患者血清を用いて培養ヒト細胞

に強発現させたリカバリン蛋白に対するウェスタンブロット法および精製したリカバリン蛋白を用いて ELISA を行った。さらに患者血液から分離培養した樹状細胞にリカバリン蛋白を投与後共培養して増殖した T 細胞を再度リカバリン投与した樹状細胞で刺激し、T 細胞の IFN γ の産生および表面抗原 CD107a の発現について FACS を用いて解析し免疫応答を評価した。

(倫理面への配慮)

患者に対して血液の利用目的と方法について十分説明を行い、同意を得て採血した。

C. 研究結果

血清を用いたウェスタンブロット法 (図 1) ではサル網膜全蛋白に対しては特異的なバンドは検出されなかったがリカバリン蛋白を強発現させた培養細胞に対して抗リカバリン抗体を用いた場合と同じサイズのバンドが検出され、精製したリカバリン蛋白を用いた ELISA 法において患者血清のリカバリン抗体価は上昇していた。

さらに患者血液の T 細胞のアッセイ (図 2)

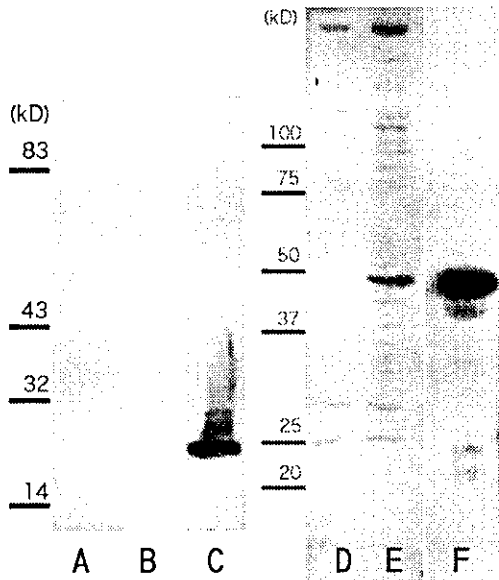


図1 サル網膜全蛋白(左) および培養ヒト細胞(HEK293, 右)に対するウェスタンブロッティング: A; 健常者、B; 患者血清、C; 抗リカバリン抗体、D; 培養ヒト細胞 × 患者血清、E; GFP-リカバリン強発現細胞 × 患者血清、F; GFP-リカバリン強発現細胞 × 抗リカバリン抗体。

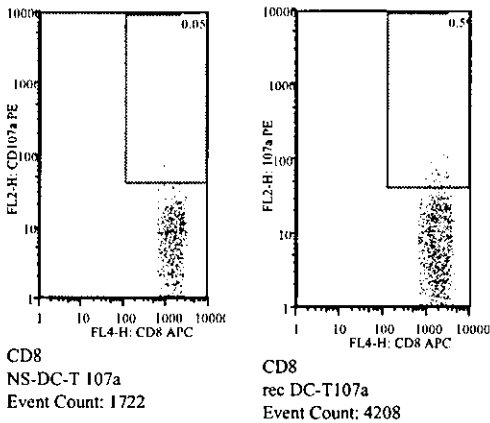


図2 T細胞表面分子 CD107a の発現の FACS による解析結果。: 左; T細胞を抗原投与せず成熟させた樹状細胞で刺激。右; T細胞をリカバリン投与して成熟させた樹状細胞で刺激。

において抗原を投与せず成熟させた樹状細胞で刺激した場合と比較して、リカバリンを投与後成熟させた樹状細胞でT細胞を刺激した場合、T細胞の表面分子 CD107a の

発現は前者では 0.058%であったのに対し後者では 0.59%と増加がみられた。

D. 考察

個別の網膜特異蛋白に対するウェスタン、精製した蛋白を用いた ELISA 法は網膜全蛋白に対するウェスタンと比較して感度、特異性とも優れていると考えられた。またT細胞の免疫応答を解析することによって、表面抗原 CD107a の発現が増加していることから、自己免疫網膜症にリカバリンに対する細胞性免疫が関与している可能性があると考えられた。

E. 結論

今回用いた方法は感度、特異性両者において優れていた。またT細胞の免疫応答を解析することにより自己免疫網膜症にリカバリンに対する細胞性免疫が関与している可能性も示唆された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

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

1. 参考文献

1. Mizener JB et al: Autoimmune retinopathy in the absence of cancer. Am J Ophthalmol 123,607-18,1997.
2. Whitcup SM et al: Recoverin-associated retinopathy: a clinically and immunologically distinctive disease. Am J Ophthalmol 126,230 -237,1998.
3. Heckenlively JR et al: Autoimmune retinopathy: patients with antirecoverin immunoreactivity and panretinal degeneration. Arch Ophthalmol 118,1525 -1533,2000.
4. Adamus G: Autoantibody-induced apoptosis as a possible mechanism of autoimmune retinopathy. Autoimmunity Reviews 2,63-68,2003.
5. Adamus G et al: Autoantibodies against retinal proteins in paraneoplastic and autoimmune retinopathy. BMC Ophthalmol 4,5,2004.
6. Rubio V et al: Ex vivo identification, isolation and analysis of tumor-cytolytic T cells. Nat Med 9,1377-1382,2003.

12. 地域一般住民における喫煙と加齢黄斑変性発症の関連： 久山町研究

宮崎美穂¹⁾、石橋達朗¹⁾、清原裕²⁾、飯田三雄²⁾

(¹⁾九州大、²⁾九州大病態機能内科学)

研究要旨 福岡県久山町における地域住民を5年間追跡調査することにより喫煙と加齢黄斑変性発症との関連を検討した。追跡調査の結果、喫煙が加齢黄斑変性発症の有意な危険因子であることが示された。喫煙を減らすことは、加齢黄斑変性の予防に有用であると考えられる。

A. 研究目的

喫煙は多くの前向きコホート研究で加齢黄斑変性 (AMD) 発症の危険因子であることが報告されている。しかし日本人において喫煙と AMD 発症との関連を前向きに追跡した報告はみられない。そこで本報告では、福岡県久山町における地域住民を追跡調査することにより喫煙と AMD 発症との関連を調査した。

B. 研究方法

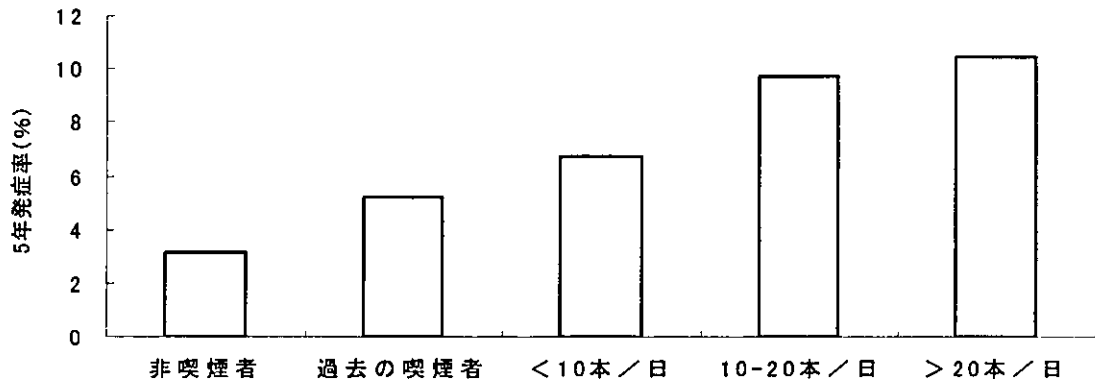
1998年に眼科健診を含む久山町住民健診を受けた福岡県久山町在住の50歳以上の住民1,482名のうちAMDの既発症者を除いた1,475名を5年間追跡し、2003年に再度住民健診を受診した960名を対象とした。(追跡率65.1%) 1998年、2003年に眼科健診で撮影した眼底写真からAMDの診断を行った。AMDの分類はBirdら¹⁾による国際分類に基づいて初期と後期に分類した。つまり初期はsoft drusenか網膜色素上皮の色素異常を認めるもの、後期はneovascular AMDかgeographic atrophyを認めるものと定義した。喫煙は質問紙表により喫煙歴、喫煙本数などを確認した。喫

煙状態により非喫煙群、過去に喫煙歴のあった群、現在の喫煙が1日1本以上10本未満の群、現在の喫煙が1日10本以上20本未満の群、現在の喫煙が1日20本以上の群、の5群に分類した。統計解析は喫煙の状態により対象者を群分けしてロジスティックモデルを用いて行った。

C. 研究結果

5年間の追跡調査の結果、全71名のAMD発症を認めた。このうち初期は63名(6.6%)、後期は8名(0.8%)だった。喫煙習慣によるAMDの5年発症率を図1に示す。AMDの5年発症率は非喫煙者群で1.8%、過去の喫煙者群で2.4%、現在の喫煙が1日1本以上10本未満の群で3.7%、1日10本以上20本未満の群で4.7%、1日20本以上の群で5.2%となり、喫煙量が増えるにつれてAMDの5年発症率は有意に増加した。さらにそれぞれの喫煙群で非喫煙者に対するAMD発症のオッズ比を算出すると、過去の喫煙群ではオッズ比1.18(95%信頼区間0.38-2.56)、現在の喫煙が1日1本以上10本未満の群ではオッズ比1.71(95%信頼区間0.91-3.22)、1日10本以上20本未満の

図 1



群ではオッズ比 2.21 (95%信頼区間 1.28-7.37)、1日20本以上の群ではオッズ比 3.32 (95%信頼区間 1.33-8.30)、となり、1日10本以上20本未満の群と1日20本以上の群では非喫煙群と比較して有意にリスクが増加した。

D. 考察

喫煙は多くの前向きコホート研究で加齢黄斑変性 (AMD) 発症の危険因子であることが報告されている。しかし日本人において喫煙と AMD 発症との関連を前向きに追跡した報告はみられない。今回、われわれは日本人の一般住民 (50歳以上) を追跡調査し、喫煙と加齢黄斑変性の5年発症率との関連を検討した。その結果、喫煙量が増えるにつれて AMD の5年発症率は有意に増加し、さらに1日10本以上20本未満の喫煙群と1日20本以上の喫煙群では非喫煙群と比較して有意にリスクが増加した。

ARM の危険因子としては、様々なものが報告されているが、ある報告で危険因子であるものが他の報告では否定され、正確な因子の把握は現在のところ困難である。し

かし、これらの因子のうち喫煙に関しては多くの論文で共通して指摘されている。本研究においても、AMD の発症と喫煙が有意に関連していることが示された。喫煙は活性酸素を増加させ、脂肪の過酸化を促進するとともに、脈絡膜の血液循環にも影響を及ぼし、黄斑部の変性を生じやすくなると考えられる。

E. 結論

日本の地域一般住民 (50歳以上) を対象とした前向き追跡調査において、喫煙が AMD 発症の有意な危険因子であることが示された。喫煙を減らすことは、AMD の予防に有用であると考えられる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

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

I. 参考文献

1. Bird AC, Bressler NM, Bressler SB, *et al.* An international classification and grading system for age-related maculopathy and age-related macular degeneration. *Surv Ophthalmology* 39:367-374,1995

13. 加齢黄斑変性の診断におけるプレビューPHPの有用性

生野恭司、佐柳香織、十河 薫、北村 淳、五味 文、坂口裕和
大島佑介、瓶井資弘、日下俊次、大路正人、田野保雄
(大阪大)

研究要旨 加齢黄斑変性 (AMD) は視力低下の大きな原因となっている。当科では昨年カールツァイス社より発売されたプレビューPHPを実際に臨床に用いその有用性を検討した。フルオレセイン蛍光眼底撮影でAMDと確定診断された19例19眼にプレビューPHP検査を行い検査の感度を求めた。また、網膜前膜 (5例6眼)、黄斑円孔 (6例8眼)、黄斑浮腫を含むその他の黄斑疾患 (13例15眼) と正常眼 (31例31眼) にも同様にプレビューPHP検査を行い検査の特異性を検討した。AMD全体における陽性率は53%であったが、矯正視力(0.5)以上では36%、(0.5)未満では75%であった。他グループの陽性率は網膜前膜が17%、黄斑円孔が73%、その他が20%、正常では3%であった。しかしながら矯正視力(0.5)以上の症例に限ると網膜前膜0%、黄斑円孔が0%、その他が9%、正常では3%であった。プレビューPHPを用いる場合は、視力が比較的良好な症例では検出できない可能性が高いが特異性は高い。逆に、視力低下が著しい場合は検出率は高くなるが特異性は低下することに留意すべきである。

A. 研究目的

加齢黄斑変性 (AMD) は視力低下の大きな原因となっている。光線力学療法、トリアムシノロン注射や手術などさまざまな治療が試みられるようになってきた今日、スクリーニングによりある程度早期に病変を捕らえ、手遅れなる前に治療を考慮することが重要になってきた。しかしながら、AMDは高齢者に多く、このような高齢者に度々フルオレセイン蛍光眼底撮影を行うことはそれ相応のリスクとなる。プレビューPHPはHyperacuityを測定することにより、非侵襲的にAMDを早期に検出できる機器として開発された。しかしながら、日本におけるAMD患者での有用性は未だ見当されていない、本研究では日本人のAM

D患者におけるプレビューPHPの有用性について、感度と特異性という面から検討した。

B. 研究方法および倫理面への配慮

当科では昨年カールツァイス社より発売されたプレビューPHPを実際に臨床に用いその有用性を検討した。フルオレセイン蛍光眼底撮影でAMDと確定診断された19例19眼にプレビューPHP検査を行った。行った症例のうちプレビューPHPでAMD陽性と判断されたものの割合 (陽性率) を検討した。また、視力による感度の違いも比較検討した。

当科外来に通院中のAMD以外の黄斑疾患を有する患者にも同意を取得の上プレビュー

一PHPを施行した。内訳は網膜前膜（5例6眼）、黄斑円孔（6例8眼）、黄斑浮腫を含むその他の黄斑疾患（13例15眼）と正常眼（31例31眼）である。これら症例に施行した際にAMDと判定されたものの割合を算出し、偽陽性の割合も検討した。プレビューPHPを行う際にはその意義を十分に説明し、倫理面にも十分配慮した。

C. 研究結果

AMD 症例全体においてAMDと判定された症例の割合（陽性率）は53%であったが、症例の矯正視力が(0.5)以上の場合は36%、(0.5)未満では75%であった。他の黄斑疾病にプレビューPHPを施行した場合、AMDであると誤って判定されたものの割合は網膜前膜が17%、黄斑円孔が73%、その他が20%、正常では3%であった。しかしながら矯正視力(0.5)以上の症例に限ると網膜前膜0%、黄斑円孔が0%、その他が9%、正常では3%であった。

D. 考察

全体として半数を超えるAMD症例の判定が可能であったが、視力が良好な場合の検出率はあまり高くない。すなわち偽陰性となる可能性がある。一方他の疾病と鑑別する場合、視力良好な場合にはAMDに対して特異性が高いが、視力が低下すると偽陽性が出る可能性がある。今後プレビューPHPを用いる際にはこのような点に留意して用いるべきである。

E. 結論

プレビューPHPは日本におけるAMDの診断に有用であるが、その特性を理解した

うえで使用すべきである。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Bando H et al. Ultrastructure of internal limiting membrane in myopic foveoschisis. *Am J Ophthalmol.*139:197-199, 2005.
2. Sakaguchi H et al. Multiple components of epiretinal tissues detected by triamcinolone and indocyanine green in macular hole and retinal detachment as a result of high myopia. *Am J Ophthalmol.* 138:1079-1081, 2004.
3. Matsumura N et al. Posterior vitreous detachment and macular hole formation in myopic foveoschisis. *Am J Ophthalmol.*;138:1071-1073, 2004.
4. Sakaguchi H et al. Electrical stimulation with a needle-type electrode inserted into the optic nerve in rabbit eyes. *Jpn J Ophthalmol.* 48:552-557, 2004.
5. Nakauchi K et al. Transretinal electrical stimulation by an intrascleral multichannel electrode array in rabbit eyes. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* Dec 7, 2004. [Epub ahead of print]
6. Fang X et al. Direct stimulation of optic nerve by electrodes implanted in optic disc of rabbit eyes. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 243:49-56, 2005.
7. Cekic O et al. Nonaxoplasmic transfer of indocyanine green into the optic nerve after intravitreal application. *Retina.* 24: 412-415. 2004.

8. Sakaguchi H et al. Transretinal electrical stimulation with a suprachoroidal multichannel electrode in rabbit eyes. *Jpn J Ophthalmol.* 48:256-261, 2004.
9. Cekic O et al. Evaluation of choroidal perfusion of the new central macular area by dilution analysis of indocyanine green angiography after macular translocation. *Retina* 24: 210-214, 2004.
10. 生野恭司. 強度近視に伴う黄斑分離症. *眼科手術* 17: 528-530, 2004.
11. 生野恭司. 強度近視の眼合併症に対する手術治療. *日本の眼科* 75: 581-585, 2004.

2. 学会発表

1. 北村淳 他. 脈絡膜新生血管黄斑症に対するプレビューPHP(Preferential Hyperacuity Perimeter)の有用性. 第21回日本眼循環学会 2004年7月16日 旭川
2. 佐柳香織 他. (Preferential Hyperacuity Perimeter) PHP を用いた変視測定. 第58回日本臨床眼科学会 2004年11月14日 東京
3. 十河薫 他. 光線力学療法前後のプレビューPHPの変化. 第43回日本網膜硝子体学会総会 2004年12月4日、前橋

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

I. 参考文献

1. Loewenstein A et al. Replacing the Amsler grid: a new method for monitoring patients with age-related macular degeneration. *Ophthalmology.* 110: 966-970, 2003.

14. フルオレセインおよびインドシアニングリーン蛍光眼底造影検査による光線力学療法の実効性の検討

小畑 亮、入山 彩、高橋秀徳、上 順子、井上裕治、柳 靖雄、玉置泰裕、新家 眞
(東京大)

研究要旨 滲出型加齢黄斑変性 (AMD) に合併した、無治療で活動性を有する中心窩下または傍中心窩の脈絡膜新生血管 (CNV) 症例 82 例 83 眼 (年齢 53-90 歳) について、フルオレセイン蛍光眼底造影 (FA) を用いて、Treatment of Age-related Macular Degeneration with Photodynamic therapy (TAP) study、Verteporfin in Photodynamic Therapy (VIP) study、また TAP および VIP study group によるガイドラインにおける PDT 適応 (以下各々 TAP 適応、VIP 適応、ガイドライン適応) に合致する症例の割合について検討した。次に、これらの適応症例について、インドシアニンググリーン蛍光眼底造影 (IA) を用いて、PCV、RAP および網脈絡膜血管吻合 (RCA) 合併 CNV 症例の割合を検討した。TAP 適応例は 15 眼 (18%)、VIP 適応例は 18 眼 (22%)、ガイドライン適応例は 50 眼 (60%) であった。また、IA を用いた検討では、TAP 適応例のうち 2 眼 (13%) が RAP であり、VIP 適応例のうち 9 眼 (50%) が PCV、および 1 眼 (6%) が RAP であり、ガイドライン適応のうち 14 眼 (28%) が PCV、3 眼 (6%) が RAP、1 眼 (2%) が RCA 合併 CNV であった。FA を用いて判定した PDT 適応症例の中には、PDT の有効性が確立していない PCV や、PDT 施行時の安全性が懸念される RAP または RCA 合併 CNV が含まれており注意を要する。これらの症例を鑑別する検査として IA が有用である。

A. 研究目的

脈絡膜新生血管 (CNV) を合併した滲出型加齢黄斑変性 (AMD) に対する光線力学療法 (PDT) は、Treatment of Age-related Macular Degeneration with Photodynamic therapy (TAP) study^{1,2}、Verteporfin in Photodynamic Therapy (VIP) study³、また TAP および VIP study group によるガイドライン⁴により、フルオレセイン蛍光眼底造影 (FA) を用いて分類される特定のサブグループへの PDT が推奨されている。欧米では中心窩下 CNV 全体の 40-60% がこれに相応すると推測される^{5,6}が、本邦においてこの割合を検討した報告は無い。また、FA のみを用いた画像診断では、PDT 適応とされる症例の中に、ポリープ状脈絡膜血管症

(PCV)、retinal angiomatous proliferation (RAP) および網脈絡膜血管吻合 (RCA) 合併 CNV が含まれる可能性がある。PCV は黄色人種に多いとされ、PDT の効果は確立していない。また RAP および RCA は PDT による網膜障害などの合併症が危険視されている。これらの症例が含まれる割合についても検討報告は無い。今回中心窩下または傍中心窩に位置する活動性の CNV を合併した AMD 症例のうち、FA を用いて、TAP study、VIP study、または TAP および VIP study group によるガイドラインの適応基準を満たす症例の割合を検討し、この症例の中に含まれる、PCV、RAP または RCA 合併 CNV 症例数を、インドシアニンググリーン蛍光眼底造影 (IA) を用いて検討した。

B. 研究方法

東京大学附属病院眼科を受診し、新生血管黄斑症の診断にてFA および IA を施行された症例のうち、無治療で活動性を有する中心窩下または傍中心窩の CNV 症例 82 例 83 眼(年齢 53-90 歳)について、FA を用いて、Treatment of Age-related Macular Degeneration with Photodynamic therapy (TAP) study、Verteporfin in Photodynamic Therapy (VIP) study、また TAP および VIP study group によるガイドラインにおける PDT 適応(以下各々 TAP 適応、VIP 適応、ガイドライン適応)に合致する症例の割合について検討した。読影は当年の FA 初回検査画像を用い、TAP and VIP report No.2⁷に基づき専門医が行った。

次に、これらの適応症例について、IA を用いて、PCV、RAP および網脈絡膜血管吻合(RCA)合併 CNV 症例の割合を検討した。

(倫理面への配慮)

本研究に際しては、診療記録の調査におけるプライバシーの保護に配慮した。

C. 研究結果

FA を用いた検討では、predominantly classic CNV は 29%、minimally classic CNV は 16%、occult with no classic CNV は 55%を占めていた。TAP 適応例は 15 眼(18%)、VIP 適応例は 18 眼(22%)、ガイドライン適応例は 50 眼(60%)であった。また、IA を用いた検討では、TAP 適応例のうち 2 眼(13%)が RAP であり、VIP 適応例のうち 9 眼(50%)が PCV、および 1 眼(6%)が RAP であり、ガイドライン適応のうち 14 眼(28%)が PCV、3 眼(6%)が RAP、1 眼(2%)が RCA 合併 CNV であった(図)。

症例	眼数(%)			
	計	PCV	RAP	RCA
TAP適応例	15	0	2 (13)	0
VIP適応例	18	9 (50)	1 (6)	0
ガイドライン	50	14 (28)	3 (6)	1 (2)
predominantly classic	21	0	1 (4)	1 (4)
occult with no classic	28	14 (50)	2 (7)	0
minimally classic	1	0	0	0

図：PDT適応症例におけるPCV、RAP、RCA合併CNVの割合

D. 考察

今回の検討による PDT 適応の割合は、過去の欧米での報告^{6,8}とほぼ同様であった。

IA を用いて判定した PDT 適応症例の中には、RAP または RCA 合併 CNV、および PCV が含まれていた。RAP または RCA 合併 CNV に対する PDT の有効性は確立しておらず、PDT 施行時の網膜障害といった危険性も示唆されており⁹、PDT 施行は慎重に行われるべきである。従来の FA のみでは RAP の診断は困難であり、IA 施行が有用であると思われる。また、FA による occult with no classic CNV の PDT 適応例のうち約半数は IA を用いた検討において PCV と診断された。PCV は有色人種に多く発症するとされ、今回の検討結果で FA における occult with no classic CNV (55%) が欧米の報告(35%)⁵ に比して高かったのも、PCV がこの中に多く含まれていたためと思われる。これより、FA による occult with no classic CNV の

PDT 適応例には、有色人種は白色人種に比して PCV が多く含まれている可能性が高いと考えられる。PCV に対する PDT の効果は確立していない¹⁰ものの、視力維持効果および安全性を示唆する症例報告がある^{11,12}ことから、今後更なる検討を行うべきと思われる。

E. 結論

FA を用いて判定した PDT 適応症例の中には、PDT の有効性が確立していない PCV や、PDT 施行時の安全性が懸念される RAP または RCA 合併 CNV が含まれており注意を要する。これらの症例を鑑別する検査として IA が有用である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

1. 小畑 亮 他. 加齢黄斑変性に対する光線力学療法の適応症例数の推計. 第 58 回日本臨床眼科学会、東京、2004

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

I. 参考文献

1. Arch Ophthalmol 117:1329-1345,

1999.

2. Arch Ophthalmol 119:198-207, 2001.
3. Am J Ophthalmol 131:541-560, 2001.
4. Retina 22:6-18, 2002.
5. Retina 20:325-330, 2000.
6. Br J Ophthalmol 86:663-669, 2002.
7. Arch Ophthalmol 121:1253-1268, 2003.
8. Eye 18:588-594, 2004.
9. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol 242:368-376, 2004.
10. Survey of Ophthalmology 49:25-37, 2004.
11. Ophthalmology. 111:1576-1584, 2004.
12. Ophthalmologica 218:193-201, 2004.

Transpupillary thermotherapy for treatment of exudative age- related macular degeneration in Japanese patients

T Atarashi, Y Tamaki, Y Inoue, R Obata,
K Muranaka and Y Yanagi

CLINICAL STUDY

Abstract

Purpose To report the therapeutic outcome of transpupillary thermotherapy (TTT) for subfoveal choroidal neovascularization (CNV) in brown retina using a diode-laser with the setting of lower energy level compared to the previous studies on light-pigmented Caucasian patients.

Methods A total of 19 subfoveal CNVs in 18 patients were treated with TTT. The power of diode-laser was set 160 mW for 1.2 mm beam, 270 mW for 2.0 mm beam, and 400 mW for 3.0 mm beam, and the laser was delivered for 1 min through a slit-lamp mounted-delivery system. Patients were followed up for a mean of 8.8 months (4–12 months). Visual acuity and the fundus change as judged by fundoscopic examination and simultaneous fluorescein and indocyanine green angiography were evaluated. Visual acuity was measured by a Japanese standard Landolt visual acuity chart and converted to logarithm of the minimal angle resolution (logMAR) visual acuity for statistical analysis. Improvement or decline in vision was defined as change of more than 0.2 in logMAR visual acuity.

Results In eyes with minimally classic or occult only CNV, visual acuity improved in two eyes (18%) stabilized in seven eyes (64%) and worsened in two eyes (18%). In eyes with predominantly classic CNV, visual acuity improved in two eyes (25%), stabilized in four eyes (50%) and worsened in two eyes (25%). In all, 15 (84%) eyes of all studied subjects had improvement in exudation. Two (11%) and one (5%) eye(s) were noted to have a significant post-treatment haemorrhage and retinal pigment epithelial tear, respectively.

Conclusion In patients with brown retinal colour, the treatment outcome of TTT was comparable to that of light-pigmented Caucasian patients with approximately half the laser power energy. Further randomized control studies are warranted.

Eye (2004) 18, 615–618. doi:10.1038/sj.eye.6700733
Published online 16 January 2004

Keywords: age-related macular degeneration; transpupillary thermotherapy; retinal colour; retinal pigmentation; choroidal neovascularization

Introduction

Exudative age-related macular degeneration (AMD), characterized by choroidal neovascularization (CNV), is a major cause of visual loss in developed countries. Although laser photocoagulation treatment for subfoveal CNV is beneficial in selected patients,¹ severe visual loss is inevitable immediately after the treatment due to the damage to the overlying retina. Treatment of CNV with minimum damage to the healthy retina, such as photodynamic therapy,² has been proven to be of benefit with predominantly classic CNV. In addition, transpupillary thermotherapy (TTT),^{3,4} using diode-laser, is under investigation. Diode-laser TTT has advantages over the conventional laser-photocoagulation, since the laser is mainly absorbed in the choroid and theoretically enables the choroidal lesion treatment with minimum damage to the neural retina.⁵ TTT works by elevating the choroidal temperature by about 10° and thus, inducing involution of the neovascular membrane through an indirect heat effect rather than direct

Department of
Ophthalmology
University of Tokyo School
of Medicine, Bunkyo-ku
Tokyo, Japan

Correspondence: Y Yanagi
Department of
Ophthalmology
University of Tokyo School
of Medicine, 7-3-1 Hongo
Bunkyo-ku
Tokyo 113-8655, Japan
Tel: +81 3 5800 8655
Fax: +81 3 3817 0798
E-mail: yanagi-tyk@
umin.ac.jp

Received: 7 June 2003
Accepted: 1 July 2003
Published online: 16 January
2004

photocoagulation as does conventional thermal laser. Indeed, initial nonrandomized case studies showed that TTT might be a potential treatment for CNV in light-pigmented Caucasian patients.^{3,4} In TTT, fundus pigmentation is one of the major factors affecting the hyperthermic effect of the laser. However, to date, the outcome of this therapeutic intervention in patients with relatively pigmented (brown) retinal colour remains largely unknown. In this case series, we report the therapeutic outcome of TTT in Japanese patients with the laser setting of lower energy level compared to the previous studies.

Materials and methods

This is a retrospective, noncomparative interventional case series. All patients were treated between January 2001 and December 2001 at the outpatient clinic of the Tokyo University Hospital. Patients were diagnosed with subfoveal CNV associated with AMD according to the classification of Macular Photocoagulation Study Group.⁶ Cases with polypoidal choroidal vasculopathy,⁷ diagnosed on the basis of indocyanine green angiography finding,⁸ were excluded. In total, 19 eyes of 18 patients (17 male and one female patient(s)) with the mean patient age of 74.2 years (51–94 years) were treated. At the initial visit, all the patients underwent a general ophthalmic examination including visual acuity, slit-lamp examination and fundus examination, simultaneous fluorescein and indocyanine green angiography using scanning laser ophthalmoscope (SLO; Rodenstock, Germany). Best-corrected visual acuity was measured by Snellen's acuity and translated into logarithm of the minimal angle of resolution (log MAR). Classification of CNV was based on the fluorescein angiography. In all, 11 (58%) CNVs were minimally classic or occult only and seven (42%) CNVs were predominantly classic. Initial visual acuity was below 20/200 in nine eyes (47%), between 20/200 and 20/50 in four eyes (21%), and above 20/50 in six eyes (32%).

For TTT, Institutional Ethical committee approval was obtained and written informed consents were obtained from all the studied subjects. TTT was performed as described elsewhere^{3,4} with modifications. The major modification was the change in the settings of the laser power. To circumvent an excessive hyperthermic effect that could arise due to the difference in fundus pigmentation between Japanese and light-pigmented Caucasian patients, the power of the laser was set 160 mW for 1.2 mm beam, 270 mW for 2.0 mm beam, and 400 mW for 3.0 mm beam, which were approximately half the power that were used in the previous studies.^{3,4} Using three-mirror Goldmann's lens, diode-laser was delivered for 1 min through a slit-lamp

mounted-delivery system. Retreatment was given to the patients who retained active CNV for more than 3 months following TTT as judged by fundoscopic examination and fluorescein angiography.

Patients were followed up for a mean of 8.8 months (4–12 months). Follow-up was arranged at 2, 4, and 6 weeks and 3, 6, 9, and 12 months. At each visit, general ophthalmic examination including visual acuity, slit-lamp examination, and fundus examination was performed. Simultaneous fluorescein and indocyanine green angiographies were performed at 3, 6, 9, and 12 months after TTT. Visual acuity and fundus change as judged by fundus examination and angiographies were evaluated at 3 months after treatment and at the last visit.

Visual acuity was measured using a Japanese standard Landolt visual acuity chart at 5 m and converted to Snellen's acuity. For Snellen's visual acuity equivalent lower than 20/200, the patients were asked to read a Landolt visual acuity card that corresponds in size to visual acuity of 20/200 at 4, 3, 2, 1, and 0.5 m. For statistical analysis, visual acuity were converted into log MAR scores according to the following formula:

$$\text{Log MAR} = -\text{Log}_{10}(\text{visual acuity fraction})$$

Using this conversion, each 0.1 decrement in the log MAR visual acuity scores corresponds to the loss of one line on a logarithmic visual acuity chart. Notations of counting fingers and hand motions were counted as two and three lines worse than 2/200, respectively. Improvement or decline in vision was defined as change of more than 0.2 in log MAR visual acuity.

Results

Of the 19 eyes, 12 (63%) received only one treatment session, while six (32%) and one (5%) eye(s) received two and three treatment sessions, respectively. At 3 months after treatment, vision improved in five eyes (16%), stabilized in 11 eyes (58%), and worsened in three eyes (16%). At the last visit, vision improved in four eyes (21%), stabilized in 11 eyes (58%), and worsened in four eyes (21%) of all the studied subjects (Figure 1). In eyes with minimally classic or occult only CNV, vision improved in two eyes (18%), stabilized in seven eyes (64%), and worsened in two eyes (18%). In eyes with predominantly classic CNV, visual acuity improved in two eyes (25%), stabilized in four eyes (50%), and worsened in two eyes (25%).

In all, 15 (84%) eyes of all the studied subjects had improvement in exudation (Figure 2). Two (11%) and one (5%) eye(s) were noted to have a significant post-treatment haemorrhage (Figure 3) and retinal pigment epithelial tear (Figure 4), respectively.